

二酸化炭素が海産魚卵および仔稚魚に与える影響

吉川貴志*

Effects of CO₂ on the early developmental stages of marine fish

Takashi Kikkawa*

要約：二酸化炭素 (CO₂) 海洋隔離が海洋生態系に及ぼす影響評価の一環として、CO₂ が海産魚卵・仔稚魚に与える影響について研究を行った。

CO₂ 海洋隔離の生物影響予測を行う際に考慮しなければならないのは、海中に放出された CO₂ は時空間的に非定常状態であること、および CO₂ 放出により直接的な影響を受けるのは放出点近傍に生息する深海生物であるという2点である。現段階では深海生物の入手が困難であることから、本研究ではまず入手可能な浅海生物を対象として、前者の非定常 CO₂ 影響を明らかにするための基礎的知見を得ることを目的として定常 CO₂ 暴露に対する影響把握に着手した。定常 CO₂ 暴露に対する致死影響については高 CO₂ および酸性水の毒性比較を行い、魚種や発育段階による高 CO₂ 耐性の違いを明らかにした。また亜致死影響の調査では低濃度長期間の CO₂ 暴露による成長への影響を観察した。

従来、CO₂ 海洋隔離の生物影響予測のために塩酸や硫酸等の強酸を用いた低pH海水に対する海産動物の毒性試験データが用いられてきた。しかし CO₂ と強酸では生物に対する生理学的作用メカニズムが異なることが予測されたため、両者の毒性を比較する目的でマダイの卵と仔魚について CO₂ と酸に対する耐性比較試験を行った。pHを等しく (6.2・5.9) した高 CO₂ 海水 (5・10%) と塩酸添加による酸性海水中での死亡率は、卵・仔魚ともに CO₂ 区の方が有意に高い死亡率を示した (pH6.2: CO₂ 区 >60%, 塩酸区 <10%, pH5.9: CO₂ 区 >90%, 塩酸区 <10%)。CO₂ 海洋隔離の影響評価に酸性水の影響についての情報を適用することは影響の過小評価をもたらすことから不適當であり、CO₂ そのものを用いた耐性試験が必要であるとの結論に至った。

マダイ、シロギス、ヒラメおよびスマを用いて初期発育段階における高 CO₂ 耐性実験を行った。孵化率・生残率は、全ての CO₂ 濃度区において暴露時間の増大に伴って低下した。マダイ・シロギスの発育段階による高 CO₂ 耐性を調査したところ、発育段階によって高 CO₂ 耐性は大きく変化し、胚体期や仔魚期に比べて卵割期と稚魚期は耐性が非常に低いステージであることが明らかになった (マダイ 6 h-LC₅₀ (CO₂ %) : 1.4 (卵割期), 5.1 (胚体期), 7.4 (前脊索屈曲期), 4.3 (脊索屈曲期), 4.6 (後脊索屈曲期) および 2.6 (稚魚期); シロギスも同様の傾向を示した)。また、高速遊泳魚であるスマの卵は他種の卵と比較して、極めて高い CO₂ 耐性を有していた (6 h-LC₅₀ : 12.0% (卵割期))。このように高 CO₂ 耐性は初期発育段階の中でも暴露時間や魚種・発育段階などの要因によって大きく異なることが明らかとなった。

CO₂ の亜致死影響を把握するため、マダイおよびシロギスを用いて稚魚の成長影響試験を行った。マダイ稚魚を 1.1% 以下の CO₂ 環境で 30 日間飼育したところ成長には影響がみられなかった。しかしシロギス稚魚について同様に 18 週間飼育した結果、0.4 および 1.2% の CO₂ 暴露に対して 18 週目の観察において対照区よりも有意に低い成長を示した。よって低濃度の CO₂ であっても暴露期間の延長により成長が抑制されることが明らかになった。

また、非定常 CO₂ 暴露実験の予備実験を行ったところ、定常 CO₂ 実験結果とは全く異なる結果が得られた。シロギス稚魚を 5% CO₂ に 3 時間暴露したところ、死亡率は 95% であったが、1% CO₂ に 3 時間暴露した後、CO₂ 濃度を 5% に上昇し、さらに 3 時間暴露した場合、全供試個体 (20 個体) が生残した。このことから、CO₂ 海洋隔離の生物影響調査には非定常実験が不可欠であるとの結論に至った。

これら定常 CO₂ 暴露に対する致死影響および亜致死影響、さらに今後実施する非定常 CO₂ 暴露実験の結果を CO₂ 海洋隔離技術開発にフィードバックさせることで、より一層環境への影響を抑えた CO₂ 海洋隔離技術の開発が可能となるものと考えられる。

(2004年5月28日受付, 2004年8月3日受理)

* 財団法人 海洋生物環境研究所 中央研究所 (〒299-5105 千葉県夷隅郡御宿町岩和田300)

E-mail: kikkawa@kaiseiken.or.jp

また、CO₂ 海洋隔離の生物影響において重要となる「深海生物」のCO₂ 影響予測については、供試材料の入手が困難であることから、浅海生物を用いた実験データからCO₂ 耐性と相関する形態学的指標を模索し、深海魚類への影響を予測することが有効な手段のひとつと考えられる。ここではイオン輸送細胞である塩類細胞に着目して、高CO₂ 環境が塩類細胞におよぼす形態学的影響について調査を行った。

本研究では、シロギス卵を用いて予備試験を行い、マダイ仔稚魚の塩類細胞について形態の観察を行った。またCO₂ 耐性の種間差を解明するための予備知見を得ることを目的として、非常に高いCO₂ 耐性を有していたスマと同科魚種であるクロマグロの卵および仔魚を用いて塩類細胞の観察を行った。シロギス卵を1% CO₂ に21時間暴露したのち、卵黄囊上皮に存在する塩類細胞の断面積を対照区と比較したところ、CO₂ 暴露個体について82%の面積増加が認められた。またクロマグロの塩類細胞は胚体出現期より後期から出現し、卵黄仔魚期における塩類細胞はヒラメと比較して極めて多数分布していることから塩類細胞に関する形態学的情報がCO₂ 耐性の種間差の指標となりうる可能性が示唆された。またマダイ仔稚魚を1%のCO₂ に24時間暴露したところ、仔魚では塩類細胞断面積に増加が観察されなかったが、稚魚では32%の有意な増加が見られた。またマダイ稚魚を0.3、0.6および1.1% CO₂ 環境下で30日間暴露したのち、鰓に存在する塩類細胞の断面積および密度を比較し、0.6および1.1% CO₂ 暴露区において有意な断面積増加を認めた。これらは塩類細胞が高CO₂ 環境下において酸性化した体内を正常に維持するため、何らかの役割を担っていることを示唆する。

今後、塩類細胞に着目してCO₂ 影響メカニズムについて調査を行い、深海魚の塩類細胞における知見の充実を図ることでCO₂ 海洋隔離による深海生物への影響を明らかにする予定である。また深海種に近縁な種等を用いて低水温・高圧下でCO₂ 暴露実験を行うなど、できるだけ現実に即した実験を進めていく必要がある。

キーワード：二酸化炭素，海洋隔離，海産魚，初期発育段階，毒性，成長，塩類細胞

Abstract: Effects of CO₂ on the early developmental stages of marine fish were investigated to assess the biological impact of CO₂ sequestration into the deep sea, which is proposed as a possible measure to mitigate climate changes caused by increasing atmospheric concentrations of the gaseous CO₂. Some earlier studies discussed effects of CO₂ on marine organisms using the results on toxic effects of mineral acids due to the paucity of relevant data. We first tested whether the use of acid data on marine organisms is valid by comparing the mortality rates of a marine fish in seawater acidified by either HCl or CO₂ to the same pH. Subsequently, we studied ontogenetic changes in CO₂ tolerance, since individuals in early developmental stages are often more susceptible to environmental perturbations than adults. Further, effects of CO₂ on fish growth were examined to understand the long-term effect.

Another difficulty in assessing biological effects of CO₂ ocean sequestration is that it is deep-sea animals that will be affected by high CO₂ water. Considering the obvious difficulty accompanying the use of live deep-sea animals in laboratory experiments, we instead have tried to establish some morphological indices that can be used to study effects of CO₂. We focused on the ion-transporting chloride cells, which are known to be involved in ion-regulation and presumably acid-base regulation in marine fishes.

To compare the acute toxicity of CO₂- and HCl-acidified seawater, eggs and larvae of a marine fish, Japanese seabream (*Pagrus major*), were exposed to seawater equilibrated with CO₂-enriched gas mixtures (CO₂=5% or 10%, O₂=20.95% balanced with N₂) or seawater acidified with 1 N HCl at two pH levels (pH 6.2 (=5% CO₂) and 5.9 (=10% CO₂)) for 6 h (eggs) or 24 h (larvae). Mortalities of eggs were 85.8% (CO₂) and 3.6% (HCl) at pH 6.2, and 97.4% (CO₂) and 0.9% (HCl) at pH 5.9, while those of larvae were 61.2% (CO₂) and 1.6% (HCl) at pH 6.2, and 100% (CO₂) and 5.0% (HCl) at pH 5.9. Thus, previous research on the effects of acidified seawater on marine organisms, as a substitute for CO₂, has largely underestimated the toxic effects of CO₂.

The CO₂ tolerance is examined using Japanese seabream, Japanese sillago (*Sillago japonica*), Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) and little tuna (*Euthynnus affinis*) during the early developmental stages. The percentages of larvae that hatched and survived were not affected by exposure to water with a 1% CO₂ within 24 h. Median lethal fCO₂ values for 6 h exposure were 1.4% (cleavage), 5.1% (embryo), 7.4% (preflexion), 4.3% (flexion), 4.6% (postflexion), and 2.6% (juvenile) for Japanese seabream; 2.5% (cleavage), 5.0% (embryo), 6.0% (preflexion), 6.3% (flexion), 4.1% (postflexion), and 2.7% (juvenile) for Japanese sillago; 2.7% (cleavage) and > 7.0% (juvenile) for Japanese flounder; and 12.0% (cleavage) for little tuna. Japanese seabream and Japanese sillago of all ontogenetic stages tested had similar susceptibilities to CO₂: the most susceptible stages were cleavage and juvenile, whereas the most tolerant stages were reflexion and flexion.

A preliminary investigation was conducted on lethal effects under fluctuating CO₂ concentrations. Under a constant 5% CO₂ concentration, 3 h mortality was 95% in juveniles of Japanese sillago. In contrast, no mortality occurred under 5% CO₂ exposure for 3 h after a 3 h pre-exposure to 1% CO₂. Therefore, dynamic changes in CO₂ concentrations that are predicted to occur during CO₂ ocean sequestration must be considered in the assessment of its biological impacts.

Growth performance was investigated in juvenile of Japanese seabream and Japanese sillago, reared under hypercapnia. There was no significant influence on the growth of Japanese seabream within 1% CO₂ for 30 days. On the other hand, growth rate was significantly reduced in juveniles of Japanese sillago under similar conditions for 18 weeks. Thus, fish growth was inhibited even by sub-lethal CO₂ level by prolonging the exposure.

A preliminary study was conducted on the changes in chloride cell morphology in the yolk-sac membrane of Japanese sillago embryos exposed to 1% CO₂ for 21 h. The chloride cell size increased 82% by the treatment. The chloride cell size of the gills significantly increased by 34% in juvenile Japanese seabream exposed to 1% CO₂ for 24 h, while the change was not significant in larvae of the same species. The 30-day exposure of juvenile Japanese seabream to 0.6 and 1.1% CO₂ resulted in significant increases in cell size, while cell density did not change. These results suggest that chloride cells play a homeostatic role under hypercapnia in marine fish.

These results and results of future studies should be incorporated into the development of CO₂ ocean sequestration techniques in order to minimize biological disturbance. To improve the validity of environmental assessment, high CO₂ experiments should be conducted under realistic conditions such as high pressure and low temperature.

Keywords : Carbon dioxide, Ocean sequestration, Marine fish, Early developmental stage, Toxicity, Growth, Chloride cell

緒 言

化石燃料の消費は人間活動の発展とともに年々増加し、それに伴う CO₂ 排出量は増加の一途をたどっている。産業革命以前280ppm程度であった大気中の CO₂ 濃度は現在370ppmに達し、毎年1.7ppm程度ずつ上昇を続けている (IPCC, 2001)。CO₂ はメタンや亜酸化窒素などと同様に温室効果ガスの一つであり、これらのガスが引き起こす地球の温暖化は生物にとって分布や種組成に影響するだけでなく、種の絶滅に関わる重大な問題であり (Omori *et al.*, 1994 ; Pounds *et al.*, 1999 ; Parmesan and Yohe, 2003 ; Root *et al.*, 2003など)、温暖化によって2050年までに35%の動植物種が絶滅するという試算もある (Thomas *et al.*, 2004)。また2003年12月にイタリアのミラノで開催された気候変動枠組み条約第9回締約国会議 (COP9) において、世界保健機構 (WHO) は世界の下痢の2.4%、マラリアの2%は気候変動に原因があるというデータから、「気候変動によって、既に2000年に15万人の死者が出ており、2030年までに死亡者数は倍増する」とする報告書を公表した (World Health Organization, 2003)。これまでの知見から地球温暖化現象の原因の2/3は CO₂ による温室効果であるとされており、人為起源の CO₂ 削減は地球規模で対処すべき急務課題となっている (Herzog *et al.*, 2000)。現在、世界的な省エネルギーの推進や、太陽電池、風力発電等のクリーンエネルギーの導入が行われているものの、1997年に京都で開催された気候変動枠組み条約第3回締約国会議 (COP3) において取り決められた温室効果ガスの排出削減目標を達成することは依然として困難な状況にある。このような本来的な対策に加え、CO₂ の放出源からの回収および処分が検討されており、我が国では CO₂ の回収処分は技術的に可能な段階に来ているとされる (石坂・大隅, 1999)。

回収した CO₂ の処分については、地中深層の帯水層等に注入する地中隔離方式と海洋に処分する海洋隔離方式が考慮されており、地中貯留に関してはノルウェー沖合のスライプナー鉞区の洋上天然ガス採掘プラットフォームにおいて既に商業規模で実施されている。一方海洋隔離については、Marchetti (1977) による最初の提案以降、CO₂ が海洋生態系へおよぼす影響について議論されている段階である (Handa and Ohsumi, 1995 ;

Ormerod and Angel, 1996 ; 大森, 1997 ; 下島, 1997 ; 石坂・大隅, 1999 ; 石坂, 2001 ; 大隅, 2003など)。CO₂ を海洋へ隔離する具体的な方法については、(1) パイプラインを用いて気体状あるいは液状の CO₂ を沿岸の水深1,000m付近の固定点に放出する方法 (Liro *et al.*, 1992), (2) 液状 CO₂ を船からパイプを吊り下げ曳航しながら水深1,000~2,000mに連続放流する方法 (Ozaki *et al.*, 1995), (3) ドライアイスの投入 (Nakashiki *et al.*, 1991), (4) 深海底 (水深3,000m以深) の窪地へ液状 CO₂ を貯留する方法 (Ohsumi, 1995) などが挙げられる。これらのうち水深1,000~2,000mへの曳航船による CO₂ 隔離方式では CO₂ が海面に向かって浮上するが、投入時に十分小さい液滴にしておけば溶解・拡散すると考えられ、船舶を走行しながら投入することによりさらに広範囲に低い濃度に希釈されるため、環境や生物への影響を最小限にとどめることが可能であると考えられる (Nakashiki *et al.*, 1995)。これに対し Omori *et al.* (1998) は、影響範囲を局限できる点から水深3,000m以深での貯留型隔離方式を提案している。海洋は今後人類が大気に放出する CO₂ のほとんどを吸収できると考えられており (坪田ら, 1994)、大気中への CO₂ 放出増加に対し何も策を講じなかった場合にも、CO₂ は大気を通じて海洋に溶解し、いずれは平衡に達する (Caldeira and Wickett, 2003)。大気と海洋表面間の CO₂ 濃度は1年程度で平衡に達する (Broecker and Peng, 1974) が、海洋の深層水と表層水が入れ替わるのには1,000年以上かかるとされ、海洋全体が新たな平衡に達するにはこれと同程度の時間を要する (坪田ら, 1994)。これらの CO₂ 海洋隔離技術は、CO₂ を人為的に海洋へ溶解することによって大気中への放出を抑制する手段として考えられている (Hoffert *et al.*, 1979)。しかしどのような隔離方式が採用されたとしても海洋生物および生態系への影響は必至であり、海洋隔離が実施される前に慎重な生物影響調査を行う必要がある。海洋隔離の実施が検討されている深海における生物学的知見は、深海性魚類およびプランクトンについての動物相、生物現存量、鉛直移動に関する記述には富むが、生理学的な知見は僅かである (Haedrich, 1997; Weitzman, 1997; Omori *et al.*, 1998 ; Nishikawa *et al.*, 2001)。近年では CO₂ 海洋隔離が深海生物相に与える影響を論じた研究もあるが (Seibel and Walsh, 2001;

Seibel and Walsh, 2003), 生物そのものを用いた実験例は現在の所皆無である。

魚類は海洋生物資源の主要構成要素であり、また先進諸国の中でわが国の水産業は他国に例をみないほどに重要な産業であることから、CO₂ 海洋隔離が実施された場合の魚類への影響評価は極めて重要である。この際に留意しなければならないのは、その資源量を左右する卵、仔稚魚といった初期生活史への影響である。多くの魚類は大量に産出された卵から孵化して仔魚、稚魚になり、さらに成長して極めて僅かな確率で成魚に至る (Houde, 1987; Rice *et al.*, 1987; Miller *et al.*, 1988)。この初期の成長過程における生残率が資源量を決定する大きな要因となる。しかし CO₂ が魚類に与える影響については、大部分が淡水種を用いて調べられており、海産魚に関する知見は乏しい。さらにそれらの知見についても成魚のみが実験対象となっており、初期発育段階における CO₂ 影響の知見は極めて乏しい (石松・喜田, 1999)。

Auerbach *et al.* (1997) および Caulfield *et al.* (1997) は、海産仔魚、カイアシ類、軟体類幼生など、移動能力の低い海産動物の低pH暴露に関する既往知見から、CO₂ 放出点近傍域における海産生物の急性致死影響を予測するためのモデルを提示した。しかし彼らの致死影響予測モデルに用いられたデータ (Calabrese and Davis, 1966; Portmann, 1972; Grice *et al.*, 1973; Rose *et al.*, 1977; Brownell, 1980; Bamber, 1987; Bamber, 1990) は、CO₂ 海洋隔離を前提とした実験ではなく、塩酸や硫酸といった強酸を用いて海水pHを低下させた低pH暴露実験の結果であり、CO₂ そのものを用いていない。水中における CO₂ 濃度の増大は、結果として水pHの低下=水素イオン濃度の増大を引き起こすが、水素イオン自体と CO₂ とは互いに異なる生体膜透過性を有するため (Heisler, 1986; Morris *et al.*, 1989)、水生生物に対し異なった生理学的作用を持つと考えられる。渡辺ら (2001) は動物プランクトンのカイアシ類を用いて同一pH下における CO₂ および強酸の毒性を比較し、CO₂ 暴露によってpHを低くした区において死亡率が高くなる結果を示した。この報告からも、低pH耐性に関するデータを CO₂ 影響予測のためにそのまま用いることは不適当であると考えられる。しかしながら前述の通り海産魚における CO₂ の致死影響に関する情報は少な

く、基礎的知見の集積が急務である。また Pörtner and Reipschläger (1996) は高 CO₂ による酸塩基調節、呼吸、エネルギー転換および代謝への影響に関する既往知見から、環境 CO₂ 分圧 (pCO₂) の増加によって考慮しなければならない生理学的問題点について言及し、特に深海種における亜致死レベルの CO₂ が及ぼす長期的影響解明の重要性について論じている。このように致死影響のみならず、亜致死影響についても同様に情報の集積が必要とされている。

CO₂ の海洋隔離が生物へ及ぼす影響について論ずる場合、次に挙げる点を考慮しなければならない。第一に CO₂ が海水中に放出されたとき、その現場に生息する生物が経験する CO₂ 濃度は、一定濃度 (定常) ではなく常に変化していく「非定常」状態にある。生物種の移動能力に関わらず、放出された CO₂ の濃度自体が時空間的に変化していく。第二に、海洋隔離による高 CO₂ 環境に直接曝されるのは深海生物であることである。前者の非定常 CO₂ 濃度を実験室で再現することは可能であるが、まず基本的な高 CO₂ に対する急性致死影響を把握するため、本研究では定常 CO₂ 環境への暴露実験を実施した。また後者の深海生物への CO₂ 影響解明は、現時点では深海生物の供試材料入手が困難であることから、浅海生物を用いた実験から影響を外挿せざるを得ない。この場合に用いることのできる手法のひとつとして、形態学的観察による CO₂ 影響の予測が挙げられる。本研究では魚類におけるイオン輸送細胞である塩類細胞に着目し、高 CO₂ 環境が塩類細胞におよぼす形態学的影響を観察することで、外部形態と CO₂ 影響との関係を明らかにし、深海生物の標本等からその CO₂ 影響を予測する手法について検討した。

なお本研究の一部は、NEDO (財団法人 新エネルギー・産業技術総合開発機構) の委託研究「二酸化炭素の海洋隔離に伴う環境影響予測技術研究開発」の一環として行われたものである。

定常 CO₂ 暴露による影響

1. 高 CO₂ および酸性水の毒性比較

従来、CO₂ 海洋隔離の影響評価に用いられてきた致死影響に関する既往知見は、大多数が強酸を用いた暴露実験であり、CO₂ 自体を用いた実

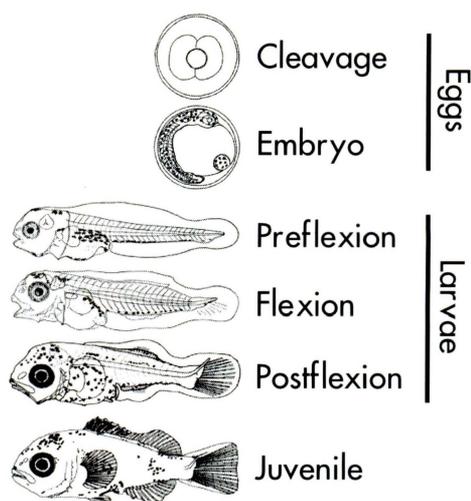


Fig. 1. The early developmental stages of fish used for the current study. Redrawn from Fukuhara (1969, 1985).

