

短 報

ミズクラゲ *Aurelia aurita* エフィラに及ぼすCO<sub>2</sub>の急性影響

吉川貴志<sup>\*1</sup>・長谷川一幸<sup>\*2</sup>・箕輪 康<sup>\*3</sup>・中村幸雄<sup>\*3</sup>・喜田 潤<sup>\*3</sup>

Acute effects of elevated CO<sub>2</sub> on ephyrae of the scyphozoan jellyfish, *Aurelia aurita*

Takashi Kikkawa<sup>\*1§</sup>, Kazuyuki Hasegawa<sup>\*2</sup>, Yasushi Minowa<sup>\*3</sup>, Yukio Nakamura<sup>\*3</sup> and Jun Kita<sup>\*3</sup>

**要約:** 大気中二酸化炭素 (CO<sub>2</sub>) 濃度増加やCO<sub>2</sub>の海洋隔離に伴う海洋の高CO<sub>2</sub>化の生物影響を解明する一環として, ミズクラゲのエフィラに及ぼす高CO<sub>2</sub>の急性影響について検討した。エフィラを高CO<sub>2</sub>条件下 (0.5~5% CO<sub>2</sub>) に96時間暴露し, 致死影響および遊泳運動への影響を観察した。設定した高CO<sub>2</sub>暴露に対し, すべてのエフィラが生き残った。本結果からミズクラゲのエフィラは頭足類および魚類等と比較して高いCO<sub>2</sub>耐性を有している可能性が示されたが, 遊泳運動についてはすべてのCO<sub>2</sub>濃度区で対照区と比較して縁弁の拍動回数が有意に低下した。

**キーワード:** 二酸化炭素, 海洋隔離, ミズクラゲ, エフィラ, 毒性, 拍動

**Abstract:** Acute effects of elevated CO<sub>2</sub> on ephyrae of the scyphozoan jellyfish, *Aurelia aurita* were investigated to assess the biological impacts of CO<sub>2</sub> ocean sequestration, which has been proposed as a possible measure to mitigate the climate change caused by increasing atmospheric concentrations of gaseous CO<sub>2</sub>. Mortality and the pulsation rate of ephyrae were observed under hypercapnic conditions of 0.5–5% CO<sub>2</sub> for 96 h. No mortality occurred in any of the test conditions. On the other hand, the pulsation rates of the all CO<sub>2</sub> condition groups were significantly lower than those of the control group (air). These results demonstrate that the ephyrae have much higher CO<sub>2</sub> tolerance than the early developmental stages of cuttlefish and some marine fish previously reported.

**Key words:** carbon dioxide, CO<sub>2</sub> ocean sequestration, *Aurelia aurita*, ephyra, hypercapnia, toxicity, pulsation

大気中の二酸化炭素 (CO<sub>2</sub>) 濃度上昇を抑制する方策のひとつとして, 分離回収されたCO<sub>2</sub>を地中や海洋に隔離する技術の実現可能性について多くの調査研究が行われている (Anderson and Newell, 2004)。CO<sub>2</sub>海洋隔離に伴う生物影響に関して, これまでに浅海の魚類, 貝類, 棘皮類, 甲殻類および頭足類を用いたCO<sub>2</sub>急性影響試験が実施され, 基礎知見が蓄積されてきた (Kita and Ohsumi, 2004; Kikkawa *et al.*, 2008)。海域生

態系への影響予測を高度化させるためには, より多くの生物種についての知見が必要不可欠である。海洋生物のうちクラゲやヤムシ等に代表されるゼラチン質動物プランクトンは, CO<sub>2</sub>海洋隔離が想定されているような海洋中深層に非常に多く生息する生物群集であることが知られている (Robinson, 1983; Hunt and Lindsay, 1999)。ミズクラゲ *Aurelia aurita* はこれらのゼラチン質動物プランクトンのうち, 刺胞動物の鉢虫綱に分

(2010年3月9日受付, 2010年11月30日受理)

