

課題名 2A-1203 海洋生物が受ける温暖化と海洋酸性化の複合影響の実験的研究

課題代表者名 野尻 幸宏（独立行政法人国立環境研究所地球環境研究グループ上級主席研究員）

研究実施期間 平成24～26年度

累計予算額 132,365千円（うち26年度44,869千円）
 予算額は、間接経費を含む。

本研究のキーワード 二酸化炭素、海洋酸性化、地球温暖化、沿岸生物、複合影響、サンゴ、水産有用魚種、飼育実験、植物プランクトン、有機炭素生産

研究体制

- (1) 海洋生物飼育実験用CO₂分圧制御と実験管理手法の提供（独立行政法人国立環境研究所）
- (2) 我が国周辺のサンゴ種の成長への水温と海洋酸性化の影響（独立行政法人産業技術総合研究所）
- (3) 海洋生物の再生産過程における水温と海洋酸性化の影響（公益財団法人海洋生物環境研究所）
- (4) 植物プランクトンの増殖における水温と海洋酸性化の影響（一般財団法人電力中央研究所）

研究概要

1. はじめに（研究背景等）

CO₂排出量増加は大気CO₂濃度上昇を通して、地球温暖化と海洋酸性化を同時進行させている。海洋生物は、温暖化のみならず人為起源CO₂の直接影響として海洋酸性化影響を受け得るため、同時進行を踏まえた複合影響評価が必要である。技術・設備の実現性と研究ニーズから、日本周辺の北限域サンゴ種、水産有用魚種、珪藻・円石藻等の植物プランクトン種を研究対象とした。参画機関の協力で先駆的なCO₂制御系を活用する飼育・培養実験を行い、地球温暖化と海洋酸性化の近未来影響を評価する実験的研究を行う。成果として、沿岸海洋生態系変化予測、水産資源将来予測、炭素循環将来予測等に活用される基礎的な科学的知見が期待される。水温とCO₂の正確な制御という物理化学面と、対象生物種の入手・維持という生物面双方の技術・設備・経験がない限り、環境制御飼育実験には新たな投資や経験蓄積を他に求めることが必要となる。そこで、参画機関の技術・設備からの実現性と世界的研究ニーズを考慮して研究対象を設定し、世界先端技術を用いた飼育による生物影響評価実験をデザインした。

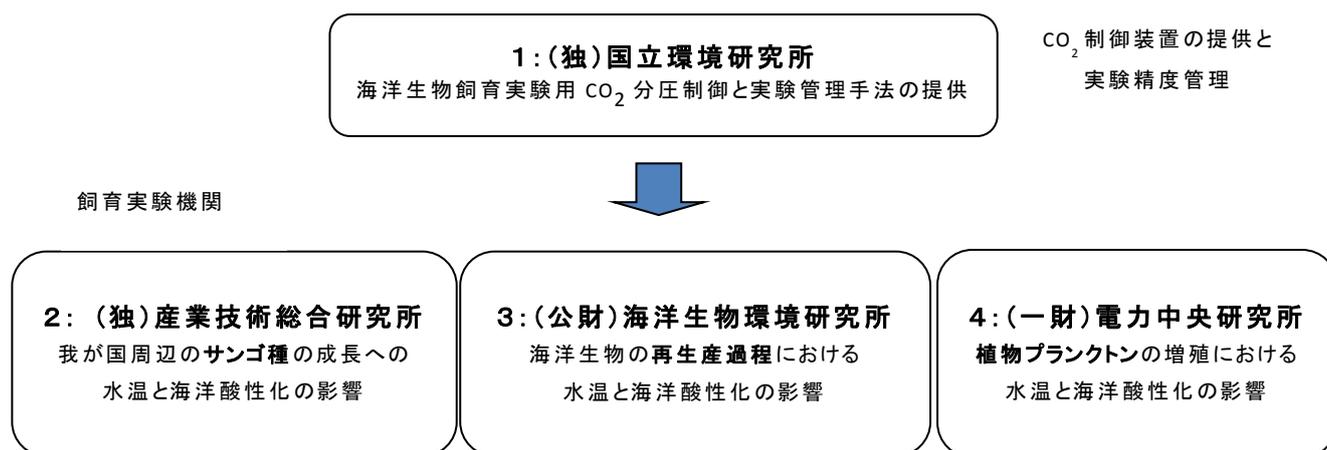


図1 研究体制

2. 研究開発目的

わが国沿岸で水温上昇が原因となって急速な分布域北上が確認されているサンゴは、その分布域変化が沿岸生態系変化を引き起こす可能性があるものの、大気CO₂濃度増大による炭酸カルシウム飽和度低下は石灰化を抑制するので北上に制約がかかる可能性がある。ただし、北上サンゴ種自体のCO₂に対する応答性が知られていないためその予測は難しい。北上サンゴ種では、高水温・低水温ともにその生息域を決める要因となるので、本課題では水温とCO₂の複合影響を飼育実験から明らかにする。