験例は極めて少ない。CO₂ および強酸の致死的影響を定量化し比較することは、CO₂ 海洋隔離による生物への影響評価を行う点で極めて重要である。ここではマダイ (*Pagrus major*) 卵および仔魚を CO₂ および強酸によって作成した同じpHの海水へ暴露したときの死亡率を比較した。

1) 材料と方法

本研究における発育段階 (ステージ) の分類は、卵についてはOozeki and Hirano (1985)、仔稚魚についてはKendall *et al.* (1984) にそれぞれ準拠した (Fig. 1)。本研究では実験の再現性を考慮し、CO₂ 量の表記を、% (v/v) で表記することとした。なお、1%のCO₂ はpCO₂ 約 1 kPa (=7.5mmHg) に相当する。

(1) 供試材料

2001年5月21日~22日、(財) 海洋生物環境研究所中央研究所 (海生研) で飼育しているマダイ親魚の自然産卵により受精卵を得た。受精卵を100Lパンライト水槽で水温20°C、自然日長下で飼育し、受精後21時間経過した時点で卵をパンライト水槽より取り上げ、実体顕微鏡下で正常に心臓原基形成期まで発育した卵のみを選別し、卵の試験に供した。供試卵の大きさ (平均値±SD) は卵径が0.87±0.01mm、油球径が0.20±0.01mmであった。また500Lパンライト水槽を用いて仔魚の種苗生産を行った。餌料はSおよびL型ワム

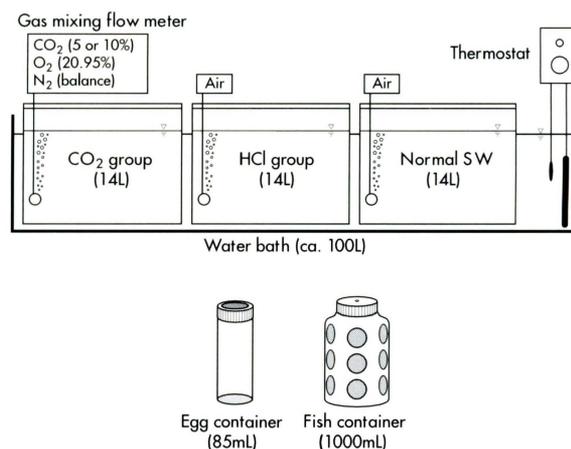


Fig. 2. Apparatus and animal containers used for the comparison of toxicity between hypercapnia and acidification. PVC bath (100 L) is used to standardize the temperature for the three PVC tanks (CO₂ group, HCl group and Normal seawater; 14 L respectively).

シ (*Brachionus plicatilis*), アルテミア (*Artemia salina*) ノープリウス幼生を発育にあわせて用いた。孵化後10~12日目の正常に遊泳している前脊索屈曲期仔魚を試験に供した。供試魚の全長 (平均値±SD) は5.74±0.51mmであった。

(2) 試験装置

試験ではFig. 2に示した装置を使用した。この装置は水温を一定にするための恒温水槽 (約100L容)、3つの暴露水槽 (CO₂ 区、塩酸区および自然海水区; 各14L容) およびガス混合装置 (Cameron社, Gas Mixing Flowmeter: GF-3/MP) で構成される。CO₂ 区はガス混合装置を用いてCO₂ (5%および10%の2段階)、O₂ (20.95%) およびN₂ (balance) からなる混合ガス (以下「CO₂ 混合ガス」) の連続送気により、海水中のガス濃度組成を一定に維持できるようにした。塩酸区では自然海水に塩酸を滴下してpHを調節し、連続して空気曝気した。また、死亡率算出のため、自然海水に空気曝気を行う自然海水区を設定した。水温は各暴露水槽内が20°Cになるよう調節した。卵の収容器は、ポリカーボネイト製沈殿管 (85mL) の蓋および底に穿孔し、プランクトンネット地 (NGG72: 目合い222 μm) を貼ったものを用い、仔稚魚の収容にはポリカーボネイト製沈殿管 (1,000mL) 側面に防虫ネットを貼った12個の通水孔を備えたものを用いた。すべての試験において、0.50および0.45 μmフィルター (Advantec

Table 1. Experimental conditions for the comparison of toxicity of hypercapnia and acidification

Group	Condition A			Condition B		
	pH	Aeration	Additive	pH	Aeration	Additive
CO ₂	6.2	5%CO ₂	—	5.9	10%CO ₂	—
HCl		Air	HCl		Air	HCl

Seawater was regulated by CO₂-enriched gas mixtures (5% or 10% CO₂) (CO₂ group) or 1N HCl (HCl group) at two pH levels.

Toyo社, TOCEL : TCW-05B-PPS, TOCEL : TCG-045SIFN) で濾過した自然海水を用いた。自然海水の塩分は34.5, アルカリ度は2.29meq/L, pHは8.13, 総CO₂濃度 (TCO₂=[CO₂]+[H₂CO₃]+[HCO₃]+[CO₃²⁻])は1.75mM/Lであった。また試験期間中は海水のpHを小数点第2位精度で連続監視し, 暴露開始時および終了時には小数点第3位の精度でpH測定を実施した。水質の測定にはMettler Toledo社MP125・ポリマー型pH複合電極(pH連続監視), TOA社HM-60G・複合電極GST-5721C(アルカリ度およびpH測定), Cameron社Total carbon analyzer : Capni-Con5(TCO₂測定), およびYeo-Kal Environmental Electronics社Inductively coupled salinometer : 601 MK III(塩分測定)を使用した。pH条件はA : pH6.2およびB : pH5.9の2段階準備し, CO₂区では5%あるいは10%CO₂を含むCO₂混合ガスの曝気によりpHを調整し, 塩酸区では塩酸の滴下によりpHを調節した(Table. 1)。CO₂区の海水は試験開始2時間以上前にCO₂混合ガスの曝気を開始し, pH安定後, 試験に用いた。塩酸区海水のpHは試験前日より次の手法で調節した。水槽内の海水を強く空気曝気している状態でpHを監視しながら目標とするpH(Table. 1)になるまで塩酸を添加した。この時, 酸性化により海水中に溶解していた重炭酸イオンおよび炭酸イオンがCO₂に転換され高炭酸状態となり, 空気曝気によって海水中の過剰なCO₂が除かれることによりpHが上がるため, pHが安定するまで塩酸を添加した。海水のpHを調節した後も空気曝気を継続し, 翌日にpHを再調整して実験に用いた。海水への曝気はすべての暴露区において実験が終了するまで継続した。

(3) 卵の暴露方法

約45個の供試卵をピペットを用いて卵収容器に收容し, これを水槽に沈めて6時間暴露した後, 収容器を自然海水区水槽に移した。供試卵数は

CO₂区および塩酸区がそれぞれ約225粒(卵45個×収容器5本)で自然海水区では約90粒(卵45個×収容器2本)とした。収容器すべてを移動させた後, 自然海水区の海水を満たした300mLビーカーに収容器内の卵を移し, これを恒温水槽内に一昼夜静置した。

孵化後1日目に供試個体の観察を行い, 死亡率を次式によって求めた。

$$\text{死亡率 (\%)} = 100 - \text{正常孵化率}$$

ここでの正常孵化率は, 暴露区の正常孵化率を自然海水区の正常孵化率で除し, これを百分比で表したものである。本研究では外見上の異常(脊索の彎曲, 卵黄の収縮, 体躯の白濁, 旋回, 痙攣, 横臥等)が見られない孵化を「正常孵化」とみなした。なお, 算出した正常孵化率が100%を超えた場合は, 100%として扱った。

(4) 仔魚の暴露方法

正常に遊泳している仔魚を, 500Lパンライト水槽から5L計量カップを用いて取り上げ, ハンドリングのストレスを減じるため約1時間曝しながら試験温度に設定した恒温水槽内に静置した。CO₂区および塩酸区の供試個体数は約60個体(約20個体×収容器3個)とし, 暴露を開始した。自然海水区の供試個体数は約20個体(収容器1個)とした。暴露開始から24時間経過した時点で次式により死亡率を求めた。

$$\text{死亡率 (\%)} = \text{死亡個体数} / \text{供試個体数} \times 100$$

ここでは心拍停止した個体を死亡個体とした。

卵, 仔魚ともに暴露実験は2回実施し, 死亡率は両実験の平均値を採用した(N=2)。

2) 結果および考察

自然海水区における卵の正常孵化率は97.7±0.1%, 仔魚の生残率は98.4±1.9%であった(それぞれ平均値±SD)。条件A(pH6.2)では, CO₂区の死亡率が卵85.8±7.7%, 仔魚61.2±21.8%であったのに対して, 塩酸区では卵3.6±1.9%, 仔魚が1.6±2.8%であった。条件B(pH5.9)では, CO₂区の死亡率は卵97.4±1.8%, 仔魚100%, 塩酸区では卵0.9±1.9%, 仔魚5.0±4.8%であった。このように同一pHにおける致死影響はCO₂の方が塩

Table 2. Seawater carbonic systems of CO₂ and acid groups

Parameter	Condition A		Condition B	
	CO ₂ (5%)	Acid	CO ₂ (10%)	Acid
pH	6.16	6.19	5.86	5.87
[H ⁺] (mmol/L)	6.92·10 ⁻⁷	6.46·10 ⁻⁷	1.38·10 ⁻⁶	1.35·10 ⁻⁶
pCO ₂ (kPa)	4.95	0.037	9.9	0.037
[CO ₂] (mmol/kg)*	1.58	1.17·10 ⁻²	3.16	1.17·10 ⁻²
[HCO ₃ ⁻] (mmol/kg)	2.16	1.71·10 ⁻²	2.16	0.82·10 ⁻²
[CO ₃ ²⁻] (mmol/kg)	2.05·10 ⁻³	1.74·10 ⁻⁵	1.03·10 ⁻³	4.00·10 ⁻⁶

pK₁ (6.026) and pK₂ (9.181) from Mehrbach *et al.* (1973). CO₂ solubility (α : 0.03241 mol kg⁻¹ atm⁻¹) from Weiss (1974). * includes negligible concentration of H₂CO₃ (Heisler, 1986). Assuming atmospheric pressure of 101.3 kPa.

$$\begin{aligned}
 [\text{CO}_2] &= \alpha \cdot \text{pCO}_2 \\
 [\text{HCO}_3^-] &= \alpha \cdot \text{pCO}_2 \cdot 10^{\text{pH}-\text{pK}_1} \\
 [\text{CO}_3^{2-}] &= \alpha \cdot \text{pCO}_2 \cdot 10^{\text{pH}-\text{pK}_1} \cdot 10^{\text{pH}-\text{pK}_2} \\
 \text{pH} &= \text{pK}_1 + \log([\text{HCO}_3^-]/[\alpha \text{pCO}_2]) \\
 &= \text{pK}_2 + \log([\text{CO}_3^{2-}]/[\text{HCO}_3^-])
 \end{aligned}$$

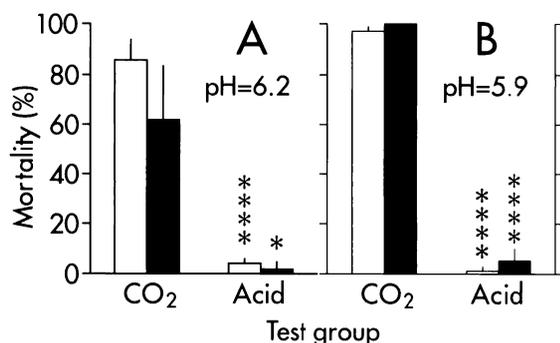


Fig. 3. Comparison of lethal effect between CO₂ and acid by mean mortalities of embryos (*N*=5) and larvae (*N*=3) of *Pagrus major* at two pH levels (Condition A: pH 6.2, Condition B: pH 5.9 in Table 2). Exposure periods for embryos and larvae were 6 and 24 h, respectively. Asterisks show the level of significant difference between test groups (A: Welch's *t*-test, B: Student's *t*-test, *: *P*<0.05, ****: *P*<0.0001). Redrawn from Kikkawa *et al.* (2004).

酸の場合よりも有意に高かった (卵: *P*<0.0001, 仔魚: *P*<0.05…Welch's *t*-test (条件A), 卵・仔魚: *P*<0.0001…Student's *t*-test (条件B), Fig. 3)。

Table. 2 に試験海水における炭酸物質濃度 (計算値) を示した。CO₂ 区と塩酸区の H⁺ 濃度が両 pH 条件下で同等であるが, CO₂ 区の炭酸物質濃度は全ての炭酸物質について塩酸区の約130倍 (条件A) あるいは260倍 (条件B) である。HCO₃⁻ および CO₃²⁻ と CO₂ を比較すると, 非荷電 CO₂ 分子は生体膜を容易に透過し (Vandenberg *et al.*, 1994), CO₂ は細胞区画内に拡散すると, 偏在的な酵素である炭酸脱水素酵素の存在により速やか

に炭酸を形成し, 酸は即座に H⁺ および HCO₃⁻ に解離する。これにより引き起こされる細胞内アシドーシスは多くの生理学的プロセスに関与し (Roos and Boron, 1981), 海洋生物にとって致命的な影響を与える可能性がある。これらの酸性化による毒性に加え, CO₂ 自体も動物細胞にとって毒性を持つ (Max, 1991)。したがって CO₂ 海洋隔離の生物影響を室内実験によって検討しようとする場合, 強酸を用いた実験データでは影響を過小評価することから, CO₂ を用いた実験が必要であると結論できる。

2. 卵仔稚魚における高 CO₂ 耐性

魚類の致死 CO₂ レベルの把握は CO₂ 海洋隔離の影響を検討する上で必須となる調査項目である。魚類はその生態的特徴および発育段階により生理機能が異なり, 環境ストレスに対する耐性も異なる (石橋ら, 2003) ことから, 高 CO₂ に対しても, 発育段階によって異なる感受性を示すことが予想される。初期発育段階は幾つかの連続する発育段階に分類され, CO₂ 感受性の高い発育段階を明らかにすることは, CO₂ 海洋隔離に伴う生物影響を予測する点において非常に重要である。ここでは生態的特徴の異なるマダイ, シロギス (*Sillago japonica*), ヒラメ (*Paralichthys olivaceus*) およびスマ (*Euthynnus affinis*) を用いて, 卵仔稚魚における高 CO₂ 急性致死影響試験を実施し, 初期発育段階における高 CO₂ 耐性の変化を明らかにすることを目的とした。

Table 3. Developmental stage, size, and time after fertilization or hatching of experimental materials in the CO₂ tolerance tests

Species	Stage	Diameter (mm)		Total length (mm)	Wet body weight (g)*	Hours after fertilization	Days after hatching
		Egg shell	Oil globule				
<i>Pagrus major</i>	Egg (cleavage)	0.88 (0.043)	0.20 (0.007)	-	-	1	-
	Egg (embryo)	0.90 (0.021)	0.20 (0.005)	-	-	21	-
	Larva (preflexion)	-	-	5.32 (0.53)	0.00141	-	10-12
	Larva (flexion)	-	-	6.75 (0.42)	0.00384	-	14-15
	Larva (postflexion)	-	-	8.72 (1.17)	0.00755	-	20-22
	Juvenile	-	-	14.29 (2.11)	0.03515	-	28-33
<i>Sillago japonica</i>	Egg (cleavage)	0.67 (0.022)	0.15 (0.007)	-	-	1	-
	Egg (embryo)	0.68 (0.022)	0.15 (0.005)	-	-	12.5	-
	Larva (preflexion)	-	-	4.55 (0.64)	0.00034	-	10-12
	Larva (flexion)	-	-	5.65 (0.82)	0.00066	-	11-13
	Larva (postflexion)	-	-	9.09 (1.69)	0.00288	-	17-19
	Juvenile	-	-	14.53 (2.00)	0.01225	-	24-28
<i>Paralichthys olivaceus</i>	Egg (cleavage)	0.94 (0.008)	0.16 (0.003)	-	-	2.5	-
	Juvenile	-	-	74.4 (6.2)	3.5 (1.0)	-	-
<i>Euthynnus affinis</i>	Egg (cleavage)	0.93 (0.027)	0.25 (0.005)	-	-	4	-

Values in parentheses show SD. * Calculated from equations given in Oikawa *et al.* (1991) (*P. major*) and Imoto (2000) (*S. japonica*).