\*1 財団法人 海洋生物環境研究所 事務局 (〒162-0801 東京都新宿区山吹町347番地 藤和江戸川橋ビル7階)

§ E-mail: kikkawa@kaiseiken.or.jp

\*2 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)

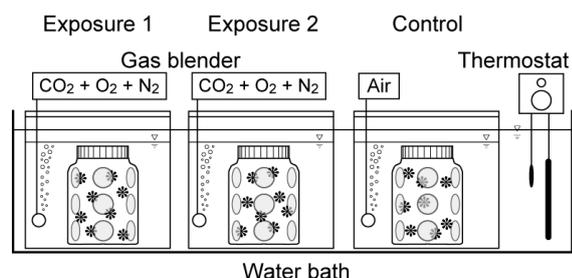
\*3 財団法人 海洋生物環境研究所 実証試験場 (〒945-0017 新潟県柏崎市荒浜4-7-17)

類され、浅海から深所まで広く分布しており、温度、塩分、低酸素等の環境変動に対する耐性も極めて高いことが知られている（安田，1988；Arai，1997）。しかしながらCO<sub>2</sub>に対する本種の応答については一切不明である。本研究では、ミズクラゲのエフィラを0.5～5%（5,000～50,000 ppmv）のCO<sub>2</sub>を含む気体でばっ気した海水に96時間暴露し、死亡率および遊泳時の拍動運動速度の変化を観察し、深海性動物群へのCO<sub>2</sub>影響推定や環境アセスメントの際の基礎となる知見を充実させることを目的とした。なお、本稿はKikkawa *et al.*（2010）が報告しているミズクラゲエフィラに対する高CO<sub>2</sub>影響試験のデータを用いて新たな解析を加えたものである。

**材料と方法** エフィラは財団法人海洋生物環境研究所中央研究所において飼育しているポリプから養成した。ポリプは砂濾過した自然海水を用いて120×45×50cmガラス水槽で流水飼育し、水温および日長の調節は行わなかった。ポリプの餌料としてアルテミア幼生および魚卵を与えた。2005年4月19日にエフィラが出現し、同日および4月25日にエフィラを採取した（以下、4月19日採取群をA群、4月25日採取群をB群とする）。採取時の水温はそれぞれ15.8℃および16.4℃であった。供試個体（A群10個体）の平均短径（±SD）は1.5±0.1mmであった。なお短径は、エフィラを背部あるいは腹部から観察した時のある縁弁基部から口器中心を通して逆側に位置する縁弁基部までの距離とした。高CO<sub>2</sub>暴露はKikkawa *et al.*（2003）の方法に準拠して実施した。暴露装置は、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<sub>2</sub>区および対照区：各14L容）およびガス混合装置（コフロック製ガスブレンダー：GB-3CS）で構成される（Fig. 1）。CO<sub>2</sub>区は、ガス混合装置を用いてCO<sub>2</sub>（0.5～

5%）、O<sub>2</sub>（20.95%）およびN<sub>2</sub>（残余）からなる混合ガスの連続供給（毎分400mL）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。対照区は空気を連続して供給した（毎分400mL）。エフィラは、ポリカーボネイト製沈殿管（1L）側面に防虫ネットを貼った12個の通水孔を備えた収容器に収容した。試験には砂濾過した自然海水を用いた。試験水温は15℃とし、ティアンドデイ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）を用いて連続記録した。海水のpH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-5721C）を用いて試験開始時および24時間おきに測定した。海水塩分は試験前に採水し、Yeo-Kal Environmental Electronics社製Inductively coupled salinometer（601MK III）を用いて電導度比を測定し、海洋観測指針（気象庁編，1999）に従って算出した。

