海生研研報，第９号，47-54，2006
Rep. Mar. Ecol. Res. Inst., No. 9, 47-54, 2006

ハマクマノミ（*Amphiprion frenatus*）卵のCO_2耐性

吉川貴志[*1§]・長谷川一幸[*1]・箕輪　康[*1]・瀬戸熊卓見[*2]・喜田　潤[*2]

CO_2 Tolerance of Tomato Clownfish (*Amphiprion frenatus*) Eggs

Takashi Kikkawa[*1§], Kazuyuki Hasegawa[*1], Yasushi Minowa[*1], Takumi Setoguma[*2] and Jun Kita[*2]

要約：近年，大気中二酸化炭素（CO_2）の増加による気候変動に対する対策のひとつとして，CO_2の海洋隔離が提案されている。本研究ではCO_2海洋隔離に伴う生物影響を評価するため，ハマクマノミ胚体期卵を用いて急性のCO_2耐性実験を行った。CO_2の海洋隔離が想定される現場では，CO_2濃度が時空間的に変化すると考えられることから，一定濃度のCO_2に暴露する実験（定常暴露）に加え，暴露濃度が変動した場合（非定常暴露）の影響を検討した。定常暴露より求めた半数生存限界（TLm）は14.3kPa（48時間暴露），10.3kPa（72時間暴露）および7.0kPa（96時間暴露）であった。非定常曝露において2.9あるいは4.8kPa pCO_2暴露から急激に自然海水へ戻した場合の死亡個体数は，高CO_2海水に継続暴露した定常暴露の場合より有意に増加した。CO_2海洋隔離の魚類への影響を検討する場合，より現場の状態に近い条件での実験が必要である。

キーワード：ハマクマノミ，卵，胚，高二酸化炭素，二酸化炭素耐性，非定常暴露

Abstract: Acute CO_2 tolerance of tomato clownfish (*Amphiprion frenatus*) eggs (embryonic stage) was investigated to assess biological impacts of CO_2 ocean sequestration, which has been proposed as a possible measure to mitigate climate changes caused by increasing atmospheric concentrations of gaseous CO_2. The median tolerance limits (TLms) of *A. frenatus* eggs to CO_2 were estimated to be 14.3kPa (pCO_2 (partial pressure of CO_2) exposure duration: 48 h), 10.3kPa (72 h) and 7.0kPa (96 h) by one-step exposures. Stepwise exposure experiments were also conducted, since seawater CO_2 concentrations would change temporally around the CO_2 release point. Sudden drops of pCO_2 from 2.9 or 4.8kPa to normocapnia significantly disrupted egg development leading to abnormalities and death. These results demonstrated that biological impacts of CO_2 ocean sequestration must be examined under conditions that closely mimic the dynamic changes in seawater CO_2 level caused by CO_2 ocean sequestration.

Keywords: *Amphiprion frenatus*, egg, embryo, hypercapnia, CO_2 tolerance, stepwise exposure

まえがき

人間活動の拡大に伴って温室効果ガスが大量に大気中へ放出されることにより地球規模の気候変動が生じているとされ（IPCC, 2001），二酸化炭素（CO_2）等，温室効果ガスの大気への排出量削減は現在，世界規模で取り組まれている喫緊の課題である。その対策の一つとして提案されているCO_2の地中および海洋隔離技術は，現在盛んに調査研究が進められている（Anderson and Newell, 2004）。すなわち，CO_2は海水への溶解度が高く，海洋が莫大なCO_2吸収源となっていることから，CO_2海洋隔離の実現可能性とその生態系影響が論議されている（Barry *et al.*, 2004; Carman *et al.*, 2004; Ishimatsu *et al.*, 2004; Kita and Ohsumi, 2004; Portner *et al.*, 2004）。Kita and Ohsumi

（2005年8月17日受付，2005年9月6日受理）
*1 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
*2 財団法人　海洋生物環境研究所　実証試験場（〒945-0017　新潟県柏崎市荒浜４－７－17）