1) 材料と方法

(1) 供試材料

実験に用いた供試材料をTable. 3に示した。マダイの湿重量WBW (mg) は全長TL (mm) の値を用いてOikawa *et al.* (1991) の式 (WBW(g)= $1.26 \times 10^{-6} \times TL$ (mm)^{4.201} : 前脊索屈曲期仔魚および脊索屈曲期仔魚, WBW= $8.92 \times 10^{-6} \times TL$ ^{3.113} : 後脊索屈曲期仔魚および稚魚) を用い, シロギスのWBWは伊元 (2000) の式 (WBW (mg)= $3.164 \times 10^{-3} \times TL$ (mm)^{3.087}) を用いて算出した。

マダイ, シロギスおよびヒラメの供試卵は海生研で飼育している親魚の自然産卵により得た。採卵はマダイについて2000年6月7日~7月20日および2001年5月15~25日, シロギスでは2000年10月7日, 2001年6月24~26日および同年10月9~29日, ヒラメは1998年12月15日~1999年3月2日にそれぞれ実施した。受精後1~2.5時間で正常卵割を開始した卵を卵割期の試験に供した。またマダイおよびシロギスでは, 受精卵を100Lパンライト水槽で砂濾過海水を曝気して飼育し, 心臓原基形成期まで正常発生した卵を胚体期卵として試験に供した。スマの卵割期卵は, 1999年11月2~11日, 東京都葛西臨海水族園内の循環式飼育水槽において自然産卵された受精卵を直ちに海生研へ持ち帰り, 正常に発生している卵を選別して供試した。

マダイおよびシロギスの種苗生産は海生研において500Lパンライト水槽を用いて自然日長下で

実施した。ヒラメの稚魚は日清マリンテック株式会社より購入した (体重: 3.5 ± 1.0 g, 平均値 \pm SD)。仔稚魚の餌料はSおよびL型ワムシ, アルテミアのノープリウス幼生, 魚卵および配合飼料を用い, 仔稚魚の成長に合わせて給餌した。

(2) 試験装置と方法

マダイおよびシロギスの試験では高CO₂ および酸性水の毒性比較試験と同様の装置を用い, 高CO₂ 区 (CO₂ 混合ガス曝気) と対照区 (Air曝気) の2水槽を設けた。ヒラメ稚魚の試験には, 高CO₂ 区水槽, 対照区水槽 (各7L) および高CO₂ 海水準備水槽 (14L) からなる装置を用いた (Fig. 4)。試験水温はTable. 4に示した。すべての試験において, 高CO₂ および酸性水の毒性比較試験と同様に濾過した自然海水を用い, 水質を測定した。自然海水の塩分は 33.84 ± 0.62 , アルカリ度は 2.294 ± 0.025 meq/L, pHは 8.111 ± 0.062 であった (各, 平均値 \pm SD)。CO₂ 混合ガスのCO₂ 濃度と海水の平衡pHの関係をTable. 5に示した。

(3) 卵の高CO₂ 暴露方法

マダイおよびシロギス卵の暴露は次のように行った。卵収容器は各暴露時間区 (Table. 4) および対照区につきそれぞれ2本ずつ用意した。卵をピペットで卵収容器に40~50個ずつ移し, 収容器を暴露水槽内に置き, 高CO₂ 暴露を開始した。所定の暴露時間が終了した時点で, 収容器を暴露水

Table 4. Developmental stage, experimental temperature, and exposure duration in the CO₂ tolerance tests

Species	Stage	WT (°C)	Exposure duration
<i>Pagrus major</i>	Egg (cleavage), Larvae, Juvenile	20	15min, 1.5h, 6h, 24h
	Egg (embryo)		15min, 1.5h, 6h
<i>Sillago japonica</i>	Egg (cleavage)	26	15min, 1.5h, 6h, 16.7h
	Egg (embryo)		15min, 1.5h, 6h
	Larvae, Juvenile		15min, 1.5h, 6h, 24h
<i>Paralichthys olivaceus</i>	Egg (cleavage)	17	15min, 6h, 24h, 45h
	Juvenile	18	15min, 1.5h, 6h, 8h, 24h, 48h,
<i>Euthynnus affinis</i>	Egg (cleavage)	24	15min, 1.5h, 6h, 24h

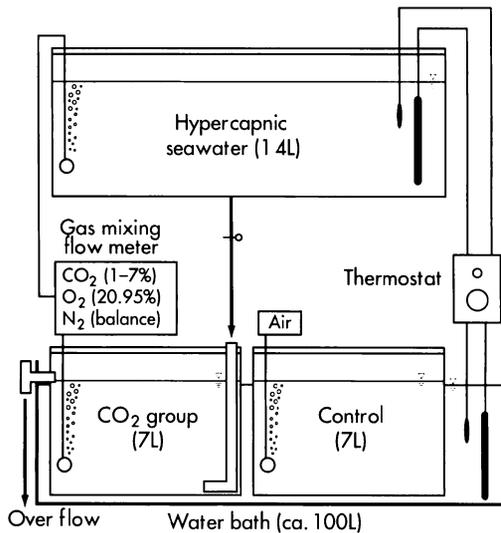


Fig. 4. Apparatus used for the CO₂ tolerance test of juveniles of *Paralichthys olivaceus*. Upper tank was a reservoir of hypercapnic seawater and the seawater flows into the CO₂ exposure tank, which was filled with normal seawater initially.

槽から対照区水槽へ移した。全ての暴露が終了した時点で供試卵を収容器から対照区海水を満たした300mLビーカーに移し、対照区卵の孵化が開始した翌日に、正常孵化した個体を計数した。正常孵化の基準は前項同様、外見上の異常（脊索の彎曲、卵黄の収縮、体軀の白濁、旋回、痙攣、横臥等）が見られない孵化とした。高CO₂区の正常孵化率を対照区の正常孵化率で除し、これを百分比で表したものを正常孵化率(%)とした。なお、算出した正常孵化率が100%を超えた場合は100%として扱った。

また約30~40個のヒラメおよびスマの卵を同様のポリカーボネイト管に收容して、上記の方法と同様に高CO₂暴露を行った（ヒラメ卵については最長45時間の暴露とした）。

Table 5. Relationships of fCO₂ (%) of gas mixture and seawater pH at equilibrium, $pH = a \log (fCO_2) + b$, r^2 : coefficient of determination

Water temperature (°C)	a	b	r ²
17	-0.868	7.019	0.970
18	-1.055	6.859	0.995
20	-1.011	6.862	0.991
24	-1.481	7.776	0.970
26	-1.004	6.903	0.995

(4) 仔稚魚の高CO₂暴露方法

マダイおよびシロギス仔稚魚については次の方法で高CO₂暴露を行った。飼育水槽から正常に遊泳している仔稚魚を5L計量カップまたはタモ網を用いて取り上げ、ハンドリングのストレスを減じるため約1時間曝気しながら試験温度に設定した恒温水槽内に静置した。その後、マダイ仔稚魚は約20個体、シロギス仔魚は約15個体、シロギス稚魚は約10個体をそれぞれ仔稚魚収容器に移し、高CO₂暴露を開始した。これらの収容器は4個準備し、対照区については斃死率が常にほぼ0%であるため、収容器は1個とした。仔魚（前脊索屈曲期仔魚、脊索屈曲期仔魚および後脊索屈曲期仔魚）については空気接触による斃死を避けるため、ピペットを用いて収容器に移し、稚魚はタモ網を用いた。所定の暴露時間ごとに収容器内の生残個体および死亡個体を計数した。ここでは心拍が停止した個体のみを死亡として判定した。仔稚魚の生残率は高CO₂区の生残率を対照区の生残率で除し、これを百分率で表したものとした。なお、生残率が100%を超えた場合は100%として扱った。

ヒラメ稚魚の暴露は次のように行った。供試魚はハンドリングによるストレスを減じるため、高

Table 6. Percent normal hatching and survival of control groups in the CO₂ tolerance tests

Species	Stage	Mean ± SD
<i>Pagrus major</i>	Egg (cleavage)	96.2±2.6
	Egg (embryo)	82.0±17.4
	Larva (preflexion)	100
	Larva (flexion)	100
	Larva (postflexion)	100
	Juvenile	100
<i>Sillago japonica</i>	Egg (cleavage)	95.2±6.3
	Egg (embryo)	100
	Larva (preflexion)	100
	Larva (flexion)	90.9±12.9
	Larva (postflexion)	100
<i>Paralichthys olivaceus</i>	Egg (cleavage)	84.6±7.2
	Juvenile	100
<i>Euthynnus affinis</i>	Egg (cleavage)	84.5±10.1

CO₂ 暴露開始の前日に曝気を施した高 CO₂ 区水槽および対照区水槽へ各12個体収容し、水槽を黒いビニールで覆った。また、高 CO₂ 海水準備水槽には CO₂ 混合ガスを送気し、あらかじめ高 CO₂ 海水を用意した。翌日、供試魚が安静状態にあることを確認し、高 CO₂ 海水準備水槽の海水を高 CO₂ 区水槽に約5分間かけて流し入れるとともに、曝気を所定の高 CO₂ 混合ガスに切り替え、暴露開始とした。生残の判定および生残率の算出は前述の方法と同様に実施した。

2) 結果

対照区における正常孵化率および生残率を Table. 6 に示した。マダイにおける卵の正常孵化率および仔稚魚の生残率は CO₂ 濃度の増加および暴露時間の延長に伴って低下した (Fig. 5~10)。卵割期 (Fig. 5) および稚魚 (Fig. 10) は CO₂ に対する感受性の高い発育ステージであった。胚体期 (Fig. 6), 前脊索屈曲期 (Fig. 7) および脊索屈曲期 (Fig. 8) は短時間の暴露に対して特に高い CO₂ 耐性を有していた。長時間暴露における後脊索屈曲期の CO₂ 感受性は、胚体期, 前脊索屈曲期および脊索屈曲期と同等であった (Fig. 9)。シロギス卵の正常孵化率 (Fig. 11, 12) および仔稚魚の生残率 (Fig. 13~16) は、傾向がやや不明瞭ではあるが、マダイの反応に概ね一致していた。

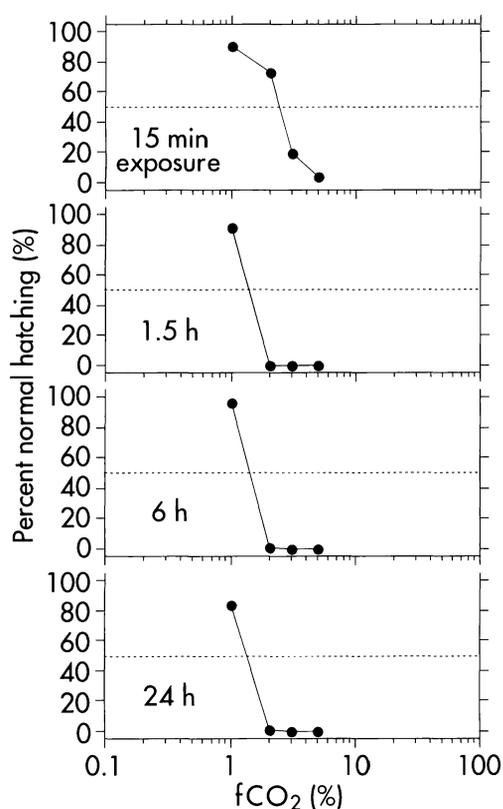


Fig. 5. Percentage of cleavage stage eggs of *Pagrus major* hatching normally under hypercapnia range of 1-5% for 15 min to 24 h exposure (*N*=2).

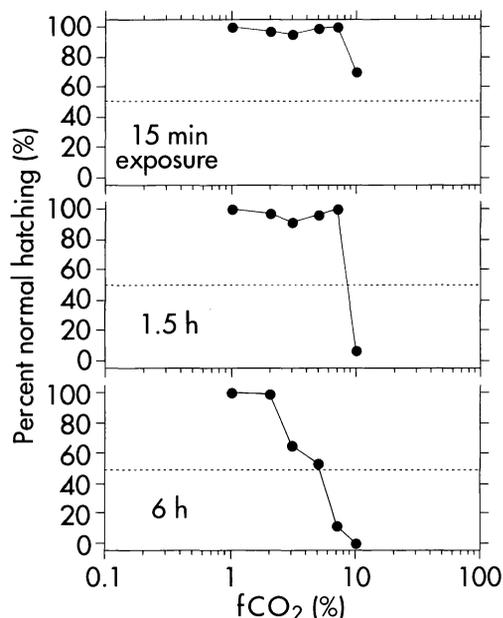


Fig. 6. Percentage of embryo stage eggs of *Pagrus major* hatching normally under hypercapnia range of 1-10% for 15 min to 6 h exposure (*N*=2).

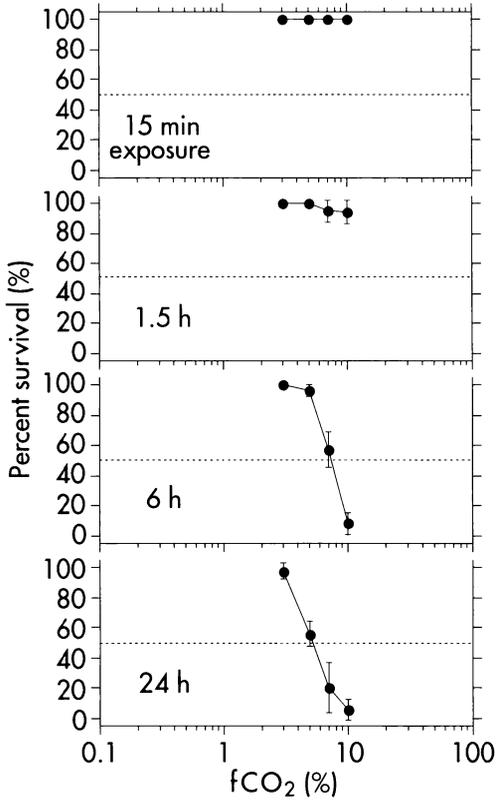


Fig. 7. Percent survival of preflexion larvae of *Pagrus major* under hypercapnia range of 3-10% for 15 min to 24 h exposure. Bars show SD ($N=4$).

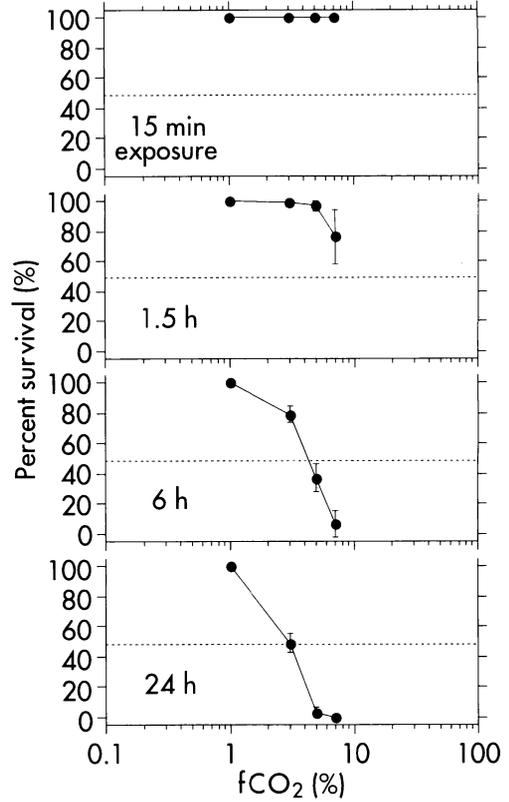


Fig. 8. Percent survival of flexion larvae of *Pagrus major* under hypercapnia range of 1-7% for 15 min to 24 h exposure. Bars show SD ($N=4$).

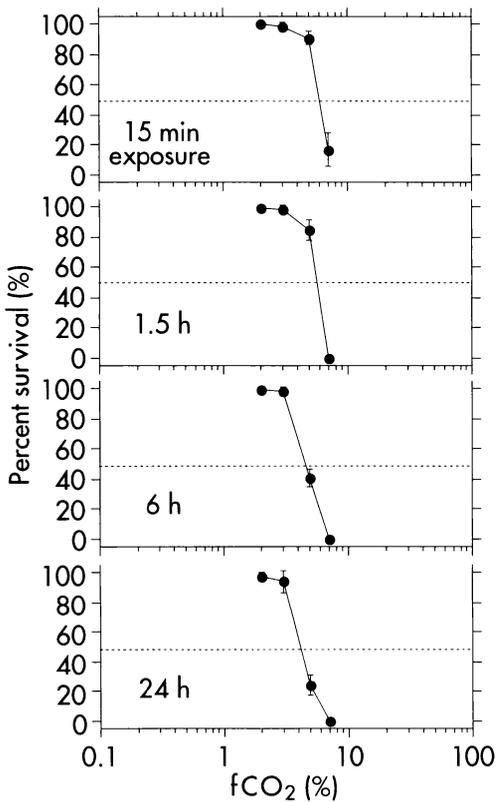


Fig. 9. Percent survival of postflexion larvae of *Pagrus major* under hypercapnia range of 2-7% for 15 min to 24 h exposure. Bars show SD ($N=4$).

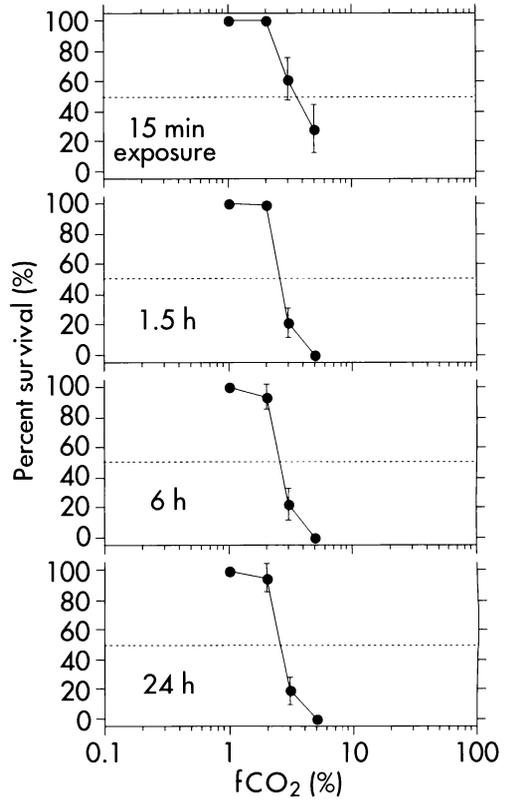


Fig. 10. Percent survival of juveniles of *Pagrus major* under hypercapnia range of 1-5% for 15 min to 24 h exposure. Bars show SD ($N=4$).

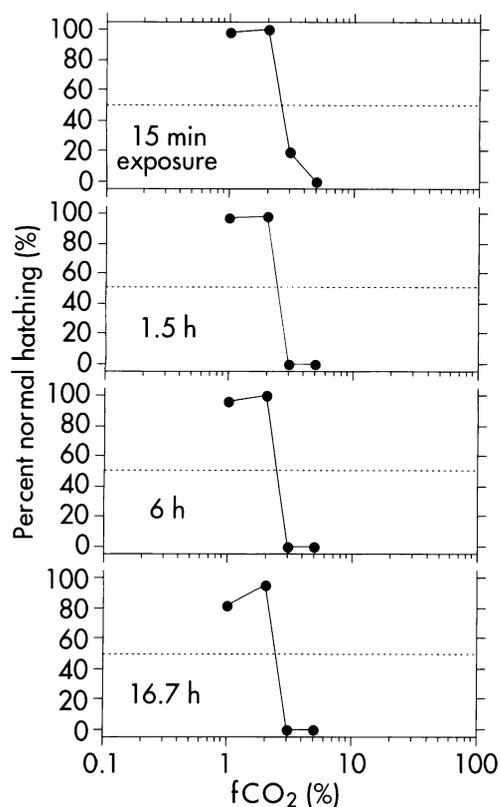


Fig. 11. Percentage of cleavage stage eggs of *Sillago japonica* hatching normally under hypercapnia range of 1-5% for 15 min to 16.7 h exposure ($N=2$).

ヒラメ卵割期の正常孵化率は、1% CO₂ に対して暴露時間にかかわらず82%以上であった。3% CO₂ 以上の濃度では正常孵化率は暴露時間の延長とともに急激に低下し、8% CO₂、暴露時間24時間以上では全く孵化が見られなかった (Fig. 17)。ヒラメ稚魚は卵割期よりも高い CO₂ 耐性を示し、3% CO₂、72時間暴露においても全個体が生残した。24時間以上の暴露では、5および7% CO₂ に対する生残率がそれぞれ50%および0%であった (Fig. 18)。

スマの卵割期は試験した他魚種と比較し、極めて高い CO₂ 耐性を有していた。正常孵化率は8% CO₂、24時間暴露に対しても90%以上であり、15% CO₂、24時間暴露に対してのみ、孵化率は0%を示した (Fig. 19)。

これらの結果から LC₅₀ (Median Lethal Concentration: 半数致死濃度) を JIS 工場排水試験方法 (K0102¹⁹⁹⁸) の「魚類による急性毒試験」に準拠し、以下の方法で算出した (Table. 7, 8)。CO₂ 濃度の場合は片対数方眼紙の対数目盛に CO₂ 濃度 (%) を、普通目盛に正常孵化あるいは

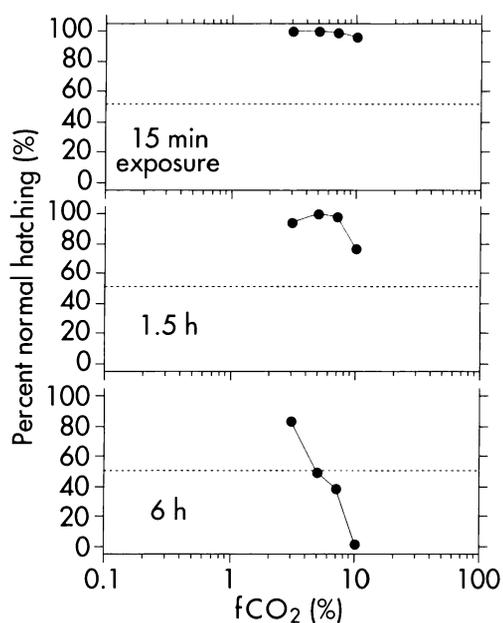


Fig. 12. Percentage of embryo stage eggs of *Sillago japonica* hatching normally under hypercapnia range of 3-10% for 15 min to 6 h exposure ($N=2$).