供給CO<sub>2</sub>濃度は0.5、1、3および5%とし、暴露時間は96時間までとした。A群のエフィラを用いて1%および3% CO<sub>2</sub>暴露試験を実施し、B群を用いて0.5%および5% CO<sub>2</sub>暴露試験を行った。正常に遊泳している個体を供試個体とした。飼育水槽からピペットを用いて1Lガラスビーカに収容し、生死確認用として2つの収容器に15個体ずつ収容し合計30個体を暴露した。対照区は1つの収容器で15個体を供試した。24時間ごとに目視観察を行い、動きの見られない個体は実体顕微鏡下で索針を用いて刺激を与えて生死確認を行った。刺激に対して応答しない個体は24時間後に再び確認して、動きがない場合に死亡と見なした。一方、遊泳運動観察のために10個体を収容した収容器を準備し、生死確認用の個体と同時に暴露した。対照区も同様に10個体を供試した。暴露開始後は24時間おきに各濃度区について、同濃度の試験水を満たした50mLガラスビーカにピペットを用いてエフィラを1個体ずつ移し、実体顕微鏡を用いて1分間の縁弁拍動回数を計数した。このとき全ての縁弁を同時に拍動した個体のみを計数し、遊泳運動の指標とした。拍動回数の計数が終了した個体は収容器に戻して暴露を継続した。A群B群それぞれについて、対照区を設定して同様に観察を行った。各濃度区の拍動回数はShirley-Williamsの多重比較検定により対照区の値と比較した。なお、1% CO<sub>2</sub>区における拍動回数観察用の供試個体のうち1個体は、エフィラより発育段階の進んだメテフィラであった。従って1% CO<sub>2</sub>区における拍



**Fig. 1** Schematic of the apparatus used for the CO<sub>2</sub> exposure for jellyfish ephyrae. Animal containers have mesh windows on the wall (after Kikkawa *et al.*, 2010).

**Table 1** pH, temperature and salinity of the media used for this study

CO <sub>2</sub> (%)	Trial	pH <sup>*1</sup>		Temperature (°C) <sup>*2</sup>		Salinity <sup>*3</sup>
		Test group	Control (air)	Test group	Control (air)	
0.5	A	7.11 ± 0.02	8.12 ± 0.02	14.9 ± 0.2	15.0 ± 0.2	35.2
1	B	6.87 ± 0.03	8.10 ± 0.01	14.9 ± 0.2	15.0 ± 0.2	34.9
3	B	6.37 ± 0.02	8.10 ± 0.01	14.9 ± 0.2	15.0 ± 0.2	34.9
5	A	6.15 ± 0.01	8.12 ± 0.02	15.0 ± 0.2	15.0 ± 0.2	35.2

<sup>\*1</sup> mean ± SD of repeated measurements with a 24-hour interval in each condition.

<sup>\*2</sup> mean ± SD; recording interval, 1 min.

<sup>\*3</sup> measured at the beginning of each exposure.