(2004) はCO_2海洋隔離や気候変動に伴う海洋の高CO_2化を背景としたCO_2の海洋生物への影響についての既往知見を総括した。従来の実験例では，一定濃度のCO_2に生物を暴露した時の生物応答が実験的に調べられてきた。しかしCO_2海洋隔離が想定される現場において，放出されたCO_2に暴露される生物は一定濃度のCO_2ではなく，時空間的に非定常なCO_2濃度を経験することが予想される。このため，より現実に近い状態での実験が不可欠であると考えられる。

一般に生物試験には安定した供試生物の供給が要求される。本研究で用いたハマクマノミ *Amphiprion frenatus*は，光周期および水温の調節によって継続的な採卵が可能な魚種である。また卵サイズが比較的大きく卵期も長いため，胚を対象とした生理学的研究等にも適しており，生活史を通した毒性試験（ライフサイクル試験）を行う際の候補魚種としても検討されている（古田ら，2001）。

このような背景から，本研究ではハマクマノミの胚体期卵を用いて，海水CO_2濃度を一定に保った状態で暴露を行う「定常暴露試験」と暴露中に海水CO_2濃度を変動させる「非定常暴露試験」を実施した。なお，本研究の一部は（株）関西総合環境センター（現：（株）環境総合テクノス）委託研究「二酸化炭素の急性毒性に関する生物影響室内実験」の一環として実施したものである。

方　法

供試材料　光周期12L：12D，水温約24℃の環境下で1994年２月より継続して産卵しているハマクマノミ親魚より産出された卵（Fig. 1）を試験に用いた。ハマクマノミの受精卵は楕円形の沈性卵で，長軸の一端（動物極側）にある付着糸により岩等の基質に付着している。卵は１個ずつ隣り合って産み付けられ，水温24℃の場合は産卵後約10日間で孵化する。孵化するまで親魚（主に雄個体）が受精卵の保育（受精卵が酸欠に陥らないよう新鮮海水を送る，捕食者から守る等）を行う。産卵後５日目の胚体期卵を飼育水槽よりピペットを用いて採集した。採集した卵を実体顕微鏡下で検鏡し，発生の進んでいない個体や胚体表皮からの出血，黒色素胞の収縮，卵殻に亀裂等の認められた個体を除き，正常に発生している個体のみを試験に供した。供試卵（40個）の大きさ（平均値±SD）は長径が2.82±0.08mm，短径が0.96±0.04mmであった。

Fig. 1 *Amphiprion frenatus* eggs used for this study (five days after fertilization).

定常暴露　試験はKikkawa *et al.* (2003) に準拠し，Fig. 2に示す装置を使用した。この装置は，水温を一定にするための塩化ビニル（PVC）製恒温水槽（約100L容），２つのPVC製暴露水槽（CO_2暴露区および対照区：各14L容）およびガス混合装置（ガスブレンダー：GB-3C特，コフロック製）で構成される。CO_2暴露区は，ガス混合装置を用いてCO_2，O_2およびN_2からなる混合ガス（以下，「CO_2混合ガス」）の連続送気により，海水中のガス組成を一定に維持できるようにした。対照区では空気を連続してばっ気した。試験には