は生残率をとり、pHの場合はpHおよび正常孵化あるいは生残率をそれぞれ普通目盛にとって、観察された正常孵化あるいは生残率が50%より上のものと下のものとで最も50%に近いものを記入し、この両点を直線で結び、50%の線と交わる点に相当する CO₂ 濃度もしくはpHをそれぞれ LC₅₀ とした。マダイおよびシロギスにおける LC₅₀ の個体発生に伴う推移を fig. 20 (上段: 6時間暴露, 下段: 24時間暴露の値) に示した。

3) 考察

個体発生に伴う CO₂ 耐性の変化はマダイおよびシロギスで類似したパターンを示した。すなわち、LC₅₀ は前脊索屈曲期 (マダイ)、あるいはその1日後 (シロギス; 脊索屈曲期) に極大値を示し、その前後の発育ステージでは CO₂ 感受性が高い。これは6時間暴露の LC₅₀ において特に明瞭であり、マダイとシロギスが異なる生態的特徴を持つことから、一般的な傾向であると推察される (マダイ: 沿岸~大陸棚水域の遊泳種, シロギス: 沿岸底層遊泳種)。

淡水魚では一般的に、様々な毒性物質に対して最も感受性が高いステージは初期発育段階とされている (McKim, 1977)。生田ら (1992) は淡水魚種のヒメマス (*Oncorhynchus nerka*) を用いた

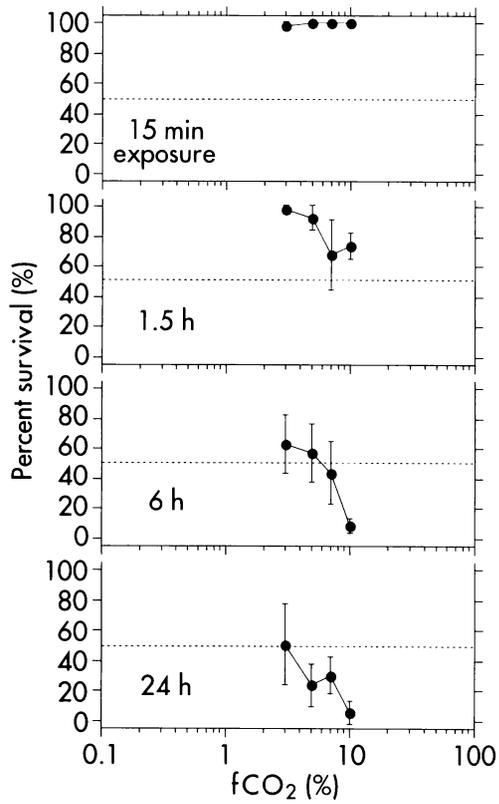


Fig. 13. Percent survival of preflexion larvae of *Sillago japonica* under hypercapnia range of 3-10% for 15 min to 24 h exposure. Bars show SD ($N=4$).

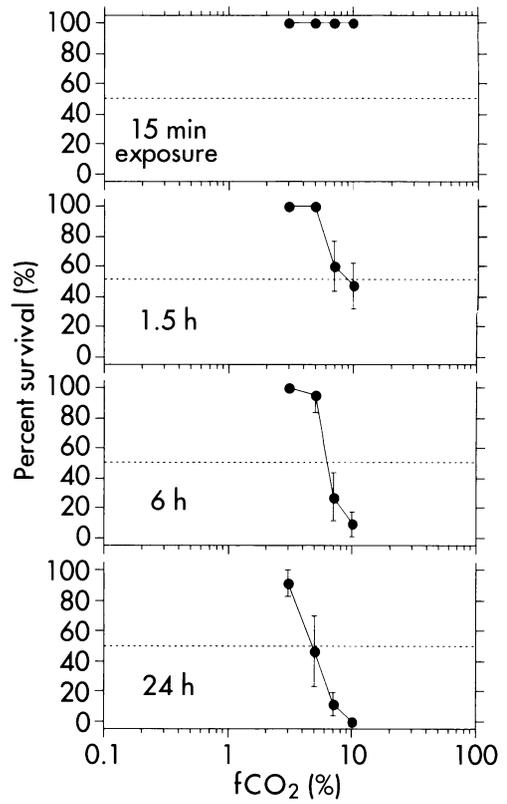


Fig. 14. Percent survival of flexion larvae of *Sillago japonica* under hypercapnia range of 3-10% for 15 min to 24 h exposure. Bars show SD ($N=4$).

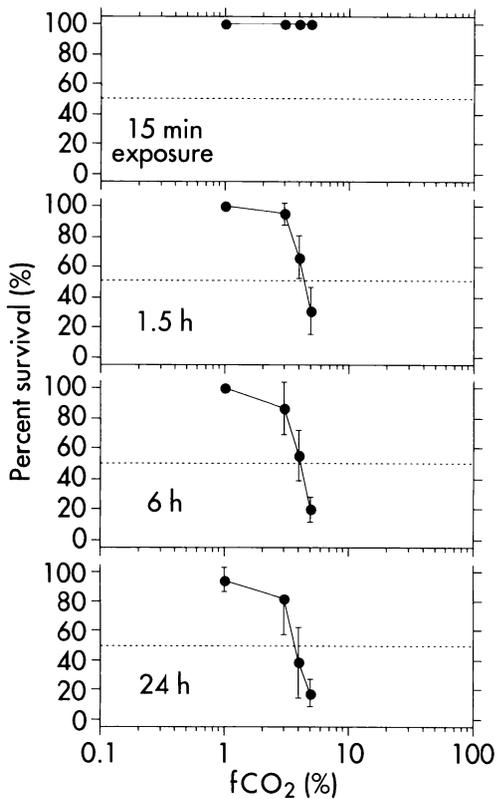


Fig. 15. Percent survival of postflexion larvae of *Sillago japonica* under hypercapnia range of 1-5% for 15 min to 24 h exposure. Bars show SD ($N=4$).

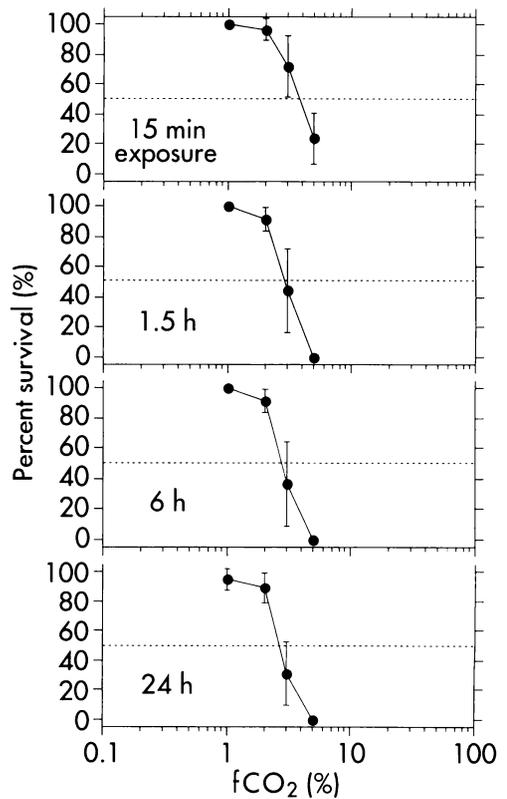


Fig. 16. Percent survival of juveniles of *Sillago japonica* under hypercapnia range of 1-5% for 15 min to 24 h exposure. Bars show SD ($N=4$).

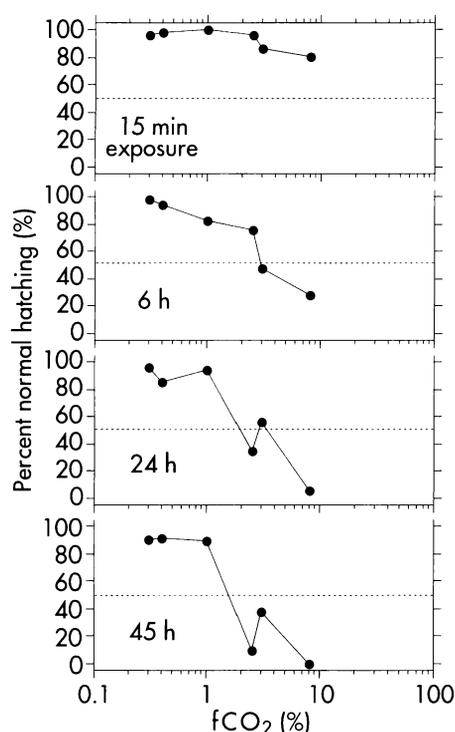


Fig. 17. Percentage of cleavage stage eggs of *Paralichthys olivaceus* hatching normally under hypercapnia range of 0.3-8% for 15 min to 45 h exposure ($N=2$).

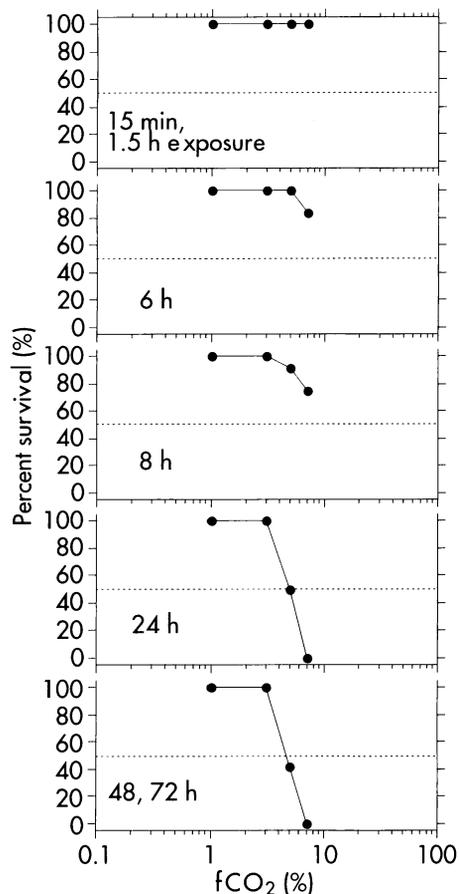


Fig. 18. Percent survival of juveniles of *Paralichthys olivaceus* under hypercapnia range of 1-7% for 15 min to 72 h exposure.

Table 7. Median lethal fCO_2 (LC_{50}) of four fish and three invertebrate* species

Species	Stage	LC_{50} ($CO_2\%$)							
		15min	1.5h	6h	16.7h	24h	45h	48h	72h
<i>Pagrus major</i>	Egg (cleavage)	2.23	1.37	1.4	—	1.33	—	—	—
	Egg (embryo)	> 10.00	8.47	5.13	—	—	—	—	—
	Larva (preflexion)	> 10.00	> 10.00	7.4	—	5.27	—	—	—
	Larva (flexion)	> 7.00	6.91	4.28	—	2.97	—	—	—
	Larva (postflexion)	6.02	5.74	4.6	—	4.13	—	—	—
	Juvenile	3.59	2.58	2.56	—	2.54	—	—	—
<i>Sillago japonica</i>	Egg (cleavage)	2.57	2.44	2.45	2.43	—	—	—	—
	Egg (embryo)	> 10.00	> 10.00	4.98	—	—	—	—	—
	Larva (preflexion)	> 10.00	> 10.00	6	—	3.04	—	—	—
	Larva (flexion)	> 10.00	9.29	6.26	—	4.82	—	—	—
	Larva (postflexion)	> 5.00	4.43	4.14	—	3.71	—	—	—
	Juvenile	3.79	2.86	2.72	—	2.63	—	—	—
<i>Paralichthys olivaceus</i>	Egg (cleavage)	> 8.00	2.95	2.74	—	2.84	2.3	—	—
	Juvenile	> 7.00	> 7.00	> 7.00	—	5	—	4.65	4.65
<i>Euthynnus affinis</i>	Egg (cleavage)	> 15.00	10.13	12.04	—	9.43	—	—	—
<i>Sepia lycidas</i> *	Juvenile	—	> 15.00	> 15.00	—	8.37	—	< 5.00	—
<i>Sepioteuthis lessoniana</i> *	Juvenile	—	> 10.00	> 10.00	—	5.87	—	3.84	—
<i>Penaus japonicus</i> *	Juvenile	—	> 15.00	> 15.00	—	> 15.00	—	> 15.00	14.26

* Kikkawa *et al.* (unpublished).

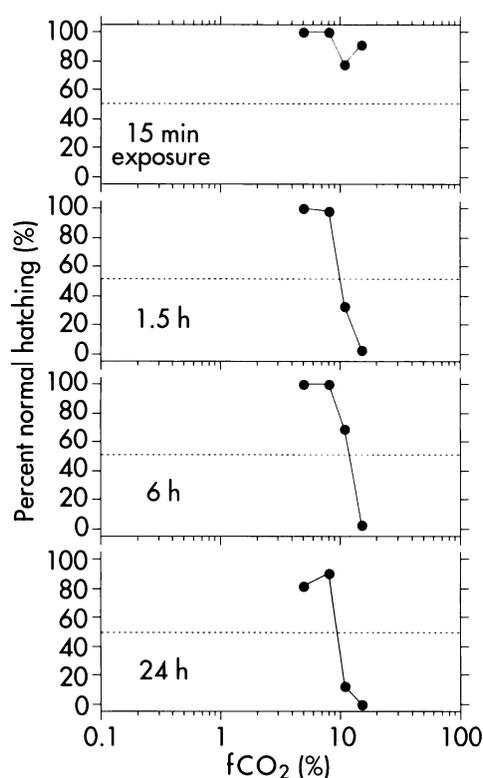


Fig. 19. Percentage of cleavage stage eggs of *Euthynnus affinis* hatching normally under hypercapnia range of 5-15% for 15 min to 24 h exposure ($N=2$).

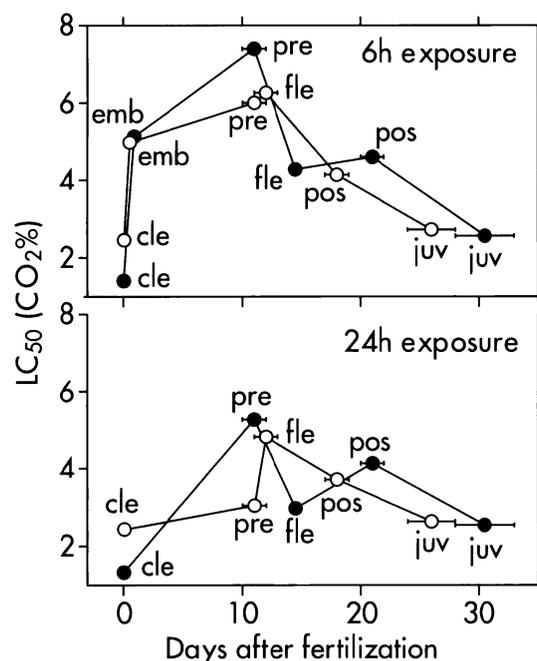


Fig. 20. Ontogenetic changes of the median lethal CO_2 (LC_{50}) in *Pagrus major* (solid circles) and *Sillago japonica* (open circles) in 6 and 24 h exposures. Horizontal bars show the range; cle: cleavage stage, emb: embryo stage, pre: preflexion stage, fle: flexion stage, pos: postflexion stage, juv: juvenile stage. Redrawn from Kikkawa *et al.* (2003).

Table 8. Median lethal pH (acidified by CO_2) of four fish and three invertebrate* species

Species	Stage	LC_{50} (pH)							
		15min	1.5h	6h	16.7h	24h	45h	48h	72h
<i>Pagrus major</i>	Egg (cleavage)	6.46	6.749	6.737	–	6.766	–	–	–
	Egg (embryo)	< 5.868	5.92	6.122	–	–	–	–	–
	Larva (preflexion)	< 5.843	< 5.843	5.989	–	6.124	–	–	–
	Larva (flexion)	< 6.018	6.023	6.194	–	6.277	–	–	–
	Larva (postflexion)	6.069	6.088	6.184	–	6.238	–	–	–
	Juvenile	6.291	6.425	6.43	–	6.434	–	–	–
<i>Sillago japonica</i>	Egg (cleavage)	6.47	6.493	6.491	6.496	–	–	–	–
	Egg (embryo)	< 5.878	< 5.878	6.19	–	–	–	–	–
	Larva (preflexion)	< 5.893	< 5.893	6.115	–	6.393	–	–	–
	Larva (flexion)	< 5.902	5.936	6.116	–	6.227	–	–	–
	Larva (postflexion)	< 6.199	6.276	6.319	–	6.368	–	–	–
	Juvenile	6.334	6.464	6.481	–	6.493	–	–	–
<i>Paralichthys olivaceus</i>	Egg (cleavage)	< 6.253	6.51	6.548	–	6.616	6.861	–	–
	Juvenile	< 5.983	< 5.983	< 5.983	–	6.132	–	6.158	6.158
<i>Euthynnus affinis</i>	Egg (cleavage)	< 5.981	6.334	6.195	–	6.378	–	–	–
<i>Sepia lycidas</i> *	Juvenile	–	< 5.70	< 5.70	–	5.95	–	> 6.18	–
<i>Sepioteuthis lessoniana</i> *	Juvenile	–	< 5.87	< 5.87	–	6.17	–	6.27	–
<i>Penaes japonicus</i> *	Juvenile	–	< 5.71	< 5.71	–	< 5.71	–	< 5.71	5.73

* Kikkawa *et al.* (unpublished).