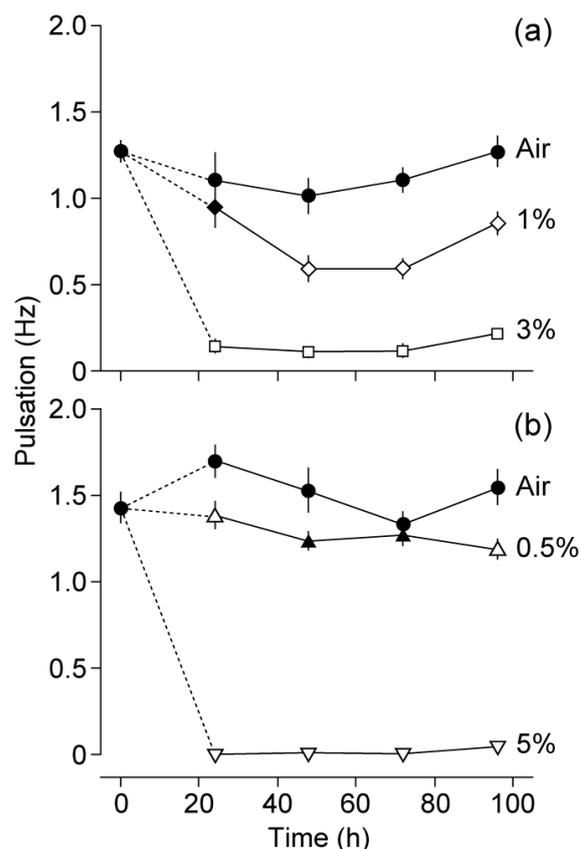


**Fig. 2** Photographs of *Aurelia aurita* ephyrae. Left: normal individual (normocapnia), center: typical atrophy of the marginal lobes of ephyra exposed to 3% or 5% CO<sub>2</sub>, right: inversion and atrophy of the marginal lobes that occurred in normocapnia after 5% CO<sub>2</sub> exposure for 96 h (after Kikkawa *et al.*, 2010).

動回数はこの個体を除外した9個体について解析した。

**結果及び考察** 試験時におけるpH, 水温及び塩分をTable 1に示した。設定したすべてのCO<sub>2</sub>濃度区および対照区で全供試個体が生存した。3%および5% CO<sub>2</sub>区では暴露開始直後に全個体の縁弁拍動が停止して収容器の底に沈んだ。24時間後には再び拍動していたが、3% CO<sub>2</sub>区ではほとんどの個体が遊泳できず収容器の底に沈み、5% CO<sub>2</sub>区においては遊泳個体が全く見られなかった。これらの遊泳しない個体は生存していたが容器の底に沈んで萎縮していた (Fig. 2)。これらの個体は3% CO<sub>2</sub>区よりも5% CO<sub>2</sub>区の方がより強く萎縮し、また暴露時間の延長とともに強く萎縮した。拍動回数は暴露濃度の上昇に伴い低下し、0.5% CO<sub>2</sub>区では24時間後および1% CO<sub>2</sub>区では48時間以上の暴露で対照区と比べて有意な低下が見られ、3%及び5% CO<sub>2</sub>区では24時間以上の暴露で有意差を生じた。 ( $P < 0.025$  (片側検定); Fig. 3)。しかしながら1% CO<sub>2</sub>暴露における72時間後から96時間後にかけては拍動回数の回復が見られた ( $P < 0.05$ , Student's *t*-test; Fig. 3)。この現象はエフィラが高CO<sub>2</sub>環境に馴化し適応する可能性を示唆している。

観察された拍動回数を対照区における拍動回数で除して100を乗じて、各暴露時間および暴露濃度について相対拍動率 (%) を求めた (Fig. 4)。



**Fig. 3** Effect of hypercapnia of 0.5–5% CO<sub>2</sub> on the mean pulsation rate of *Aurelia aurita* ephyrae. Bars show SEM. ( $N=9$  for 1% CO<sub>2</sub> and  $N=10$  for the others). a: trial A (upper), b: trial B (lower). Circles: control (air), triangles: 0.5% CO<sub>2</sub>, diamonds: 1% CO<sub>2</sub>, squares: 3% CO<sub>2</sub> and inverted triangles: 5% CO<sub>2</sub>. Open symbols show significant difference from the pulsation rate of the control group ( $P < 0.025$ ; the Shirley-Williams multiple comparison one-tailed test) (after Kikkawa *et al.*, 2010).

暴露濃度に対する相対拍動率の対数回帰式より、相対拍動率が50%になるCO<sub>2</sub>濃度を算出すると、24時間暴露では1.5%、48時間暴露では1.2%、72時間および96時間暴露ではそれぞれ1.3%であった (Fig. 5)。このように24~96時間の暴露時間でエフィラの拍動回数が50%に低下するCO<sub>2</sub>濃度