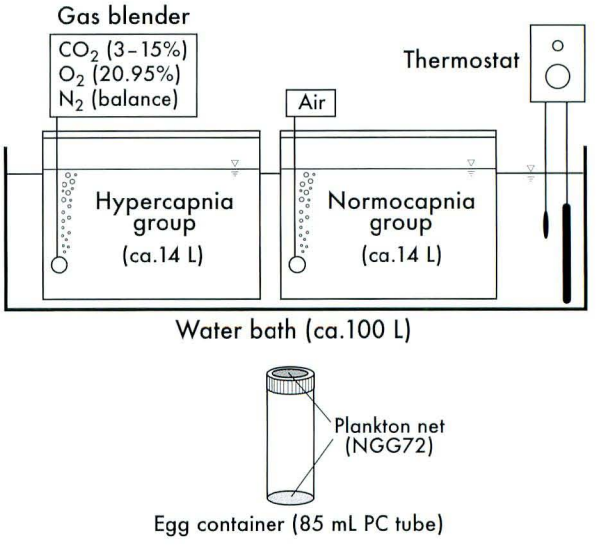

Fig. 2 Schematic diagrams of the experimental apparatus (upper) and the embryo container (lower) used for the CO_2 tolerance test. The water bath was used to maintain the temperature of the two PVC tanks during the hypercapnia or normocapnia exposures.

砂ろ過した自然海水を用いた。試験水温は24℃に設定した。暴露時の卵の収容には，ポリカーボネイト製沈殿管（85mL容）の蓋および底に穿孔し，プランクトンネット（NGG72：目合い222μm）を貼った卵収容器を用いた。卵収容器はCO_2暴露区および対照区それぞれ10本ずつ用意し，卵をピペットで卵収容器１本につき５個ずつ移し入れた後，Fig. 3に示すように卵収容器を暴露水槽内に配置して高CO_2暴露を行った（供試卵数：50）。

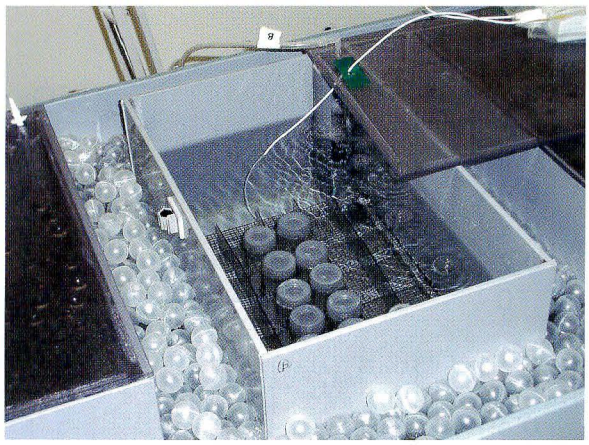

Fig. 3 A photograph of the PVC tank containing the egg containers.

送気するCO_2濃度（fractional CO_2 concentration: fCO_2）は３，５，７，10および15%とした。CO_2混合ガスは毎分400mL送気した。暴露時間は96時間とした。供試個体は暴露開始から６，24，48，72および96時間目に実体顕微鏡で検鏡し，正常発生個体，異常個体および死亡個体を計数した。異常個体は胚の萎縮，尾部末端の奇形，膜鰭の白濁，脊索の異常湾曲，囲心部への血液流出，卵黄嚢損傷，卵殻破裂のみられる個体とした。心停止している個体は死亡個体とした。それ以外の個体は正常発生個体とみなした。72時間目までの観察では検鏡後，生残個体（正常発生個体および異常個体）をすみやかに暴露水槽内に戻して暴露を継続した。暴露期間中の水温は連続記録し，海水pHおよび大気圧は試験開始時および24時間ごとに測定した。水温記録にはシロ産業社製サーモレコーダ：TR-71Sおよびテフロン被覆センサ：TR-1106を用い，pH測定には東亜ディーケーケー社製pHメータ：HM-60Gおよび複合電極GST-5712Cを用いた。また塩分は，試験開始前に海水を採取してYeo-Kal Environmental Electronics社製Inductively coupled salinometer 601MK IIIを用いて電導度比を測定し，気象庁（1999）の方法に従って算出した。大気圧の測定はRegulus社製デジタル気圧計：BR-88を用いた。CO_2分圧（pCO_2）はfCO_2，大気圧平均値，水温平均値および塩分より算出した。半数生存限界（median tolerance limit: TLm）はJIS工場排水試験方法（日本規格協会，1998）の「魚類による急性毒性試験」に準拠して算出した。