初期発育段階における低pH耐性の個体発生に伴う変化を観察し、本研究とは逆の発育段階による耐性変化、すなわち孵化後に耐性が一旦低くなる結果を示した。海産魚では生活史を通じた毒性物質に対する感受性を研究した例は少ないが、McKim (1985) は海水馴致した *Cyprinodon variegates* (カダヤシ目魚の一種) における慢性毒性試験の結果を総括し、発生と毒性感受性間に本研究と類似の、発生初期および稚魚期以降の感受性が強い傾向を見出している。しかしながら生田ら (1992) およびMcKim (1985) が用いた初期発育ステージの分類は、本研究で準拠した海産魚において現在広く適用されているKendall *et al.* (1984) の分類法(沖山, 2001)とは異なり、仔魚期のサブステージ(前脊索屈曲期, 脊索屈曲期および後脊索屈曲期)が合一されている。小山ら (1992) は、海産魚7種についてカドミウムおよびフェニトロチオンに対する毒性試験を実施し、魚種および対象毒性物質により異なるものの、そのLC₅₀は発育に伴い増大する傾向にあることを示した。石橋ら (2003) はマダイ仔稚魚の発育に伴うストレス耐性の変化について本研究と同等の発育ステージ分類で実験を行い、脊索屈曲期における水温ストレスおよび塩分ストレスに対する感受性の増大を示した。この発育に伴う感受性の変化は本研究とは逆の結果である。このように、CO₂に対するLC₅₀の個体発生に伴う変化パターンは、これら既知の他物質に対する応答とは異なるものと思われる。

高CO₂による魚類の斃死機構は現在解明されていない。CO₂は生体膜透過性が高く容易に環境水から体内へ入り込み、H⁺の増加に伴い体内pHを低下させると考えられる(Vandenberg *et al.*, 1994)。この場合イオン輸送細胞である塩類細胞が、体内において過剰となった酸を排出し、体内pHの恒常性を維持していると考えられる(Claiborne *et al.*, 2002)。海産魚類の塩類細胞は高CO₂環境下で発達することが明らかになっており(本研究)、さらに塩類細胞は個体発生の過程で胚体期には既に存在し(Hwang and Hirano, 1985; Alderdice, 1988; Ayson *et al.*, 1994; Kaneko *et al.*, 1995; Shiraishi *et al.*, 1997; Sasai *et al.*, 1998; Katoh *et al.*, 2000等)、機能していると考えられる。このことは上記のCO₂耐性変化パターンにおいて孵化後急激に耐性が増大することを説明する有力な仮説の一つであると思われる。一方、

仔魚期から稚魚期にかけてのCO₂耐性の低下は、発生に伴う酸素要求量の増大と前脊索屈曲期にガス交換を担う鰓弁表面積が劇的に増大する(マダイ: Oikawa *et al.*, 1999; シロギス: Oozeki *et al.*, 1992) こと等に関連していると思われるが、詳細は明らかではない。魚類における様々な発育段階のCO₂耐性については知見が極めて限定的であるが、卵割期および稚魚期が最も感受性の高い発育段階であると考えられる。竹田・板沢 (1983) によると、マダイ未成魚はpCO₂=4.1~4.5kPa (≒4.1~4.5% CO₂)、22時間暴露に対して100%の生残率を示した。さらにHayashi *et al.* (2004) によると、ヒラメ成魚の高CO₂に対する48h-LC₅₀は4.47%と本研究におけるヒラメ稚魚とほぼ同等であるが、卵割期と比較すると耐性が高いと思われる。これらの結果から、高CO₂致死影響予測のための魚類実験を実施する場合、感受性の高い卵割期および稚魚期は初期発育段階の中でも試験対象として不可欠なステージであると言える。

一方、種間のCO₂感受性を比較した場合、スマの卵では非常に高いCO₂耐性を示した。今回実験に用いたスマの親魚水槽は循環濾過式であるため自然海水に比べて恒常的にpHが低く(測定時:pH7.4)、親魚が酸性環境に馴致することにより産出された卵も高いCO₂耐性を有していた可能性も考えられるが、詳細については今後の検討を要する。Hayashi *et al.* (2004) によると、スマと同様に高速遊泳能力の高いブリ(*Seriola quinqueradiata*)成魚とヒラメ成魚のCO₂耐性を比較すると、pH緩衝能力ではブリの方が上回るものの、毒性に関してはブリの方が低いCO₂濃度で斃死することが示されている(24h-LC₅₀:ブリ…3.46%, ヒラメ…> 5.00%)。逆にヨーロッパの海産スズキの一種(*Dicentrarchus labrax*)の48h-および72h-LC₅₀はともに約6.9% CO₂であり(Grøttum and Sigholt, 1996)、本研究におけるヒラメ稚魚およびHayashi *et al.* (2004)のヒラメ成魚の値(それぞれ48h-および72h-LC₅₀は4.65%および4.47%)を上回っている。本研究において得られた4魚種の24h-LC₅₀を、頭足類のカミナリイカ(*Sepia lycidas*)およびアオリイカ(*Sepioteuthis lessoniana*)および甲殻類のクルマエビ(*Penaeus japonicus*)の幼稚個体(吉川ら, 未発表)と併せて比較すると、上記事例のようにCO₂感受性は種間あるいは発育段階間で大きく

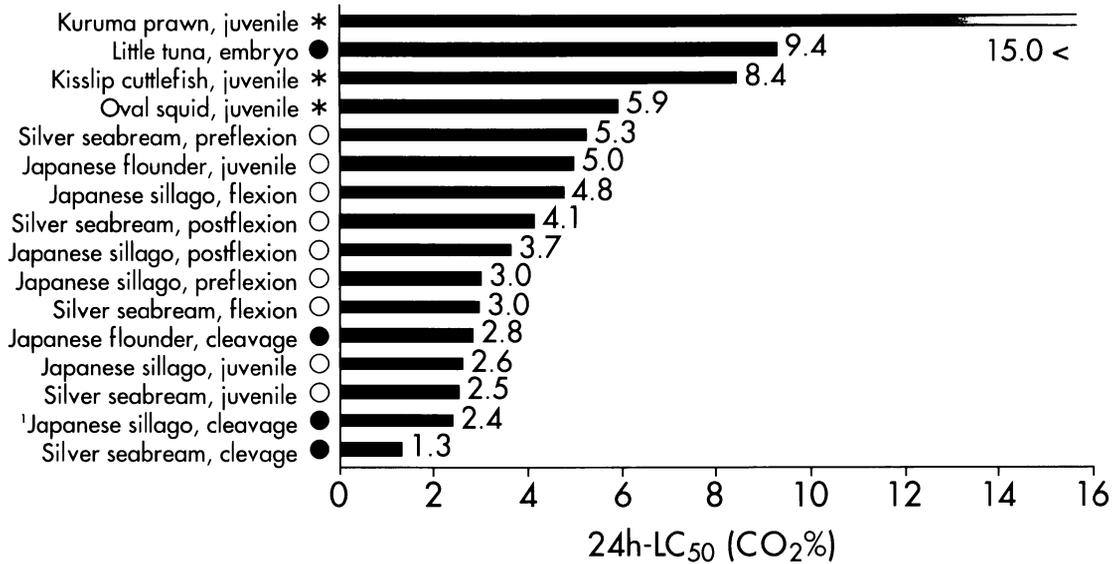


Fig. 21. Comparison of 24h-LC₅₀ under hypercapnia among four fish and three invertebrate species. Values show 24h-LC₅₀ (CO₂%). Asterisks: invertebrates (Kikkawa *et al.*, unpublished), solid circles: fish eggs, open circles: larvae and juveniles of fish. †: 16.7h-LC₅₀.

異なることがわかる (Fig. 21)。

Auerbach *et al.* (1997) が提示した低pH等死亡率曲線図に、本研究における4魚種のデータおよび上記の無脊椎動物3種のデータをプロットすると、比較的長時間の暴露において、LC₅₀値が等死亡率曲線に近づく、あるいはそれを上回っている(クルマエビおよびヒラメ稚魚72h-LC₅₀)ものの、24時間以下の暴露に対してはすべての点がLC₅₀の等死亡率曲線から大きく外れている (Fig. 22)。これは前項におけるCO₂および酸の毒性比較実験結果を裏付けるものであり、浅海動物のCO₂耐性が変異に富んでいるものの、強酸による低pH耐性とは全く異なるものであると理解できる。魚類のみについては、CO₂耐性は暴露時間が延長してもその傾きは等死亡率曲線よりも平坦であり、低pHに対する感受性に比べて暴露時間よりも暴露濃度そのものが重要となると思われる。毒性物質によっては単純に暴露濃度と暴露時間の積に応じて斃死がおこる場合もある(渡辺ら、未発表)が、CO₂ではそのような反応とは異なるメカニズムが働いており、高CO₂環境に暴露されても体内恒常性が維持可能な状態であれば生存し続けることができることを示唆する。CO₂耐性について今後更なる知見の収集が必要である。

3. 稚魚の成長におよぼす高CO₂影響

前項までは高CO₂による致死影響について検

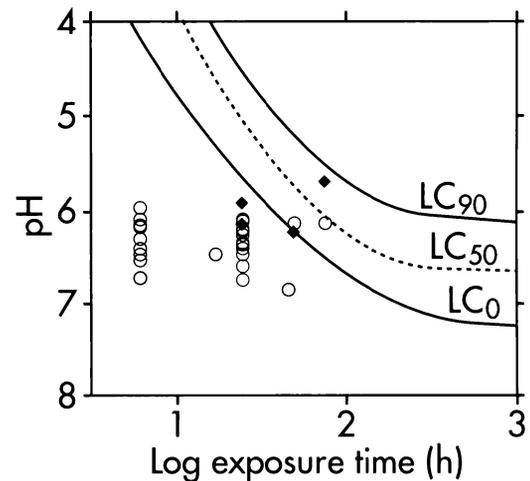


Fig. 22. LC₅₀ values obtained by the current study (open circles), and by Kikkawa *et al.* (solid diamonds: three invertebrate species, unpublished). The isomortality lines are given by Auerbach *et al.* (1997).

討を行った。ここでは高CO₂による垂致死影響を検討するため、成長試験を実施した。高CO₂が成長に与える影響に関して、Crocker and Cech (1996) は淡水魚であるチョウザメ (*Acipenser transmontanus*) 稚魚 (実験開始時の体重4g) の成長を28日間にわたって低CO₂区 (pCO₂=0.027kPa) と高CO₂区 (pCO₂=2.67kPa) で比較したところ、高CO₂区の成長が低CO₂区に比

Table 9. Initial size (mean \pm SD) and number of individuals (N) of juveniles for the growth tests

Species	Total length (mm)	Standard length (mm)	Wet body weight (g)	N
<i>Pagrus major</i>	64.05 \pm 4.51	51.62 \pm 3.82	4.39 \pm 1.00	50
<i>Sillago japonica</i>	69.17 \pm 6.91	60.70 \pm 5.84	2.57 \pm 0.78	30

べて38%低くなると報告している。同様に Smart *et al.* (1979) は平均体重20gのニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) を $p\text{CO}_2 = 2.27\text{kPa}$ で275日間に渡り暴露したところ、成長が抑制されたことを報告している。一方海産魚ではトラフグ (*Takifugu rubripes*) 幼魚を用いて、 $p\text{CO}_2 = 0.67\text{kPa}$ ($\approx 0.67\%$ CO_2) のガス曝気を7週間継続したところ、対照区との差を認めなかったとの報告(村上・石松, 未発表)があるに過ぎなかった。しかし近年になって、Fivelstad *et al.* (1998) が大西洋産サケ (*Salmon salar*) を水温15~16°C で $p\text{CO}_2 = 2.7\text{kPa}$ ($\approx 2.7\%$ CO_2) に43日間暴露した結果、成長の抑制および酸素消費量の低下を示し、また Foss *et al.* (2003) は冷水性海産魚の *Anarhichas minor* (オオカミウオ科魚の一種) 稚魚を水温6°C で2.2% CO_2 に10週間暴露し、有意な成長の抑制を観察している。本研究ではマダイおよびシロギスの稚魚を用いて高 CO_2 環境における成長を観察した。

1) 材料と方法

3段階の CO_2 濃度条件下で2000年にマダイ稚魚を30日間飼育し、摂餌量および成長を対照区と比較した。また翌2001年にはシロギス稚魚を用いて同様の条件下で154日間飼育を実施し、 CO_2 の成長への影響を観察した。

(1) 供試材料

両魚種ともに海生研において親魚の自然産卵により得た卵から種苗生産を行い、供試魚を得た。採卵はマダイが2000年7月4日に、シロギスは2001年7月12日にそれぞれ行った。種苗生産は高 CO_2 耐性試験と同様の手法で実施した。実験開始時における供試魚の大きさをTable. 9に示した。

(2) 成長影響試験方法

試験に用いた装置をFig. 23に示した。この装置は、ガス混合装置(東京理化学器械株式会社、ガス混合装置: GMU-1型)によって CO_2 とAirの混合ガスを曝気筒に連続送気し、一定濃度の CO_2 が

飽和した海水を試験水槽(1,000L容)へ供給する仕組みになっている。この装置を4系統用意し、そのうち3系統は CO_2 暴露区、1系統は対照区として使用した。

試験海水は砂濾過した自然海水を用い、流量は毎時500L(マダイ)もしくは300L(シロギス)とした。水温は25°Cに調節し、連続監視した。また暴露区海水のpHを小数点第2位精度で連続監視した(東京理化学器械株式会社、pHコントローラー: FC-2000, METTLER TOLEDO社、pH複合電極: 405-DPAS-SC-K8S/325)。また全水槽について、pHの連続監視とは別途、pHを小数点第2位精度で1日1回測定した(METTLER TOLEDO社、MP125・ポリマー型pH複合電極)。

装置準備の完了および水槽水温安定後、供試魚の選別を行った。麻酔はすべて2-フェノキシエタノールを用いた。供試魚は300ppm(マダイ)あるいは400ppm(シロギス)で麻酔し、全長(TL)、標準体長(SL)および湿重量(WBW)を測定した後、大きさが均等になるように4群に選別し、50個体(マダイ)あるいは30個体(シロギス)ずつ各水槽に収容した。供試魚はハンドリングによるストレスを減じるため、一昼夜水槽内で回復させた。

供試魚収容翌日、 CO_2 暴露を開始した。ガス混合比はTable. 10のように3段階に設定した。暴露 CO_2 濃度(%)の算出は、溶解度係数(Solubility coefficient: α) = $[\text{CO}_2] / p\text{CO}_2$, 第1解離定数(Dissociation constant: K'_1) = $[\text{H}^+][\text{HCO}_3^-] / [\text{CO}_2]$, 第2解離定数(Dissociation constant: K'_2) = $[\text{H}^+][\text{CO}_3^{2-}] / [\text{HCO}_3^-]$, $\text{pH} = -\log[\text{H}^+]$, およびアルカリ度が $[\text{HCO}_3^-] + 2[\text{CO}_3^{2-}]$ に近似することから、

$$\text{CO}_2 = \{ (10^{\text{pH}})^2 \cdot \text{アルカリ度} \cdot 100 \} / \{ \alpha \cdot K'_1 (2K'_2 + 10^{\text{pH}}) \}$$

として求めた。なお α , K'_1 および K'_2 は実測塩分および水温より求めた(Weiss, 1974; Mehrbach *et al.*, 1973)。

供試魚には配合飼料(日本農産工業株式会社、EPペレット: みさき2P)を1日2回、それぞれ

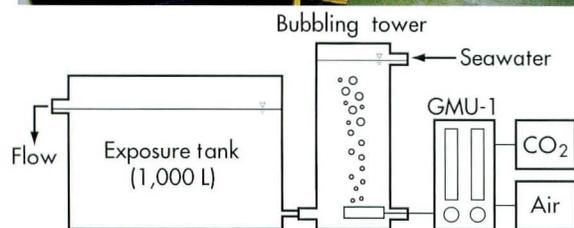


Fig. 23. Apparatus used for the growth test. Bubbling tower and gas blender (top), rearing tanks (middle) and schematic (bottom).

1時間以内に飽食する量を与え、マダイでは摂餌量を計測した。

マダイの成長 (TL, SLおよびWBW) 測定は暴露開始日から9, 16, 23および30日目に行った。成長測定時は海水の供給を一時中断し、水槽内で供試魚を麻酔 (200ppm) したのち25Lパンライト

Table 10. Experimental conditions in the growth tests

Species	fCO ₂ (%)	Air (mL/min)	CO ₂ (mL/min)	pH (mean ± SD)
<i>Pagrus major</i>	0.3	7,500	40	7.42±0.05
	0.6	4,500	60	7.16±0.02
	1.1	2,250	80	6.88±0.02
	Control	3,000	—	8.05±0.02
<i>Sillago japonica</i>	0.4	7,500	35	7.32±0.04
	0.7	4,500	52.5	7.04±0.04
	1.2	2,250	67.5	6.82±0.05
	Control	3,000	—	8.05±0.03

水槽 (300ppm麻酔) に取り上げた。測定が終了した供試個体はすみやかに各試験水槽へ収容した。

シロギスの成長測定は35, 64, 92, 126および154日目に実施した。マダイと同様の手法で、水槽内で供試魚を麻酔 (250ppm) したのち25Lパンライト水槽 (200ppm麻酔) に取り上げた。シロギスでは測定時に麻酔から覚醒する個体があったため、測定直前に400ppmで再度麻酔し、測定終了後すみやかに各試験水槽へ収容した。

2) 結果

マダイ稚魚の摂餌量は CO₂ 暴露による影響が認められなかった (Fig. 24, $P > 0.05$: ANCOVA)。同様に成長への影響も見られなかった (Fig. 25)。一方、シロギスでは暴露後126日目および154日目における暴露区の成長を対照区と比較すると、0.4%および1.2% CO₂ 区のTL, SLおよびBW値が対照区に比べて有意に低い結果となった (Fig. 26 およびTable. 11, $P < 0.01$: Dunnett test)。

3) 考察

マダイ稚魚における約1ヶ月間の暴露試験で、約1%以下のCO₂濃度環境下では生理機能を正常に維持するために余分のエネルギーを必要とせず、対照区同様に成長できることが示された。しかしながらシロギス稚魚を用いた約5ヶ月間の高CO₂暴露試験結果より、高CO₂への暴露が長期間になれば、亜致死濃度のCO₂であっても個体の成長を抑制することが示唆された。

このような高CO₂環境下における成長の抑制は、飼育水のpH低下によるものではなくCO₂の増大によって引き起こされるとされる (Crocker and Cech, 1996; Foss *et al.*, 2003)。またSmart *et al.* (1979) はニジマスの高CO₂暴露により腎

Table 11. Mean (\pm SD) total length (TL), standard length (SL), wet body weight (WBW) and number of individuals (N) of 126- and 154-day exposure in the growth test of *Sillago japonica*

Exposure duration (day)	fCO ₂ (%)	TL (mm)	SL (mm)	WBW (g)	N
126	Control	144.8 \pm 9.1	127.6 \pm 8.3	26.7 \pm 6.1	27
	0.4	137.6 \pm 5.4*	121.5 \pm 4.9*	21.9 \pm 3.0*	26
	0.7	142.4 \pm 7.0	125.1 \pm 6.6	24.8 \pm 4.4	23
	1.2	137.0 \pm 5.9*	120.7 \pm 5.4*	20.8 \pm 3.6*	29
154	Control	159.2 \pm 10.1	139.7 \pm 9.4	33.4 \pm 7.4	27
	0.4	148.9 \pm 5.2*	131.4 \pm 4.7*	26.1 \pm 3.1*	23
	0.7	153.9 \pm 9.5	135.3 \pm 8.9	29.5 \pm 5.6	23
	1.2	150.4 \pm 7.0*	131.5 \pm 6.2*	26.0 \pm 4.3*	29

Asterisks show a significant difference from the control group ($P < 0.01$, Dunnett test).

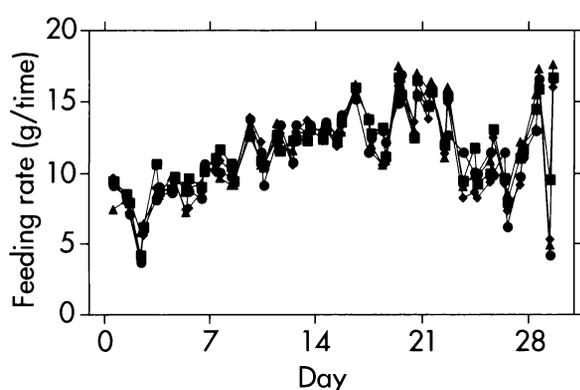


Fig. 24. Changes of feeding rates of juveniles of *Pagrus major*. Solid squares: 0.3% CO₂, solid diamonds: 0.6% CO₂, solid circles: 1.1% CO₂, solid triangles: control.