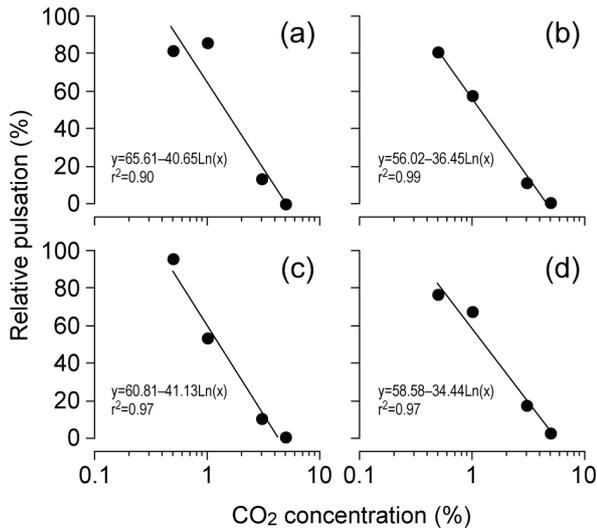
**Table 2** Viabilities of the early developmental stages of marine organisms exposed to 5% CO<sub>2</sub>

Species	Developmental stage at the start of exposure	Exposure duration (h)	Percent normal hatching or survival*1
<i>Sepioteuthis lessoniana</i> *1	Juvenile	48	0
<i>Pagrus major</i> *2	Cleavage	24	0
	Preflexion larva	24	55.5
	Flexion larva	24	3.2
	Postflexion larva	24	24.0
	Juvenile	24	0
<i>Sillago japonica</i> *2	Cleavage	16.7	0
	Preflexion larva	24	23.8
	Flexion larva	24	46.9
	Postflexion larva	24	17.9
	Juvenile	24	0
<i>Paralichthys olivaceus</i> *2	Cleavage	24	56.4*3
	Juvenile	24	50
<i>Euthynnus affinis</i> *2	Cleavage	24	81.6

\*1 Kikkawa *et al.* (2008).

\*2 Kikkawa (2004)

\*3 Data of 3% CO<sub>2</sub>.



**Fig. 4** Relative pulsation of *Aurelia aurita* ephyrae to 0.5–5% CO<sub>2</sub> exposure. Percent relative pulsation was calculated as the ratio of the mean pulsation rate of CO<sub>2</sub> group to that of the control group in Fig. 2. a: 24-h exposure, b: 48-h exposure, c: 72-h exposure, d: 96-h exposure.

は1.2~1.5%程度であると見積もられた。この指標は行動が対照区の50%になる濃度を示すものであり、半数作用濃度EC<sub>50</sub>などの供試個体数の50%が影響を受ける指標とは異なる。しかしながら微量化学物質や他のクラゲ類についての影響データを蓄積することで、EC<sub>50</sub>同様にCO<sub>2</sub>をはじめとして微量化学物質が海洋生物に及ぼす亜致死的な影響を評価するための一指標として有効となりうると

考えられる。CO<sub>2</sub>の海洋生物に対する亜致死影響についてはKurihara *et al.* (2004) がカイアシ類やウニ類について報告している。1% CO<sub>2</sub>暴露により、カイアシ類の*Acartia steueri*では48時間以上で対照区と比較して有意な産卵数の低下が見られ、バフンウニ*Hemicentrotus pulcherrimus*およびナガウニ*Echinometra mathaei*では対照区と比較して有意に受精率が低下し、また3日間暴露したウニの4腕期プルテウス幼生ではバフンウニおよびナガウニとも対照区と比較して有意な体長の低下が見られている (Kurihara *et al.*, 2004)。

エフィラは5% CO<sub>2</sub>の96時間暴露までは全個体が生存した。海産無脊椎動物のうちアオリイカ *Sepioteuthis lessoniana*では、ふ化稚イカを同条件で暴露した場合、48時間以内に100%死亡した例が報告されている (Kikkawa *et al.*, 2008)。また海産魚については、マダイ*Pagrus major*、シロギス*Sillago japonica*、ヒラメ*Paralichthys olivaceus*およびスマ*Euthynnus affinis*などでは1~5%のCO<sub>2</sub>に24時間暴露された場合、胚の正常ふ化率や仔稚魚の生残率が低下する例が知られている (吉川, 2004; Table 2)。海産魚のうち比較的高いCO<sub>2</sub>耐性を有するハマクマノミ*Amphiprion frenatus*の胚でも5% CO<sub>2</sub>に96時間暴露されると死亡する個体が観察されている (50個体中5個体死亡; 吉川ら, 2006)。従って同CO<sub>2</sub>水準に96時間暴露しても死亡が見られな