非定常暴露　定常暴露で用いた装置に暴露水槽を１基加え，合計３基の暴露水槽を用いて試験を実施した。各暴露水槽はそれぞれ３%CO_2区，５%CO_2区および自然海水区（空気ばっ気区）として定常暴露と同様に準備した。暴露は48時間一定濃度で実施し（第１暴露），濃度を変更してさらに48時間（第２暴露），合計96時間の暴露とした。暴露海水の組み合わせはTable 1に示す６パターンとした。併せて96時間濃度を変更しないパターンも３区設定した。１暴露パターンにつき５個の卵を収容した卵収容器を５本用い，供試卵数は25とした。濃度を変更する際は，第１暴露が終了した時点で卵収容器内の海水が抜けるように収容器を取り上げ，第２暴露のCO_2濃度に設定してある暴露水槽内に収容器を配置して第２暴露を行った。96時間一定濃度区も同様の収容器操作を行った。96時間までの暴露が終了した時点で供試個体を検

Table 1 Gas concentrations and exposure durations in the stepwise exposure tests

Experiment number	The first exposure		The second exposure	
	Gas	Duration	Gas	Duration
1	5% CO_2	48 h	3% CO_2	48 h
2	3% CO_2	48 h	5% CO_2	48 h
3	5% CO_2	48 h	Air	48 h
4	Air	48 h	5% CO_2	48 h
5	3% CO_2	48 h	Air	48 h
6	Air	48 h	3% CO_2	48 h
7	5% CO_2	96 h	–	–
8	3% CO_2	96 h	–	–
9	Air	96 h	–	–

Table 2 pCO_2, pH, temperature and salinity of the hypercapnic seawater during the exposures

Condition	fCO_2 (%)	pCO_2 (kPa)	pH*1	Temperature*2 (°C)	Salinity*3
One-step	3	2.9	6.377 ± 0.019	23.7 ± 0.1	34.6
	5	4.8	6.167 ± 0.005	24.3 ± 0.1	34.5
	7	6.8	6.088 ± 0.009	24.3 ± 0.1	31.5
	10	9.6	5.918 ± 0.003	24.3 ± 0.1	34.5
	15	14.3	5.718 ± 0.007	24.3 ± 0.1	34.6
Stepwise	3	2.9	6.266 ± 0.007	23.8 ± 0.1	34.4
	5	4.8	6.410 ± 0.013	23.7 ± 0.1	34.4

*1: mean ± SD of repeated measurements with a 24-hour interval at each condition.
*2: mean ± SD, recording interval:1 min.
*3: measured at the beginning of each exposure.

鏡し，定常暴露と同じ基準で正常発生個体，異常個体および死亡個体を計数した。水温，pHおよび塩分は定常暴露と同様に測定した。

結　果

定常暴露　CO_2暴露区のpCO_2，pH，水温および塩分をTable 2に示す。対照区のpHは8.176±0.029，水温は23.8±0.2℃（平均値±SD）であった。対照区の供試個体はすべて正常に生残していた。死亡および異常個体の割合は暴露時間および分圧依存的に増加した（Fig. 4）。3％CO_2暴露の死亡率は常に0であり，異常個体もほとんど見られなかった。一方，15％CO_2暴露では供試個体すべてが異常あるいは死亡の反応を示し，暴露時間が長くなると5％CO_2区においても高い異常あるいは死亡率を示した（0.96，96時間暴露）。供試個体すべてが正常発生する暴露条件は，3％CO_2，72時間以内の暴露であった。また死亡率から算出したTLmは14.3kPa（48時間暴露），10.3kPa（72時間暴露）および7.0kPa（96時間暴露）であった。

非定常暴露　CO_2暴露区のpCO_2，pH，水温および塩分をTable 2に示す。自然海水区のpHは8.223±0.033，水温は23.6±0.1℃（平均値±SD）であった。Table 1のNo. 4ではピペット操作時に卵を1個損壊したので供試卵数は24とした。Fig. 5に各暴露区における死亡個体数，異常個体数および正常発生個体数を供試個体数に対する割合で示した。No. 1および2ではすべて異常個体あるいは死亡個体であったが，死亡率は第2暴露でより大きかった。またCO_2濃度を低下させる区において高い値を示した。すなわち死亡率はNo. 3で最も高く（0.72），次いでNo. 5（0.375），No. 1（0.24），No. 6（0.2），No. 2および4（各0.12）の順で低下した。このうち，No. 3および5の死亡個体数は，