石灰症が頻発し、腎臓のCa, Mg, P濃度の顕著な上昇を示すことを報告しており、*A. minor*においても約0.7~2.2% CO₂の10週間暴露により腎石灰症の発症が確認されている (Foss *et al.*, 2003)。一方、大西洋産サケでは成長の抑制がみられた約2.7% CO₂、43日間の暴露において腎石灰症は確認されなかった (Fivelstad *et al.*, 1998)。Fivelstad *et al.* (1998) は、高CO₂環境における成長の抑制および酸素消費速度の低下は、摂餌量の低下、すなわち栄養素の特異動的作用 (specific dynamics action, SDA: 栄養素を代謝するのに必要な酸素消費量の増加) の低下と関連があるとしている。Foss *et al.* (2003) も同様に摂餌量の低下を観察している。これらの知見から本研究における成長抑制結果も摂餌量の低下が関係していると推察されるが、成長の抑制が観察されたシロギス稚魚の試験では摂餌量の観察を行っていない。一方、他動物群について高CO₂環境がおよぼ

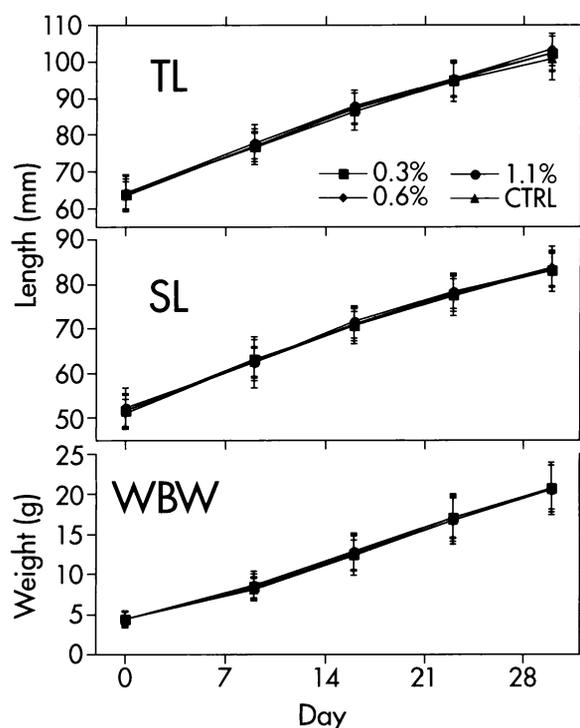


Fig. 25. Changes of total length (TL), standard length (SL) and wet body weight (WBW) of *Pagrus major*. Bars show SD ($n=50$, initially). Solid squares: 0.3% CO₂, solid diamonds: 0.6% CO₂, solid circles: 1.1% CO₂, solid triangles: control.

す成長影響の事例として、空気に200ppmのCO₂を添加して棘皮動物のバフウニ (*Hemicentrosus pulcherrimus*), ナガウニ (*Echinometra mathaei*) および軟体動物のマガキガイ (*Strombus luhuanus*) を6ヶ月間飼育した結果、成長が阻害された報告がある (白山・ソントン, 2001)。この報告で成長阻害の観察されたCO₂濃度ではおそらく魚類の成長には影響がないと考えられる。

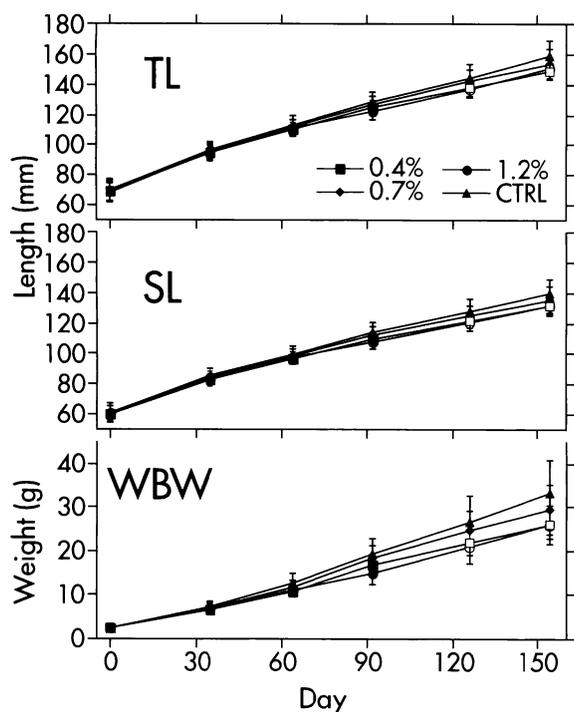


Fig. 26. Changes of total length (TL), standard length (SL) and wet body weight (WBW) of *Sillago japonica*. Bars show SD ($n=30$, initially). Solid squares: 0.4% CO₂, solid diamonds: 0.7% CO₂, solid circles: 1.2% CO₂, solid triangles: control. Open symbols show a significant difference with the control ($P<0.01$, Dunnett test).

しかしながらこのことは現在の大気中 CO₂ 濃度上昇に対して何も策を講じない場合、ごくわずかな CO₂ 濃度上昇によっても浅海の生態系に重大な影響をおよぼす可能性を強く示唆している。

4. 定常 CO₂ 暴露実験法を利用した非定常 CO₂ 暴露実験法の検討

CO₂ 海洋隔離を行った場合の想定海域の CO₂ 濃度は非定常状態となることが予期される。ここでは定常 CO₂ 暴露実験法を応用して非定常 CO₂ 状態を作り、致死影響の予備的検討を行った。

1) 材料と方法

シロギス稚魚を用いて、5% CO₂ に3時間暴露(定常 CO₂ 暴露)した時の死亡率の経時変化と、5% CO₂ に3時間暴露する前に1% CO₂ に3時間暴露した場合(2段階の非定常 CO₂ 暴露)の死亡率の経時変化を比較した。

(1) 供試材料

海生研において2003年9月2日に採卵し水温26

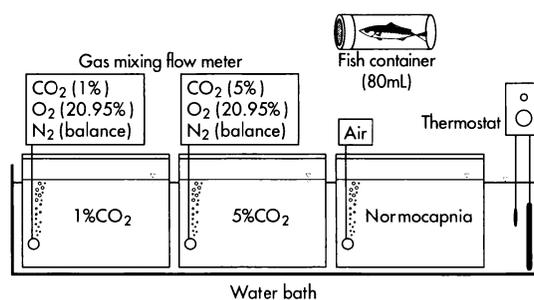


Fig. 27. Apparatus and fish container used in the fluctuating CO₂ exposure tests. PVC bath (100 L) is used to standardize the temperature for the three PVC tanks (14 L) of 1 and 5% CO₂ group, and normal seawater.

℃で種苗生産したシロギス稚魚(孵化後56~70日目)を用いた。実験時における供試魚のTL(平均値±SD)は36.95±6.64mm, WBWは0.347±0.200gであった。

(2) 試験装置

試験に用いた装置はFig. 27に示した。高 CO₂ および酸性水の毒性比較試験に用いた装置を利用している。1% CO₂ 区水槽, 5%区 CO₂ 水槽および自然海水区水槽からなる。定常5% CO₂ 暴露は5%区 CO₂ 水槽を用いて行い, 非定常 CO₂ 暴露は1%および5% CO₂ 区の両水槽を用いて行った。供試魚はFig. 27に示したように, 1つの容器に1個体ずつ收容した(定常 CO₂ 暴露試験における卵收容器と同一)。試験水温は26℃とした。

(3) 定常 CO₂ 暴露試験方法

飼育水槽から正常に遊泳しているシロギス稚魚を, タモ網を用いて取り上げ, ハンドリングのストレスを減じるため約1時間曝気しながら試験温度に設定した恒温水槽内に静置した。その後, 1個体ずつ收容器に收容し, 自然海水区水槽内に横置きに静置した。20個体の收容が完了した時点で, 20個すべての收容器を自然海水区水槽から5% CO₂ 区水槽に移して3時間暴露した。供試個体の生死確認は暴露開始から15分間, 1.5時間および3時間目に行った。斃死した個体は随時水槽から收容器ごと取り除いた。観察時における死亡率は次式により算出した。

$$\text{死亡率 (\%)} = \frac{\text{死亡個体数}}{\text{供試個体数}} \times 100$$

なお、ここでは呼吸による鰓蓋活動を停止した個体を死亡個体とみなした。

(4) 非定常 CO₂ 暴露試験方法

上記定常 CO₂ 暴露試験方法と同様に、シロギス稚魚を収容器に収容し、自然海水区水槽内に横置きに静置した。20個体の収容が完了した時点で、20個すべての収容器を自然海水区水槽から 1% CO₂ 区水槽に移して 3 時間暴露した。1% CO₂ 暴露開始から 15 分間、1.5 時間および 3 時間目に供試個体の生死確認を行った。3 時間経過後、供試個体を収容器ごと 5% CO₂ 区水槽に移してさらに 3 時間暴露した。5% CO₂ 暴露時も 1% CO₂ 暴露時と同様に生死確認を行った。なお、自然海水区には 20 個体の供試魚を収容し、非定常 CO₂ 暴露が終了するまで静置した（合計 6 時間）。死亡率の算出は定常 CO₂ 暴露試験と同様に実施した。

2) 結果および考察

自然海水区では全供試個体が生残した。定常 5% CO₂ 暴露の死亡率は暴露開始から 15 分間で 85%（17 個体斃死）となり、1.5 時間および 3 時間目では 95%（19 個体斃死）となった。一方、非定常 CO₂ 暴露に対しては、1% および 5% CO₂ 暴露のいずれに対しても全供試個体が生残した（Fig. 28）。

非定常 CO₂ 暴露で斃死がみられなかった理由として、初めの 1% CO₂ 暴露時にシロギス稚魚の体内で HCO₃⁻ 濃度が上昇し、5% CO₂ に暴露された時はすでにある程度、体内の pH 緩衝レベルが高い状態にあったことが考えられる。このように同じ 5% CO₂ 暴露でも、定常と非定常の CO₂ 暴露方法では結果が大きく異なり、このような現象は定常 CO₂ 暴露実験結果では説明できない。よって定常 CO₂ 暴露試験による生物影響調査のみでは精確な生物影響予測は困難であるといえる。

CO₂ の海洋隔離によって CO₂ が深海へ放出された場合、現場の CO₂ 濃度は時空間的に非定常な変化を伴う。このような環境に生物が暴露されることを想定した場合、本研究における結果で示されたように、より現場条件に即した実験、すなわち予測される濃度変化に対応した非定常 CO₂ 暴露による生物影響試験が必須である。ここで問題となるのは、非定常 CO₂ を再現する場合、暴

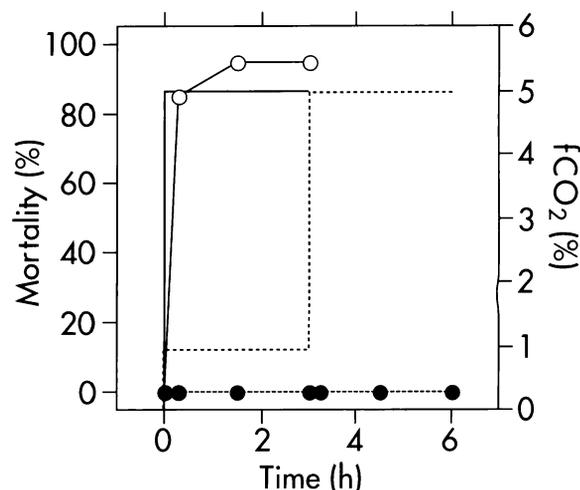


Fig. 28. Comparison of mortalities between constant and fluctuating exposure in juveniles of *Sillago japonica* ($n=20$). Open circles: constant 5% CO₂ exposure for 3 h, solid circles: 5% CO₂ exposure for 3 h after 3 h pre-exposure to 1% CO₂, solid line: CO₂ concentration in constant exposure, dotted line: CO₂ concentration in fluctuating exposure.

露時間および CO₂ 濃度の設定が無限に存在することである。当面はいくつかの非定常状態に対する生物死亡率をパラメータ化し、死亡率をシミュレートするモデルを構築することを目標に研究を進めることを提案する。

このように、定常 CO₂ 暴露に対する致死影響および亜致死影響に加え、非定常 CO₂ 暴露実験を行うことにより、CO₂ の海洋隔離に伴う生物影響をより精確に予測・評価し、これらの結果を CO₂ 海洋隔離の技術開発にフィードバックさせる必要がある。その上で、環境への影響を最小限に抑えた CO₂ 海洋隔離技術の開発が行われるべきであろう。

高 CO₂ 環境が塩類細胞におよぼす形態学的影響

CO₂ 海洋隔離の実施が検討されているのは深海である。CO₂ 濃度の増大が深海生物へおよぼす影響を明らかにするためには深海生物の供試材料入手が必須である。しかしながら深海生物を室内実験に用いることは現実的には困難が伴うことから、浅海生物を用いた実験から影響を推定する方法を検討することが、問題解決策の一つであるといえる。ここでは CO₂ が塩類細胞に及ぼす形態学的影響を観察することで、外部形態と CO₂

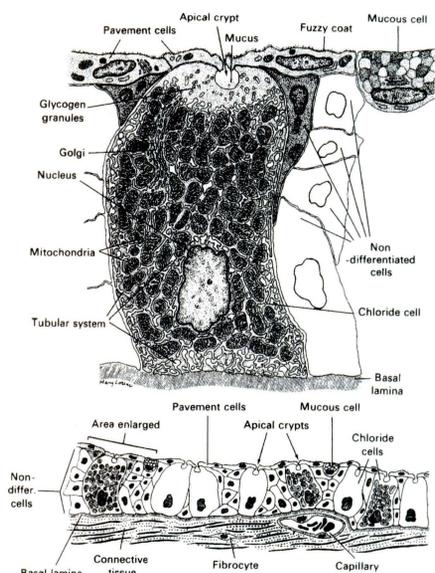


Fig. 29. Schematic representation of the ultrastructural details of the opercular epithelium of *Fundulus heteroclitus* showing the mitochondria-rich chloride cells, which are identical to the ones found in the fish gills. The epithelial cells transport chloride ions toward the external (seawater) side. (From Degnan *et al.*, 1977.)

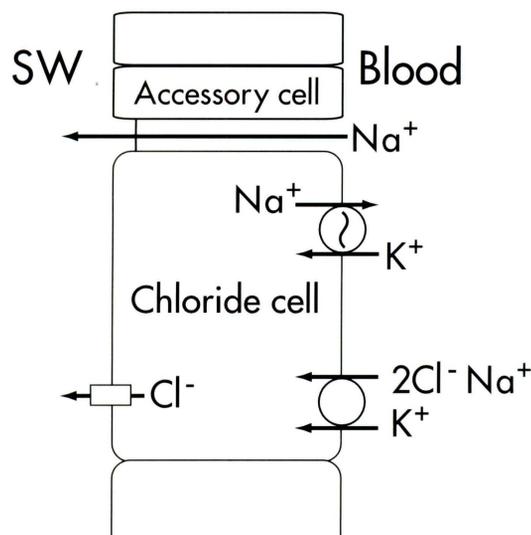


Fig. 30. A schematic model of the ion movement in a chloride cell of seawater fish. Basolateral Na^+/K^+ -ATPase generates an electrochemical gradient for Na^+ , which provides the driving force for Na^+ , K^+ , 2Cl^- transport into the cytoplasm across the basolateral membrane. Na^+ is recycled via Na/K change. Intracellular Cl^- exits the cell via apical Cl^- channels, providing the electrical gradient that drives Na^+ into the lumen across leaky, paracellular junctions.

影響との相関を明らかにし、形態学的観察から深海生物の CO_2 影響を予測する手法について検討した。

塩類細胞は様々なイオン環境への適応に役立っており、特に浸透圧調節に関する研究でよく調べられている (Fig. 29)。海産魚では、浸透圧勾配により脱水が起こるため、これを防ぐ目的で海水を飲んで水を吸収するとともに、塩類細胞から過剰な Na^+ と Cl^- が能動的に排出される (Fig. 30)。塩類細胞は成魚では鰓に存在するが、鰓の発達していない卵期や仔魚期では卵黄囊上皮や体表に塩類細胞が存在し、浸透圧調節に関わっていることが報告されている (金子, 1997 ; Katoh *et al.*, 2000)。また、塩類細胞にはイオン輸送タンパクである Na^+/K^+ -ATPase が局在するため、この抗体を用いることで塩類細胞を特異的に検出することが出来る (Ura *et al.*, 1996)。ここでは魚類初期发育段階における CO_2 影響メカニズムを明らかにするため、シロギス卵、クロマグロ (*Thunnus thynnus*) 卵仔魚、マダイ稚魚および未成魚を用いて高 CO_2 環境下における塩類細胞反応の形態学的観察を実施した。

1. 観察方法の確立

ここではシロギス卵を用いて高 CO_2 環境における塩類細胞の形態学的反応について予備的観察を行った。

1) 材料と方法

(1) 供試材料

試験には高 CO_2 暴露したシロギス卵を用いた。海生研において親魚水槽の水温を 26°C 、日長を 15 L に調節して親魚を催熟させ、自然産卵により供試卵を得た。供試卵の大きさ (平均値 \pm SD) は卵径 $0.66 \pm 0.01\text{mm}$ 、油球径 $0.15 \pm 0.01\text{mm}$ であった。高 CO_2 暴露には、定常 CO_2 暴露試験で使用したフィルターで濾過した自然海水 (塩分 34.72) を用い、水温は 26°C に設定した。高 CO_2 区水槽には 1% CO_2 を送気し、選別した卵を高 CO_2 区および対照区の卵収容器にそれぞれ 20 個ずつ収容した。暴露開始から 20 時間後に卵を 4% パラホルムアルデヒド (PFA, 0.1M リン酸緩衝液 (PB) で pH 7.4 に調整) により 4°C で 25 時間固定し、その後固定液を 70% エタノールに置換して試料を 4°C で保存した。暴露終了時における卵の发育段階は孵化準備期であった。

(2) 塩類細胞観察方法

高 CO₂ 暴露した卵の塩類細胞断面積を, Hiroi *et al.* (1999) の免疫染色法に準拠して下記の方法で対照区と比較した。

試料は0.2Mリン酸ナトリウム緩衝液 (PBS) を満たしたホールスライドガラス上でピンセットを用いて卵殻を剥離してPBSで洗浄した後, 0.05% Triton X-100および0.01% NaN₃ を含むPBSに浸漬し, PBS (Triton X-100およびNaN₃ 含有) を1回交換した。次に試料を, T-PBS (0.05% Triton X-100, 10% ブロッキング用正常ヤギ血清 (NGS), 0.1% bovine albumin (BSA), 0.01% NaN₃ および0.02% hemocyanin from keyhole limpets (KLH) を含むPBS) で500倍希釈した FITC (fluorescein isothiocyanate, 蛍光色素) で標識した Na⁺/K⁺-ATPase 抗体 (Ura *et al.*, 1996) に浸漬し, 室温下で遮光して30分間放置した後冷蔵庫内で一昼夜おくことにより, 試料に蛍光染色を施した。染色した試料はPBSで洗浄し, 退色防止剤 (Molecular Probe社, Slow Fade Light Kit) に浸漬した。特殊スライドガラス (スライドガラスの中央部にビニルテープを2枚重ねて貼り, その中心部をカッターナイフで切り取り, マウントホールを作成したもの) 中に退色防止剤を満たして試料を1個マウントし, カバーガラスを乗せて共焦点レーザー顕微鏡 (Zeiss社, LSM: LSM310) で観察を行った。レーザースキャンにより卵黄囊上皮を観察した試料画像は 1,024 × 1,024 pixel サイズの tiff ファイル形式で保存し, Apple 社 Macintosh コンピュータの画像解析ソフト, NIH image ver 1.61 (フリーウェア, <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>) を用いて塩類細胞の断面積を計測し, CO₂ 暴露区と対照区間で比較した。観察に供した卵数は CO₂ 暴露区および対照区それぞれ2個ずつとした。

2) 結果および考察

塩類細胞は卵黄囊上皮上および胚体表面に分布しており (Fig. 31), 計測したすべての塩類細胞断面積の平均値は CO₂ 暴露区が 399.5 ± 104.3 μm² (2個体で58細胞), 対照区が 219.0 ± 79.0 μm² (2個体で79細胞) であり, 82.4% の増加が見られた (Fig. 32)。CO₂ 区の塩類細胞の中には2つの塩類細胞が密に接し, 複合体を形成する途中と思われる細胞も見られた。塩類細胞は活発にイオン輸

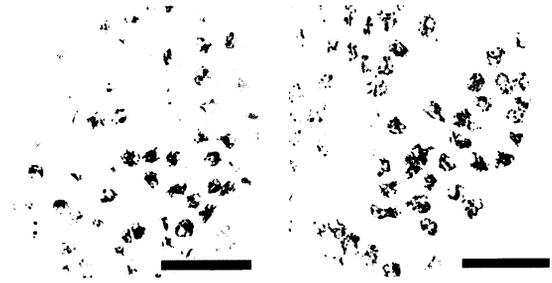


Fig. 31. Confocal laser scanning micrographs of the whole-mount preparation of the yolk-sac membrane of embryos of *Sillago japonica* under hypercapnia (right, 1% CO₂ for 21h exposure) and normocapnia (left), stained with FITC-labeled anti-Na⁺/K⁺-ATPase. Scales: 100 μm.