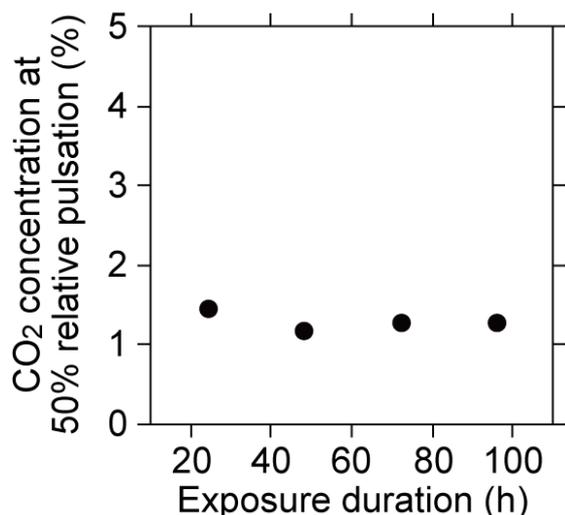


Fig. 5 Time course of CO<sub>2</sub> concentration showing 50% relative pulsation of *Aurelia aurita* ephyrae. Values were calculated from the regression formulas in Fig. 4.

かったエフィラはこれら魚類の胚や仔稚よりも高いCO<sub>2</sub>耐性を有していると考えられる。

本実験で設定した5%以下のCO<sub>2</sub>濃度は、CO<sub>2</sub>海洋隔離のために海水中へCO<sub>2</sub>を放出した場合の放出直後における予測される現場CO<sub>2</sub>濃度変動の範囲に相当する (Sato, 2004)。本実験結果からエフィラは3%以上のCO<sub>2</sub>濃度では遊泳を一旦停止した。従って海洋でエフィラがこのような濃度に暴露された場合、そのまま深部へ沈降する可能性がある。またCO<sub>2</sub>海洋隔離の現場では、放出された液滴CO<sub>2</sub>は周囲の海水に溶解しながら上昇するとされており、放出点近傍域のCO<sub>2</sub>濃度は時間的・空間的に変動すると予想されている (Sato and Sato, 2002; Sato, 2004)。このため、海産魚類およびカイアシ類では暴露CO<sub>2</sub>濃度を段階的に変動させた時の死亡率が検討されている (吉川, 2004; Sato *et al.*, 2005; 吉川ら, 2006; Kikkawa *et al.*, 2006)。海産魚類では高濃度のCO<sub>2</sub>環境から急激に対照区環境に個体を移すと、供試個体が死亡することが知られている (吉川, 2004; 吉川ら, 2006; Kikkawa *et al.*, 2006)。本実験でも96時間の暴露が終了した3% CO<sub>2</sub>区のエフィラを対照区水槽に收容して24時間後に観察を行った。その結果、数個体のエフィラが再び遊泳を開始した。一方、5% CO<sub>2</sub>区のエフィラで同様の操作をした場合にはこのような回復が見られず、死亡する個体は見られなかったが傘の方向が反転する個体が観察された (Fig. 2)。このような形態の異常を示した個体はその後生残できないとされてい

る (青山, 私信)。

本報告で設定した実験条件では致死CO<sub>2</sub>濃度は得られなかった。半数生存限界値を求めるためには、さらに高いCO<sub>2</sub>濃度を用いた試験を実施する必要がある。またCO<sub>2</sub>影響を予測する精度を高めるためには、呼吸、摂餌および成長等に対する亜致死影響や、遅発的な致死影響、実験温度による影響の違い等の知見も非常に重要であると考えられる。冒頭で述べたように、ゼラチン質動物プランクトンは、CO<sub>2</sub>海洋隔離が想定される海洋中深層に多数生息する生物であるにも関わらず、CO<sub>2</sub>による影響についての知見がない。ミズクラゲのようなゼラチン質動物プランクトンのCO<sub>2</sub>影響研究はCO<sub>2</sub>海洋隔離の生態系影響を検討する上で大変重要である。本実験で扱ったミズクラゲは刺胞動物門に属するが、天然にはカブトクラゲやウリクラゲ等の属する有櫛動物門のクラゲも多く存在している。これらの有櫛動物のクラゲに対するCO<sub>2</sub>影響に関しても知見がなく、今後の調査が必要とされる重要な生物であると考えられる。