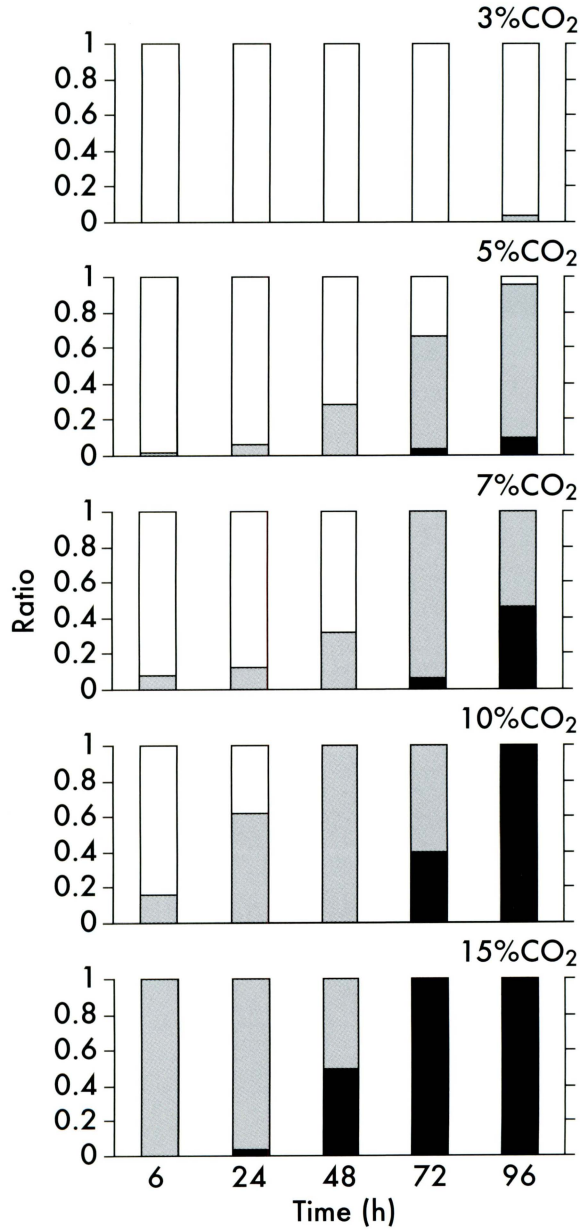

Fig. 4 Ratios of the dead (black), abnormal but surviving (gray), and normally developing eggs (white) of *Amphiprion frenatus* in hypercapnic seawater of constant CO_2 (3−15%) for 6 to 96 h exposures.