送を行うときその細胞断面積が増大することが知られている (Sasai *et al.*, 1998)。この観察法により高 CO₂ 環境に対する海産魚の塩類細胞反応が観察でき, またシロギス卵期においても塩類細胞によってイオンを能動的に体内外へ輸送することで, 高 CO₂ 環境へ適応する能力を有する可能性が示唆された。

2. 種間 CO₂ 耐性変異解明のための予備的検討

前述の通り, 高速遊泳魚種であるスマの卵は他魚種 (ヒラメ, シロギスおよびマダイ) と比較して非常に高い CO₂ 耐性を有していた。このような種間の CO₂ 耐性変異を明らかにすることは, 入手が困難な深海魚種の CO₂ 耐性を推測するために重要となる。スマと同科魚種であるクロマグロの卵および仔魚を用いて塩類細胞の観察を行い, 種間の CO₂ 耐性変異を解明するための予備知見を得ることを目的とした。

1) 材料と方法

(1) 供試材料

クロマグロの卵は2000年9月23日, (社) 日本栽培漁業協会奄美事業場 (現: 独立行政法人水産総合研究センター奄美栽培漁業センター) で飼育している親魚 (7歳魚) の自然産卵により得た。濾過海水を満たした300mL ビーカ4個にそれぞれ約100個の受精卵を収容し, 26°C下で養成した。正常に原口閉鎖期 (受精後約11時間) に成長した卵を4% PFAにより4°Cで24時間固定したのち, 70% エタノールに置換して保存した。また孵化直後の仔魚 (卵黄仔魚: 受精後約26.5時間) も同様に固定・保存した。

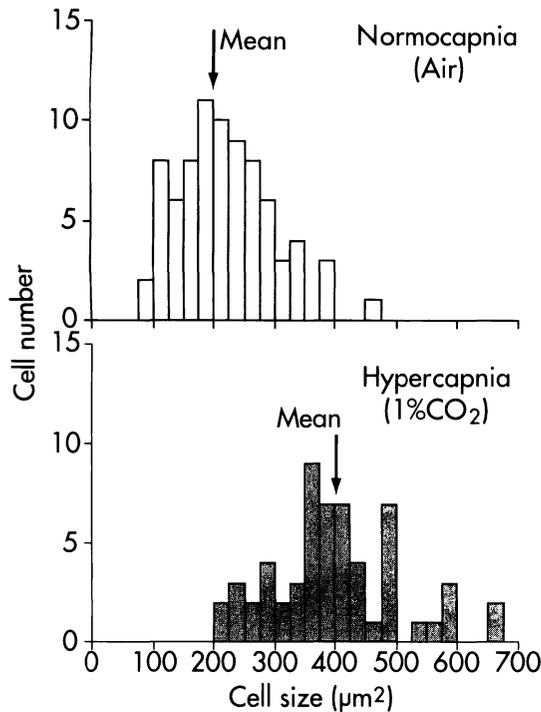


Fig. 32. Comparison of chloride cell size in yolk-sac membrane of embryos of *Sillago japonica* between normocapnia (top) and hypercapnia (bottom, 1% CO₂ for 21h exposure) ($n=2$). Arrows indicate the means of cell size.

(2) 卵および仔魚の塩類細胞観察方法

卵黄囊膜および体表上に分布する塩類細胞を免疫染色により検出して観察した。70%エタノールで保存しているクロマグロ卵を蒸留水で洗浄したのち、0.9%NaClを加えた0.01M PB (0.01M PBS)を満たしたホールスライドグラスにマウントし、ピンセットを用いて卵殻を剥離して卵黄囊膜および胚体を摘出した。卵黄囊内の卵黄は除去した。胚体および卵黄囊膜は0.01M PBSで洗浄したのち、以下の方法で塩類細胞の免疫染色を行った（間接法による蛍光抗体法）。試料をPCRチューブ（1.5mL）内で、T-PBSで1,500倍希釈したNa⁺/K⁺-ATPase抗体（Ura *et al.*, 1996）（第一抗体）に浸漬し、室温下でチューブローテーターを用いて1時間振盪させたのち、冷蔵庫内で一昼夜静置して第一抗体と反応させた。次に第一抗体を0.01M PBSで洗浄・除去（30分×2回）し、T-PBSで1,500倍希釈したAlexa Fluor 488を標識した第二抗体（Molecular Probes社、Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG(H+L) conjugate, highly cross-adsorbed, 2mg/mL: A-11034）に浸漬し、アルミホイルで遮光したまま第一抗体反応作業と同手順

で反応させた。免疫染色終了後、第二抗体を0.01M PBSで洗浄・除去（30分×2回）し、0.01M PBSで20倍希釈した核酸染色剤（Molecular Probes社、Propidium Iodide Nucleic Acid Stain, 1mg/mL solution in water: P-3566）に試料を室温下で30分間浸漬し、細胞核を染色した。染色後、核酸染色剤を0.01M PBSで洗浄・除去（30分×2回）した。卵黄仔魚は全載標本の観察を行った。染色作業は卵と同様に実施した。

卵の観察試料は0.01M PBSを用いてスライドグラスにマウントし、仔魚の観察試料は特殊スライドグラスにマウントした。試料は共焦点レーザー顕微鏡（OLYMPUS社、Fluoview : FV 500）で観察し、観察画像はTiff形式ファイルで保存した。

2) 結果および考察

クロマグロ原口閉鎖期の卵では塩類細胞が検出できず、レーザーสキャンに対する蛍光色素の反応が得られなかった。よって塩類細胞が分化するのは原口閉鎖期以降のステージであると思われる。一方、卵黄仔魚では卵黄囊膜から頭部側の体表にかけて多数の塩類細胞が分布していた（Fig. 33, A）。マダイ、シロギス、ヒラメおよびハマクマノミ（*Amphiprion frenatus*）における卵黄仔魚の塩類細胞と比較すると、クロマグロでは1個体あたりの塩類細胞分布密度が極めて高いと思われた（Fig. 33）。以上の結果から、魚種により塩類細胞の密度は異なっている可能性が高く、また塩類細胞は高CO₂耐性の指標として用いることが出来る可能性があると考えられる。

3. 短期CO₂暴露に対する塩類細胞反応

卵に関する予備的観察により、亜致死レベルの高CO₂環境下では塩類細胞の働きによって体内のpH恒常性を維持している可能性が示唆された。ここではマダイ仔稚魚を用いて短期間（24時間）のCO₂暴露に対する塩類細胞の反応を観察した。

1) 材料と方法

(1) 供試材料

マダイの前脊索屈曲期仔魚および稚魚を用いた。海生研において親魚の自然産卵によって得た受精卵を水温20℃、自然日長で養成し、前脊索屈曲期（孵化後10日目）および稚魚期まで成長した個体（孵化後32日目）を試験に供した。実験開始時に

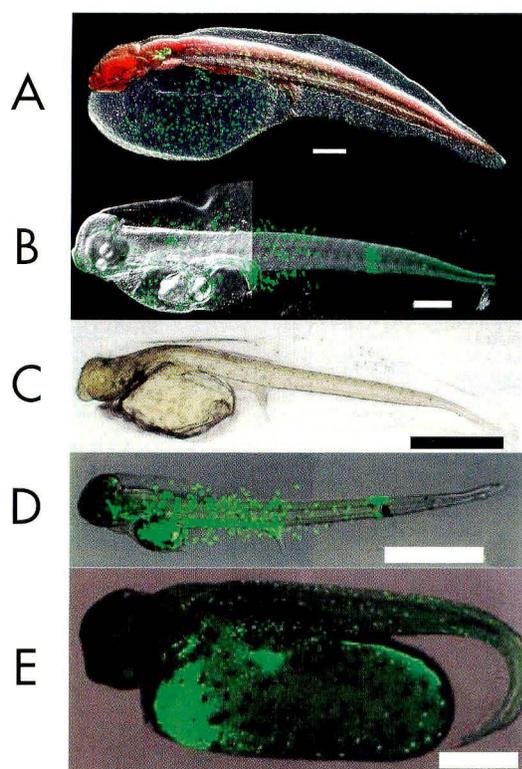


Fig. 33. Chloride cells in the yolk-sac membrane and body skin of yolk-sac larvae in five marine fishes stained with anti- Na^+/K^+ -ATPase. A: *Thunnus thynnus* (scale: 100 μm), B: *Pagrus major* (scale: 500 μm , Kikkawa *et al.*, unpublished), C: *Paralichthys olivaceus* (scale: 500 μm , Hiroi *et al.*, 1998), D: *Sillago japonica* (scale: 500 μm , Kikkawa *et al.*, unpublished), E: *Amphiprion frenatus* (scale: 500 μm , Kikkawa *et al.*, unpublished).

おける供試魚のTL (平均値 \pm SD) は前脊索屈曲期が $4.77 \pm 0.46\text{mm}$, 稚魚が $14.83 \pm 1.57\text{mm}$, BW は前脊索屈曲期が 0.6mg (30個体の合計BW= 19.4mg), 稚魚が $36.4 \pm 12.6\text{mg}$ (平均値 \pm SD) であった。暴露 pCO_2 は 1kPa , 暴露時間は24時間とした。使用した海水の塩分は34.2, CO_2 区 pH は 6.82, 対照区pHは8.15であった。水温 20°C 下で CO_2 急性致死影響試験に準拠して暴露操作を行った。また空気曝気した対照区を, CO_2 区と同様に準備した。暴露終了後, クロマグロの予備実験と同様に供試魚の固定および保存を行った。

(2) 塩類細胞観察法

観察対象とした塩類細胞は前脊索屈曲期では体表上に分布するもの, 稚魚では鰓弁上に分布するものとした。70%エタノールで保存しているマダイを CO_2 区・対照区ともに5個体ずつ用いた。

前脊索屈曲期仔魚は全載標本を観察した。稚魚では以下の手順で観察試料を準備した。左右4対の鰓弓とその鰓弁を, 基舌骨・基鰓骨に付着したまま摘出し, ピンセットおよびメスを用いて左第1鰓弓を鰓弁とともに分離し, 鰓弓の上枝と下枝の中間に位置する鰓耙より, 下枝側4~8番目の鰓耙の部分を残す形で, 鰓弓下枝に対して垂直に切断した。

試料を蒸留水で洗浄 (30分 \times 2回) したのち, 0.01M PBSに0.05% Triton X-100および0.01% NaN_3 を加えた溶液で洗浄 (30分) し, さらに0.01M PBSで洗浄 (30分) した。塩類細胞の免疫染色はクロマグロの予備試験と同様に行った。染色後, 前脊索屈曲期仔魚の体側表皮を実体顕微鏡下でピンセットを用いて剥離して観察試料とした。稚魚では染色した試料から損傷のない鰓弁対をピンセットとメスを用いて分離し, 各鰓弁ともメスを用いて鰓弁上端側の内転筋接合部で, 二次鰓弁の並ぶ方向に対して垂直に切断し, 鰓弁先端を有する鰓弁片を塩類細胞断面積の観察試料とした。稚魚の観察試料は1個体につき5鰓弁ずつとした。

前脊索屈曲期仔魚の観察試料は0.01M PBSを滴下したスライドガラス上にマウントし, カバーガラスで封入した。稚魚の観察試料は特殊スライドガラスに0.01M PBSを満たして入鰓弁動脈側が視野側になるようにマウントし, カバーガラスを載せた。観察には共焦点レーザー顕微鏡 (OLYMPUS社, Fluoview : FV500) を用い, 対物レンズ倍率は20倍にした。取得画像は2倍にデジタル拡大し, $1,024 \times 1,024\text{pixel}$ サイズのTiffファイル形式で保存し, NIH image ver. 1.61を用いて塩類細胞の断面積を計測し, CO_2 区と対照区間で比較した。なお前脊索屈曲期仔魚では胸鰭基部より頭部側に分布する塩類細胞, また稚魚では二次鰓弁および二次鰓弁基部に分布する塩類細胞はそれぞれ観察対象から除外した。

2) 結果および考察

マダイ前脊索屈曲期の体表上に分布する塩類細胞 (Fig. 34) の断面積 (平均値 \pm SD) は, 対照区が $212.3 \pm 11.1\mu\text{m}^2$, CO_2 区が $211.4 \pm 14.7\mu\text{m}^2$ であり, 有意差は認められなかった ($N=5$)。一方稚魚の鰓弁上に分布する塩類細胞 (Fig. 35) の断面積は, 対照区が $149.1 \pm 27.7\mu\text{m}^2$, CO_2 区が $198.3 \pm 19.9\mu\text{m}^2$ で, 約33%の有意な増加が見られた ($N=5$, $P < 0.05$, t -test)。

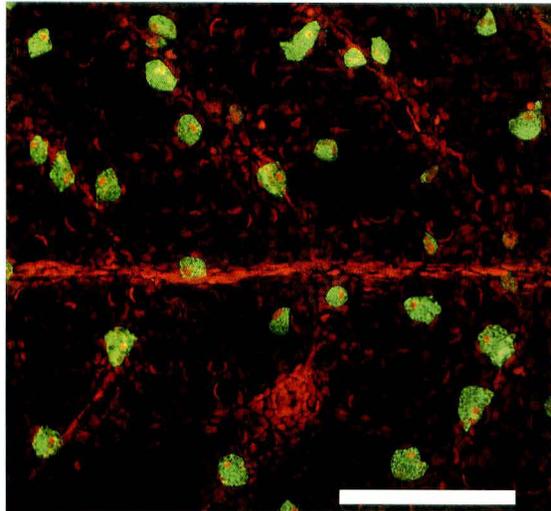


Fig. 34. Chloride cells in the body skin of a preflexion larva of *Pagrus major* stained with anti-Na⁺/K⁺-ATPase (green). Scale: 100μm.

稚魚期では塩類細胞の断面積が24時間以内に増大し、体内のpH環境を補償していると考えられた。稚魚期はCO₂感受性の高いステージであるのに対し、塩類細胞断面積の変化しなかった前脊索屈曲期はCO₂耐性の高い発育ステージである。CO₂耐性の違いによって、塩類細胞の応答も異なる可能性が示唆された。

4. 長期CO₂暴露に対する塩類細胞反応

ここでは長期間（30日間）のCO₂暴露に対する塩類細胞の反応を観察するため、マダイ稚魚の鰓に分布する塩類細胞について、高CO₂環境下における細胞断面積と細胞密度反応を検討した。

1) 材料と方法

成長試験において3段階のCO₂環境下および対照区環境で30日間飼育したマダイ稚魚の鰓弁上に分布する塩類細胞を、免疫染色（蛍光抗体法・間接法）により検出して観察した。暴露条件はTabel. 10に示した。

成長影響試験の終了したマダイを、0.3, 0.6, 1.1% CO₂区および対照区の4区について、それぞれ3個体ずつ観察に用いた。試料は短期CO₂暴露に対する塩類細胞反応試験と同様に固定および保存し、塩類細胞を免疫染色して観察を行った。

2) 結果および考察

各試験区の塩類細胞断面積および塩類細胞密度をFig. 36に示した。塩類細胞断面積の平均値は、



Fig. 35. Immunocytochemical detection of gill filament chloride cells in a juvenile of *Pagrus major* stained with anti-Na⁺/K⁺-ATPase. Scale: 100μm.

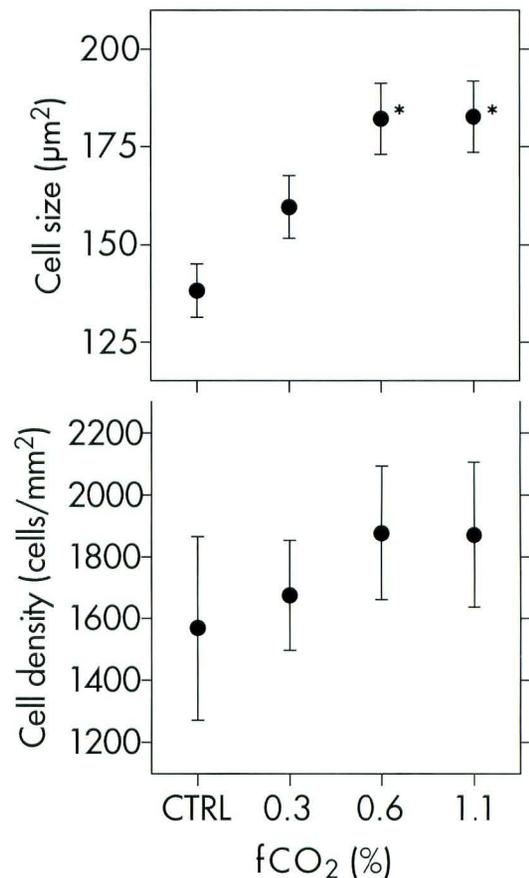


Fig. 36. Mean size (top) and density (bottom) of chloride cells in primary gill lamellas of juveniles of *Pagrus major* reared under control conditions, 0.3% CO₂, 0.6% CO₂ and 1.1% CO₂ for 4 weeks. Vertical bars represent SD. Asterisks indicate a significant difference from the control ($P < 0.01$, Dunnett test, $N = 3$).