#### 謝 辞

本実験を進めるにあたり貴重なご助言を賜った水産大学校水産学研究科教授、上野俊士郎博士に御礼申し上げる。本稿の執筆にあたりご指導頂いた東京大学名誉教授、平野禮次郎博士および冲山宗雄博士、(財)海洋生物環境研究所、城戸勝利博士、清野通康博士、木下秀明博士および土田修二博士に記して深謝する。

#### 引用文献

- Anderson, S. and Newell, R. (2004). Prospects for carbon capture and storage technologies. *Annu. Rev. Environ. Resour.*, **29**, 109–142.
- Arai, M.N. (1997). *A Functional Biology of Scyphozoa*. Chapman & Hall, London, 316pp.
- Hunt, J.C. and Lindsay, D.J. (1999). Methodology for creating an observational database of midwater fauna using submersibles: results from Sagami Bay, Japan. *Plankton Biol. Ecol.*, **46**, 75–87.
- 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. 海生研研報, **7**, 1–33.
- 吉川貴志・長谷川一幸・箕輪 康・瀬戸熊卓見・喜田 潤 (2006). ハマクマノミ (*Amphiprion frenatus*) 卵のCO<sub>2</sub>耐性. 海生研研報, **9**,

- 47–54.
- Kikkawa, T., Ishimatsu, A. and Kita, J. (2003). Acute CO<sub>2</sub> tolerance during the early developmental stages of four marine teleosts. *Environ. Toxicol.*, **18**, 375–382.
- Kikkawa, T., Minowa, Y., Nakamura, Y., Kita, J. and Ishimatsu, A. (2010). Swimming inhibition by elevated pCO<sub>2</sub> in ephyrae of the scyphozoan jellyfish, *Aurelia*. *Plankton Benthos Res.*, **5**, 119–122.
- Kikkawa, T., Sato, T., Kita, J. and Ishimatsu, A. (2006). Acute toxicity of temporally varying seawater CO<sub>2</sub> conditions on juveniles of Japanese sillago (*Sillago japonica*). *Mar. Pollut. Bull.*, **52**, 621–625.
- Kikkawa, T., Watanabe, Y., Katayama, Y., Kita, J. and Ishimatsu, A. (2008). Acute CO<sub>2</sub> tolerance limits of juveniles of three marine invertebrates, *Sepia lycidas*, *Sepioteuthis lessoniana*, and *Marsupenaeus japonicus*. *Plankton Benthos Res.*, **3**, 184–187.
- 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<sub>2</sub> ocean sequestration. *J. Oceanogr.*, **60**, 695–703.
- Kurihara H., Shimode, S. and Shirayama, Y. (2004). Sub-lethal effects of elevated concentration of CO<sub>2</sub> on planktonic copepods and sea urchins. *J. Oceanogr.*, **60**, 743–750.
- Robinson, B.H. (1983). Midwater biological research with the WASP ADS. *MTS J.*, **17**, 21–27.
- 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. and Sato, K. (2002). Numerical prediction of the dilution process and its biological impacts in CO<sub>2</sub> ocean sequestration. *J. Mar. Sci. Technol.*, **6**, 169–180.
- Sato, T., Watanabe, Y., Toyota, K. and Ishizaka, J. (2005). Extended probit mortality model for zooplankton against transient change of PCO<sub>2</sub>. *Mar. Pollut. Bull.*, **50**, 975–979.
- 安田 徹 (1988). ミズクラゲの研究. 水産研究叢書37. 日本水産資源保護協会, 東京, 139pp.