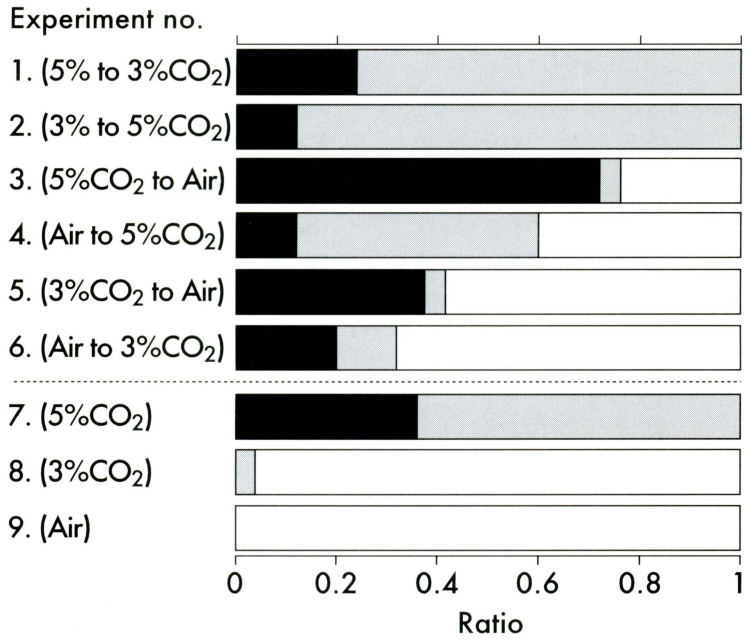

Fig. 5 Results of stepwise (above the dashed line) and one-step exposures (below the dashed line) of *Amphiprion frenatus* eggs to hypercapnia. Ratio of the dead (black), the abnormal but surviving (gray), and the normally developing eggs (white) at the end of exposure are shown. Numbers of test eggs in an exposure were 24 for test No.5 and 25 for the others.

定常区（No. 7，8）と比較して多く，有意差が認められた（No. 3対7：χ^2=6.52；DOF=1；P<0.05，No. 5対8：Fisher's exact test；P<0.001）。また，No. 4および6の死亡個体数はNo. 7および8と有意な差が認められなかった（Fisher's exact test；P>0.05）。

考　察

本研究の定常暴露では胚の生残を基準として観察を行った。Kikkawa *et al.*（2003）はマダイ*Pagrus major*およびシロギス*Sillago japonica*の胚についてCO_2耐性実験を実施している。この2魚種については生残ではなく孵化を基準として高CO_2に対する感受性を評価している。したがってこれらのデータからハマクマノミ胚とマダイおよびシロギス胚のCO_2耐性を直接比較することは不適当である。マダイおよびシロギスでは，受精後CO_2耐性が増し，仔魚期で極大となる。このCO_2耐性極大期におけるマダイおよびシロギスの24時間高CO_2暴露に対するTLmは5.2kPa（マダイ，前脊索屈曲期仔魚）および4.7kPa（シロギス，脊索屈曲期仔魚）である。ハマクマノミ胚では24時間暴露の場合，15%CO_2（pCO_2=14.3kPa）に対しても死亡率は0.5を下回っており（0.04），TLmは算出できなかった。このことから，マダイおよびシロギスよりもハマクマノミの方がCO_2に対してより高い耐性を有している可能性があると考えられる。卵期から仔魚期にかけてCO_2耐性が増大するメカニズムは明らかでないが，発育に伴う塩類細胞（chloride cell）の分化との関連性が指摘されている（Kikkawa *et al.*, 2003；吉川，2004；Ishimatsu *et al.*, 2004）。多くの魚種について胚体期に塩類細胞の分化が認められ（Hwang and Hirano, 1985；Kaneko *et al.*, 1995；Shiraishi *et al.*, 1997；Sasai *et al.*, 1998；隼野ら，1999；Katoh *et al.*, 2000），ハマクマノミ胚においても塩類細胞の存在が認められている（吉川，2004）。ハマクマノミは卵期が長く，孵化前に卵内で開口して鰓も形成される。マダイ，シロギスでは孵化後開口し，卵黄仔魚期を経て鰓が形成される。このような発生過程の違いもCO_2耐性の種間差を生じさせる要因となっているかもしれない。

非定常暴露において暴露濃度と時間の積算値が最も大きい5%CO_2定常区（Table 1，No. 7）よりも，5%CO_2海水から第2暴露で自然海水に戻した区（No. 3）の方が，積算値は半分であるにもかかわらず死亡個体数が多くなる結果となった。このことは3%CO_2に関しても同様であり（No. 8と5の比較），非定常濃度のCO_2に暴露した場