対照区において $138.2 \pm 10.2 \mu\text{m}^2$ であったが、0.6および1.1% CO₂区ではそれぞれ 182.1 ± 14.7 および $182.7 \pm 9.22 \mu\text{m}^2$ であり、短期間（24時間）暴露とほぼ同等である約32%の面積増加が認められた ($P < 0.01$, Dunnett test)。塩類細胞の密度は断面

積と同様の傾向を示したが、有意な差は認められなかった。

以上のように亜致死レベルの高 CO₂ 環境下において、マダイ稚魚は塩類細胞を発達させることにより体内 pH 環境を正常に維持していると考えられる。0.3% CO₂ 区においては細胞断面積の増大が見られなかったが 0.6 および 1.1% CO₂ 区では有意な増大が認められているため、塩類細胞の形態学的な応答は CO₂ 濃度依存的であることが示唆される。魚類は環境水を媒体として呼吸を行うため、環境水の CO₂ 濃度が上昇すると、CO₂ は濃度勾配によって体内へ拡散し、細胞内および細胞外液中で H⁺ 濃度が急激に増加し、pH が低下する。結果として引き起こされる呼吸性アシドーシスは細胞代謝系を妨げる (Heisler, 1989)。魚類では鰓に存在するイオン輸送細胞である塩類細胞が海産魚種の pH 調節機構を担い、酸塩基平衡調節を行っているという説もある (Claiborne *et al.*, 2002)。また、高 CO₂ 環境では魚類体液中の Cl⁻ 濃度が低下し (Heisler, 1989)、Cl⁻ 濃度の低下は pCO₂ 依存的に起こることが報告されている (Hayashi *et al.*, 2004)。海産魚における Cl⁻ の排出部位は塩類細胞であり (Zadunaisky, 1984)、塩類細胞の発達が高 CO₂ 環境に対する適応の結果であると推察される。

謝 辞

本研究を進めるにあたり、終始懇切なる御指導・御鞭撻を賜った長崎大学水産学部教授 石松 惇博士、石坂丞二博士および竹村 暘博士、(財)地球環境産業技術研究機構 (RITE) 研究員 喜田 潤博士に心より感謝の意を表す。また、免疫組織化学に関して御教授・御協力いただいた東京大学助教授 金子豊二博士、聖マリアンナ医科大学助手 廣井準也博士、および(独)日本学術振興会特別研究員 加藤扶美博士に深く御礼申し上げます。

供試材料の提供に御協力頂いた、東京都葛西臨海水族園 荒井 寛氏、児玉雅章氏および(独)水産総合研究センター奄美栽培漁業センター 升間主計氏、さらに研究全般において御高配・御助言いただいた東京大学教授 佐藤 徹博士、長崎大学水産学部教授 玉置昭夫博士および同助教授 征矢野 清博士、同大学水産学部付属海洋資源

教育研究センターの職員および学生諸氏、(株)環境総合テクノス 渡辺雄二氏、および(株)ケイミックスの関係者各位に記して深謝したい。

本報告は著者の学位論文を一部改変したものであり、研究の機会を与えていただいた(財)海洋生物環境研究所元常務理事 待鳥精治氏をはじめ、絶大なる御協力を賜った同研究所関係者各位に厚く御礼申し上げます。

引用文献

- Alderdice, D.F. (1988). Osmotic and ionic regulation in teleosts eggs and larvae. In "Fish physiology" (eds. Hoar, W.S. and Randall, D.J.), Vol. 11A, Academic Press, San Diego, pp. 163-251.
- Auerbach, D.I., Caulfield, J.A., Adams, E.E. and Herzog, H.J. (1997). Impacts of ocean CO₂ disposal on marine life: I. A toxicological assessment integrating constant-concentration laboratory assay data with variable-concentration field exposure. *Environ. Model. Assess.*, **2**, 333-343.
- Ayson F.G., Kaneko, T., Hasegawa, S. and Hirano, S. (1994). Development of mitochondrion-rich cells in the yolk-sac membrane of embryos and larvae of tilapia, *Oreochromis mossambicus*, in fresh water and seawater. *J. Exp. Zool.*, **270**, 129-135.
- Bamber, R.N. (1987). The effects of acidic sea water on young carpet-shell clams *Venerupis decussata* (L.) (Mollusca: Veneracea). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **108**, 241-260.
- Bamber, R.N. (1990). The effects of acidic seawater on three species of lamellibranch mollusk. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **143**, 181-191.
- Broecker, W.S. and Peng, T.-H. (1974). Gas exchange rates between air and sea. *Tellus*, **26**, 21-35.
- Brownell, C.L. (1980). Water quality requirements for first-feeding in marine fish larvae. II. pH, oxygen, and carbon dioxide. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **44**, 285-298.
- Calabrese, A. and Davis, H.C. (1966). The pH

- tolerance of embryos and larvae of *Mercenaria mercenaria* and *Crassostrea virginica*. *Biol. Bull.*, **131**, 427-436.
- Caldeira, K. and Wickett, M.E. (2003). Anthropogenic carbon and ocean pH. *Nature*, **425**, 365.
- Caulfield, J.A., Adams, E.E., Auerbach, D.I. and Herzog, H.J. (1997). Impacts of ocean CO₂ disposal on marine life: II. Probabilistic plume exposure model used with a time-varying dose-response analysis. *Environ. Model. Assess.*, **2**, 345-353.
- Claiborne, J.B., Edwards, S.L. and Morrison-Shetlar, A.I. (2002). Acid-base regulation in fishes: cellular and molecular mechanisms. *J. Exp. Zool.*, **293**, 302-319.
- Crocker, C.E. and Cech, J.J., Jr. (1996). The effects of hypercapnia on the growth of juvenile white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. *Aquacult.*, **147**, 293-299.
- Degnan, K.J., Karnaky, K.J., Jr. and Zadunaisky, J.A. (1977). Active chloride transport in the in vitro opercular skin of a teleost (*Fundulus heteroclitus*), a gill-like epithelium rich in chloride cells. *J. Physiol. (London)*, **271**, 155-191.
- Fivelstad, S., Haavik, H., Løvik, G. and Olsen, A.B. (1998). Sublethal effects and sage levels of carbon dioxide in seawater for Atlantic salmon postsmolts (*Salmo salar* L.): ion regulation and growth. *Aquacult.*, **160**, 305-316.
- Foss, A., Røsnes, B.A. and Øiestad, V. (2003). Graded environmental hypercapnia in juvenile spotted wolffish (*Anarhichas minor* Olafsen): effects on growth, food conversion efficiency and nephrocalcinosis. *Aquacult.*, **220**, 607-617.
- 福原 修 (1969). マダイの卵発生と初期における形態の変異についての観察. 水産増殖, **17**, 71-76.
- Fukuhara, O. (1985). Functional morphology and behavior of early life stages of red sea bream. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **51**, 731-743.
- Grice, G.D., Weibe, P.H. and Hoagland, E. (1973). Acid-ion waste as a factor affecting the distribution and abundance of zooplankton in the New York Bight. I. Laboratory studies on the effects of acid waste on copepods. *Estuarine Coast. Mar. Sci.*, **1**, 45-50.
- Grøttum, J.A. and Sigholt, T. (1996). Acute toxicity of carbon dioxide on European seabass (*Dicentrarchus labrax*): mortality and effects on plasma ions. *Comp. Biochem. Physiol.*, **115A**, 323-327.
- Haedrich, R.L. (1997). Distribution and population ecology. In "Deep-sea fishes" (eds. Randall, D.J. and Angel, M.), Academic Press, San Diego, pp. 79-114.
- Handa, N. and Ohsumi, T. (1995). Direct ocean disposal of carbon dioxide. Terra Scientific Publishing Company, Tokyo, 274pp.
- Hayashi, M., Kita, J. and Ishimatsu, A. (2004). Acid-base responses to lethal aquatic hypercapnia in three marine fish. *Mar. Biol.*, **144**, 153-160.
- Heisler, N. (1986). Acid-base regulation in animals. Elsevier, Amsterdam, 492pp.
- Heisler, N. (1989). Acid-base regulation in fishes: 1. Mechanisms. In "Acid toxicity and aquatic animals" (eds. Morris, R. et al.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 85-97.
- Herzog, H., Drake, E. and Adams, E. (1997). CO₂ capture, reuse, and storage technologies for mitigating global climate change. A white paper, final report. DOE/DE-AF22-96PC01257, Energy Laboratory Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA, 66pp.
- ハーゾック, H.・エリアソン, B.・カルスタド, O. (2000). 温暖化ガスを封じ込める (大隅多加志訳). 日経サイエンス, **30**, 72-79.
- 「Herzog, H., Eliasson, B. and Kaarstad, O. (2000). Capturing greenhouse gases. *Scientific American*, February」
- Hiroi, J., Kaneko, T., Seikai, T. and Tanaka, M. (1998). Developmental sequence of chloride cells in the body skin and gills of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) larvae. *Zool. Sci.*, **15**, 455-460.
- Hiroi, J., Kaneko, T. and Tanaka, M. (1999). In vivo sequential changes in chloride cell morphology in the yolk-sac membrane of Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) embryos and larvae during seawater adaptation.

- J. Exp. Biol.*, **202**, 3485-3495.
- Hoffert, M.I., Wey, Y.-C., Callegari, A.J. and Broecker, W.S. (1979). Atmospheric response to deep-sea injections of fossil-fuel carbon dioxide. *Climatic Change*, **2**, 53-68.
- Houde, E.D. (1987). Fish early life dynamics and recruitment variability. *American Fisheries Society Symposium*, **2**, 17-29.
- Hwang, P.P. and Hirano, R. (1985). Effects of environmental salinity on intercellular organization and junctional structure of chloride cells in early stages of teleosts development. *J. Exp. Zool.*, **236**, 115-126.
- 生田和正・鹿間俊夫・織田三郎・奥本直人 (1992). サケ科魚類の発眼卵と稚魚の耐酸性評価. 養殖研報, **21**, 39-45.
- 伊元九弥 (2000). 日本産キス科魚類アオギスとシロギスの生活史に関する研究. 学位論文, 九州大学大学院農学研究科, 福岡, 199pp.
- Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) (2001). Summary for policymakers. A report of working group I of the Intergovernmental Panel on Climate Change, 20pp.
- 石橋泰典・小澤 勝・平田八郎・熊井英水 (2003). マダイ *Pagrus major* 仔稚魚の発育に伴う各種環境ストレス耐性の変化. 日水誌, **69**, 36-43.
- 石松 惇・喜田 潤 (1999). CO₂ が魚類に与える影響について. 魚雑, **46**, 1-13.
- 石坂丞二・大隅多加志 (1999). 二酸化炭素の海洋隔離に伴う環境影響予測技術開発: 特にその生物影響予測研究について. 海の研究, **8**, 213-218.
- 石坂丞二 (2001). 特集 CO₂ 海洋隔離—隔離技術と生物影響について—. 月刊海洋, **33**, 753-755.
- 金子豊二 (1997). 魚類におけるイオン調節と塩類細胞. 様々なイオン環境への適応と塩類細胞の機能の多様性. 化学と生物, **35**, 376-382.
- Kaneko, T., Hasegawa, S., Takagi, Y., Tagawa, M. and Hirano, T. (1995). Hypoosmoregulatory ability of eyed-stage embryos of chum salmon. *Mar. Biol.*, **122**, 165-170.
- 金子豊二 (2002). 浸透圧調節・回遊. 「魚類生理学の基礎」(会田勝美編). 恒星社厚生閣, 東京, pp. 215-232.
- Katoh, F., Shimizu, A., Uchida, K. and Kaneko, T. (2000). Shift of chloride cell distribution during early life stages in seawater-adapted killifish, *Fundulus heteroclitus*. *Zool. Sci.*, **17**, 11-18.
- Kendall, A.W., Jr., Ahlstrom E.H. and Moser, H.G. (1984). Early life history stages of fishes and their characters. In "Ontogeny and systematics of fishes" (eds. Moser, H.G. *et al.*), American Society of Ichthyologists and Herpetologists, Special Publ. 1. Allen Press, Kansas, pp. 11-22.
- Kikkawa, T., Ishimatsu, A. and Kita, J. (2003). Acute CO₂ tolerance during the early developmental stages of four marine teleosts. *Environ. Toxicol.*, **18**, 375-382.
- Kikkawa, T., Kita, J. and Ishimatsu, A. (2004). Comparison of the lethal effect of CO₂ and acidification on red sea bream (*Pagrus major*) during the early developmental stages. *Mar. Poll. Bull.*, **48**, 108-110.
- 小山次朗・黒島良介・石松 惇 (1992). 汚染物質毒性評価のための指標海産魚選定. 水環境学会誌, **15**, 804-813.
- Liro, C., Adams, E. and Herzog, H. (1992). Modeling the release of CO₂ in the deep ocean. *Energy Convers. Mgmt.*, **33**, 667-674.
- Marchetti, C. (1977). On geoengineering and the CO₂ problem. *Climatic Change*, **1**, 59-68.
- Max, B. (1991). This and that: the neurotoxicity of carbon dioxide. *Trends Pharmacol. Sci.*, **12**, 408-411.
- McKim, J.M. (1977). Evaluation of tests with early life stages of fish for predicting long-term toxicity. *J. Fish Res. Board Can.*, **34**, 1148-1154.
- McKim, J.M. (1985). Early life stage toxicity tests. In "Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate, and risk assessment" (ed. Rand, G.M.), 2nd ed. Appendix B. Taylor & Francis, Philadelphia, pp. 974-1011.
- Mehrbach, C., Culbertson, C.H., Hawley, J.E. and Pytkowicz, R.M. (1973). Measurement of the apparent dissociation constants of carbonic acid

- in seawater at atmospheric pressure. *Limnol. Oceanogr.*, **18**, 897-907.
- Miller, T.J., Crowder, L.B., Rice, J.A. and Marschall, E.A. (1988). Larval size and recruitment mechanisms in fishes: Toward a conceptual framework. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **45**, 1657-1670.
- Morris, R., Taylor, E.W., Brown, D.J.A. and Brown J.A. (1989). Acid toxicity and aquatic animals, Society for Experimental Biology Seminar Series 34. Cambridge University Press, Cambridge, 282pp.
- Nakashiki, N., Ohsumi, T. and Shitashima, K. (1991). Sequestering of CO₂ in a deep ocean - fall velocity and dissolution rate of solid CO₂ in the ocean. CRIEPI Report, **EU91003**.
- Nakashiki N., Ohsumi, T. and Katano, N. (1995). Technical view on CO₂ transportation onto the deep ocean floor and dispersion at intermediate depth. In "Direct ocean disposal of carbon dioxide" (eds. Handa, N. and Ohsumi, T.), Terra Scientific Publishing Company, Tokyo, pp. 183-193.
- Nishikawa, J., Nishida, S., Moku, M., Hidaka, K. and Kawaguchi, K. (2001). Biomass, abundance, and vertical distribution of micronekton and large gelatinous zooplankton in the during the summer of 1997. *J. Oceanogr.*, **57**, 361-375.
- Ohsumi, T. (1995). CO₂ storage options in the deep sea. *MTS J.*, **29**, 58-66.
- 大隅多加志 (2003). 地球温暖化と海洋環境. 遺産, **57**, 76-80.
- Oikawa, S., Itazawa, Y. and Gotoh, M. (1991). Ontogenic change in the relationship between metabolic rate and body mass in a sea bream *Pagrus major* (Temminck & Schlegel). *J. Fish Biol.*, **38**, 483-496.
- Oikawa, S., Hirata, M., Kita, J. and Itazawa, Y. (1999). Ontogeny of respiratory area of a marine teleost, porgy, *Pagrus major*. *Ichthyol. Res.*, **46**, 233-244.
- 沖山宗雄 (2001). 前稚魚の意味論：稚魚研究をはじめめる人に。「稚魚の自然史」(千田哲資ら編). 北海道大学図書刊行会, 札幌, pp. 241-257.
- Omori, M., van der Spoel, S. and Norman, C.P. (1994). Impact of human activities on pelagic biogeography. *Prog. Oceanogr.*, **34**, 211-219.
- 大森 信 (1997). 海洋における二酸化炭素処分—海洋生物学・環境サイドからの検討. 水産の研究, **16**, 4-5.
- Omori M, Norman, C.P. and Ikeda, T. (1998). Oceanic disposal of CO₂: Potential effects on deep-sea plankton and micronekton - A review. *Plankton Biol. Ecol.* **45**, 87-99.
- Oozeki, Y. and Hirano, R. (1985). Effects of temperature changes on the development of eggs of the Japanese whiting *Sillago japonica* Temminck et Schlegel. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **51**, 557-572.
- Oozeki, Y., Hwang, P.-P. and Hirano, R. (1992). Larval development of the Japanese whiting, *Sillago japonica*. *Japan. J. Ichthyol.*, **39**, 59-66.
- Ormerod, B. and Angel, M. (1996). Ocean storage of carbon dioxide. Workshop 2 - Environmental Impact. IEA Greenhouse Gas R&D Programme, Cheltenham, 131pp.
- Ozaki, M., Sonoda, K., Fujioka, T., Tsukamoto, O. and Komatsu, M. (1995). Sending CO₂ into deep ocean with a hanging pipe from floating platform. *Energy Convers. Mgmt.*, **36**, 475-478.
- Parmesan, C. and Yohe, G. (2003). A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems. *Nature*, **421**, 37-42.
- Pörtner, H.-O. and Reipschläger, A. (1996). Ocean disposal of anthropogenic CO₂: physiological effects on tolerant and intolerant animals. In "Ocean Storage of Carbon Dioxide, Workshop 2 - Environmental Impact" (eds. Ormerod, B. and Angel, M.), IEA Greenhouse Gas R&D Programme, Cheltenham, pp. 57-81.
- Portmann, J.E. (1972). Results of acute toxicity tests with marine organisms, using a standard method. In "Marine pollution and sea life" (ed. Ruivo, M.), Fishing News, London, pp. 212-217.
- Pounds, J.A., Fogden, M.P.L. and Campbell, J.H. (1999). Biological response to climate change on a tropical mountain. *Nature*, **398**, 611-615.
- Rice, J.A., Crowder, L.B. and Binkowski, F.P.

- (1987). Evaluating potential sources of mortality for larval bloater (*Coregonus hoyi*): Starvation and vulnerability to predation. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **44**, 467-472.
- Roos, A. and Boron, W.F. (1981). Intracellular pH. *Physiol. Rev.*, **61**, 296-434.
- Root, T.L., Price, J.T., Hall, K.R., Schneider, S.H., Rosenzweig, C. and Pounds, J.A. (2003). Fingerprints of global warming on wild animals and plants. *Nature*, **421**, 57-60.
- Rose, C.D., Williams, W.G., Hollister, T.A. and Parrish, P.R. (1977). Method for determining acute toxicity of an acid waste and limiting permissible concentration at boundaries of an oceanic mixing zone. *Environ. Sci. Technol.*, **11**, 367-371.
- Sasai, S., Kaneko, T. and Tsukamoto, K. (1998). Extrabranchial chloride cells in early life stages of Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Ichthyol. Res.*, **45**, 95-98.
- Seibel, B.A. and Walsh, P.J. (2001). Potential impacts of CO₂ injection on deep-sea biota. *Science*, **294**, 319-320.
- Seibel, B.A. and Walsh, P.J. (2003). Biological impacts of deep-sea carbon dioxide injection inferred from indices of physiological performance. *J. Exp. Biol.*, **206**, 641-650.
- Shiraishi, K., Kaneko, T., Hasegawa, S. and Hirano, T. (1997). Development of multicellular complexes of chloride cells in the yolk-sac membrane of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) embryos and larvae in seawater. *Cell Tissue Res.*, **288**, 583-590.
- 白山義久・ソントク久代 (2001). ベントスに対する CO₂ の影響. 月刊海洋, **33**, 791-796.
- 下島公紀 (1997). 深海の利用・開発. 海洋と生物, **112**, 395-400.
- Smart, G.R., Knox, D., Harrison, J.G., Ralph, J.A., Richards, R.H. and Cowey, C.B. (1979). Nephrocalcinosis in rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson; the effect of exposure to elevated CO₂ concentrations. *J. Fish Dis.*, **2**, 279-289.
- 竹田達右・板沢靖男 (1983). 二酸化炭素麻酔の活魚輸送への応用可能性の検討. 日水誌, **49**, 725-731.
- Thomas, C.D., Cameron, A., Green, R.E., Bakkenes, M., Beaumont, L.J., Collingham, Y.C., Erasmus, B.F.N., de Siqueira, M.F., Grainger, A., Hannah, L., Hughes, L., Huntley, B., van Jaarsveld, A.S., Midgley, G.F., Miles, L., Ortega-Huerta, M.A., Peterson, A.T., Phillips, O.L. and Williams, S.E. (2004). Extinction risk from climate change. *Nature*, **427**, 145-148.
- 坪田博行・山本 普・原田 晃・高橋正征・川幡穂高 (1994). 地球規模の環境問題. 「海洋環境を考える」(日本海洋学会編), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 141-164.
- Ura, K., Soyano, K., Omoto, N., Adachi, S. and Yamauchi, K. (1996). Localization of Na⁺, K⁺-ATPase in tissues of rabbit and teleosts using an antiserum detected against a partial sequence of the α -subunit. *Zool. Sci.*, **13**, 219-227.
- Vandenberg, J.I., Metcalfe, J.C. and Grace, A.A. (1994). Intracellular pH recovery during respiratory acidosis in perfused hearts. *Am. J. Physiol.*, **266**, C489-C497.
- 渡辺雄二・石田 洋・山口 篤・石坂丞二 (2001). 中層プランクトンへの CO₂ の影響. 月刊海洋, **33**, 813-818.
- Weiss, R.F. (1974). Carbon dioxide in water and seawater: the solubility of a non-ideal gas. *Mar. Chem.*, **2**, 205-215.
- Weitzman, S.H. (1997). Systematics of deep-sea fishes. In "Deep-sea fishes" (eds. Randall, D.J. and Angel, M.), Academic Press, San Diego, pp. 43-77.
- World Health Organization (2003). Climate change and human health: risks and responses. Summary. World Health Organization, Geneva, 37pp.
- Zadunaisky, J.A. (1984). The chloride cell: The active transport of chloride and the paracellular pathways. In "Fish Physiology" (eds. Hoar, W.S. and Randall, D.J.), Vol. 10B, Academic Press, Orlando, pp. 130-176.