合の致死影響は，定常CO_2暴露の結果から推定できない可能性が示された。吉川（2004）はシロギス稚魚を用いて非定常実験を行い，高濃度のCO_2暴露（５％CO_2）を行う前にあらかじめ低濃度CO_2（１％CO_2）に暴露すると致死反応が抑制されることを示した。この理由として，あらかじめ低濃度CO_2に暴露することで体内の重炭酸イオン（HCO_3^-）濃度が上昇し，体内のpH緩衝能が通常よりも高い状態にあった可能性を述べている。本研究で見られた，CO_2濃度を急激に低下させた場合に生ずる死亡についてはこれまで報告がない。高CO_2環境下において，海産魚の血液ではpCO_2の上昇に伴いpHが一過性に低下するが，HCO_3^-の海水中からの取り込みによってpHは回復するとされる（Toews *et al*., 1983；Claiborne and Evans, 1992；Heisler, 1993；石松・喜田，1999；Hayashi *et al*., 2004；Ishimatsu *et al*., 2004）。本研究のような，高CO_2環境下において一定のpH補償水準を維持している状態から自然海水に暴露された場合，血中ではpCO_2が自然海水水準まで急激に低下することによって急性のアルカリ血症を生じていると考えられる。このことが死亡の引き金となっている可能性があるが，現時点では高CO_2暴露後の自然海水暴露による死亡原因を特定できない。

非定常暴露のNo. 4および６における生死反応は，No. 7および８の結果と比較して有意差が認められなかった。しかしNo. 4および６の結果を定常暴露において対応する点（５および３％CO_2，48時間暴露，Fig. 4参照）と比較した場合，死亡個体数はNo. 4および６の方が定常暴露よりも多い（Fisher's exact test；$P<0.05$（No. 4と定常５％CO_2，48時間暴露の比較），$P<0.01$（No. 6と定常３％CO_2，48時間暴露の比較））。このことは発生に伴うCO_2耐性の変化が関与していると考えられる。本研究の定常暴露では受精後５日目から暴露を開始しているが，非定常暴露のNo. 4および６では，第１暴露では自然海水暴露であるため正味のCO_2暴露は受精後７日目からとなり，暴露開始時における発育段階が異なっている。CO_2耐性は発生に伴って変化することが知られており（Kikkawa *et al*., 2003），暴露開始時における発育段階の違いが生死反応の違いを生じた原因のひとつとして挙げられる。

CO_2海洋隔離において，CO_2放出点近傍域ではCO_2濃度が時空間的に変化することが予想される。Auerbach *et al*.（1997）は低pH暴露に対する致死影響のデータを用いて非定常CO_2の致死影響を算定する方法を提示した。この方法は暴露濃度と時間の積算値から致死を予測することを基本としており，動物プランクトン（*Metridia pacifica*）ではこの概念を適用できる事例が報告されている（Sato *et al*., 2005）。またSato（2004）は実際に放出後のCO_2挙動から動物プランクトンの死亡をシミュレートしている。しかしながらシロギス稚魚やハマクマノミ胚ではこの概念が適用できないことが明らかとなった。稚魚や胚のみならず，成魚（ヒラメ*Paralichthys olivaceus*）においても本研究と同様の知見がある（林，2004）。このように魚類に対する高CO_2急性毒性は暴露方法によって異なるため，実海域におけるCO_2海洋隔離の生物影響を予測評価するためには，非定常CO_2に対する致死影響を詳細に把握し死亡機構を明らかにする必要がある。

謝　辞

本稿の校閲を賜った長崎大学教授，石松　惇博士，海生研理事，城戸勝利博士，同顧問，会沢安志博士および沖山宗雄博士に御礼申し上げる。また本稿をまとめるに当たり貴重なご助言をいただいた海生研中央研究所，清野通康博士，中村幸雄博士および土田修二博士に記して深謝する。

文　献

Anderson, S. and Newell, R. (2004). Prospects for carbon capture and storage technologies. *Annu. Rev. Environ. Resour.*, **29**, 109-142.

Auerbach, D.I., Caulfield, J.A., Adams, E.E. and Herzog, H.J. (1997). Impacts of ocean CO_2 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.

Barry, J.P., Buck, K.R., Lovera, C.F., Kuhnz, L., Whaling, P.J., Peltzer, E.T., Walz, P. and Brewer, P.G. (2004). Effects of direct ocean CO_2 injection on deep-sea meiofauna. *J. Oceanogr.*, **60**, 759-766.

Carman, K.R., Thistle, D., Fleeger, J.W. and Barry, J.P. (2004). Influence of introduced CO_2 on

deep-sea metazoan meiofauna. *J. Oceanogr.*, **60**, 767-772.

Claiborne, J.B. and Evans, D.H. (1992). Acid-base balance and ion transfers in the spiny dogfish (*Squalus acanthias*) during hypercapnia: a role for ammonia excretion. *J. Exp. Zool.*, **261**, 9-17.

古田岳志・岩田仲弘・菊地弘太郎（2001）．魚類を対象とした毒性試験に関する文献調査．電力中央研究所報告，**U00060**，1-20.

隼野寛史・小島　博・村上　豊・金子豊二（1999）．発眼期シシャモの卵黄嚢上皮に存在する塩類細胞．北海道水産孵化場研報，**53**，67-72.

林　正裕（2004）．二酸化炭素の海洋隔離が海産魚類に与える生理学的影響．学位論文，長崎大学，長崎，93pp.

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. (1993). Acid-base regulation. In "The physiology of fishes" (ed. Evans, D.H.), CRC press, Florida, pp. 343-378.

Hwang, P.P. and Hirano, R. (1985). Effects of environmental salinity on intercellular organization and junctional structure of chloride cells in early stages of teleost development. *J. Exp. Zool.*, **236**, 115-126.

Intergovernmental Panel on Climate Change (2001). Climate Change 2001: The Scientific Basis. A Contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge.

Ishimatsu, A., Kikkawa, T., Hayashi, M., Lee, K.-S. and Kita, J. (2004). Effects of CO_2 on marine fish: larvae and adults. *J. Oceanogr.*, **60**, 731-741.

石松　惇・喜田　潤（1999）．CO_2が魚類に与える影響について．魚雑，**46**，1-13.

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.

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.

吉川貴志（2004）．二酸化炭素が海産魚卵および仔稚魚に与える影響．海洋生物環境研究所研究報告，**7**，1-33.

Kikkawa, T., Ishimatsu, A. and Kita, J. (2003). Acute CO_2 tolerance during the early developmental stages of four marine teleosts. *Environ. Toxicol.*, **18**, 375-382.

気象庁編（1999）．海洋観測指針（第１部）．気象業務支援センター，東京，200pp.

Kita, J. and Ohsumi, T. (2004). Perspectives on biological research for CO_2 ocean sequestration. *J. Oceanogr.*, **60**, 695-703.

日本規格協会（1998）．魚類による急性毒性試験．JIS K 0102工場排水試験方法，日本規格協会，東京，pp. 297-300.

Pörtner, H.O., Langenbuch, M. and Reipschläger, A. (2004). Biological impact of elevated ocean CO_2 concentrations: lessons from animal physiology and earth history. *J. Oceanogr.*, **60**, 705-718.

Sasai, S., Kaneko, T. and Tsukamoto, K. (1998). Extrabranchial chloride cells in early life stages of the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Ichthyol. Res.*, **45**, 95-98.

Sato, T. (2004). Numerical simulation of biological impact caused by direct injection of carbon dioxide in the ocean. *J. Oceanogr.*, **60**, 807-816.

Sato, T., Watanabe, Y., Toyota, K. and Ishizaka, J. (2005). Extended probit mortality model for zooplankton against transient change of PCO_2. *Mar. Pollut. Bull.*, **50**, 975-979.

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 Tiss. Res.*, **288**, 583-590.

Toews, D.P., Holeton, G.F. and Heisler, N. (1983). Regulation of the acid-base status during environmental hypercapnia in the marine teleost fish *Conger conger*. *J. Exp. Biol.*, **107**, 9-20.