一般に生物では再生産プロセスが環境因子の変化に対して脆弱であり、CO₂に対する急性毒性レベル

が高い魚類においても、今後予想される大気CO₂増加レベルでの影響を評価する必要がある。しかしながら、影響評価実験例は飼育実験が容易な極小型魚種に限られている。そこで世界でも例のない大型水槽でのCO₂制御を行い、有用魚種を対象とする影響評価実験を行う。産卵前から高CO₂環境に順化させた上で、産卵・受精から稚魚成長段階における水温とCO₂の複合影響を明らかにする。これは、今後の水産資源への海洋酸性化影響を評価するために重要である。

植物プランクトンは、海洋表層の炭素循環の出発点であり、昇温とCO₂増大という環境変化が生産に及ぼす影響は、気候フィードバック解明のカギであるが、現実海洋の応答を評価するには、種レベル実験から大規模なメソコスム実験までが必要とされている。ここでは、珪藻と円石藻という石灰化をしない群とする群を対照して、これまでほとんど実験例のない昇温とCO₂濃度増加の複合影響を、単離種による実験室レベル実験と自然プランクトン群集による現場型培養実験の両者から評価する。

評価実験に必要なCO₂濃度制御については、高度な実験管理技術を共通に利用して実施する。

3. 研究開発の方法

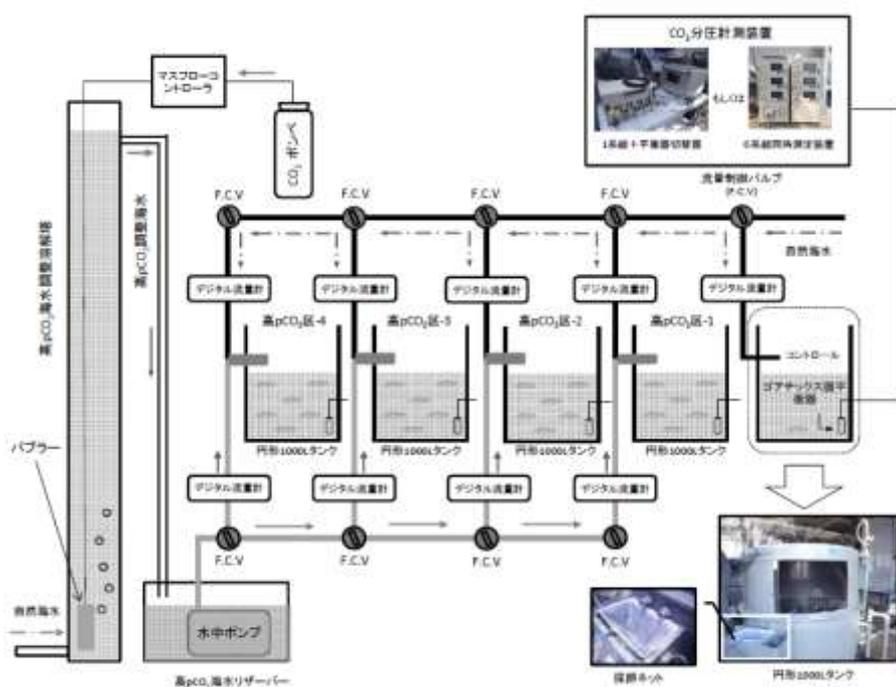
(1) 海洋生物飼育実験用CO₂分圧制御と実験管理手法の提供

本サブテーマは、図1の研究組織において技術的基盤を提供するものであり、本研究計画が目的とするCO₂分圧と水温の両方を変化させて生物の応答を見る実験に適した海洋生物飼育実験用CO₂分圧制御装置を開発運用することが目的である。水槽の海水CO₂分圧の新しい制御法として、海水に純CO₂ガスを溶解して高濃度のCO₂を含む海水を生成し、それと原海水を定量的に混合する手法を開発し、本研究課題では利用することとした。先行課題では、海洋生物飼育実験用CO₂分圧制御実験装置として、海水を濃度既知のCO₂を含む空気でバブリングして目的CO₂分圧を達成し、合わせて達成度を分析確認するものを開発し（AICAL装置）、国内の連携研究機関で利用してきた。しかし、本研究計画が目的とするCO₂分圧と水温の両方を変化させて生物の応答を見る実験での利用には、2点の問題があった。ひとつは海水の温度を変化させると、同時に海水のCO₂分圧が化学平衡のために変化することである。もうひとつは魚類の再生産実験を行うには少なくとも1tスケールのかけ流し水槽のCO₂分圧を制御する必要があり、AICAL装置の数十倍の水量確保が必要なことである。この新制御法を用いるには、海水が目的CO₂分圧に達したかどうかを計測する必要があるが、先行研究の過程で開発した投げ込み平衡器式CO₂分圧計測装置で確認するシステムとした。

図(1)-1に魚類の再生産実験のために海洋生物環境研究所柏崎実証試験場の屋内実験場で組みあげた飼育装置全体構成図を示す。平成24年の実験開始では、先行課題で開発した投げ込み平衡器（5mm径ゴアテックス管5m巻）式二酸化炭素分圧計測装置（赤外分光計1チャンネル：紀本電子工業製CO2-09型）と平衡器5連自動切り替え装置を組み合わせ、5台の水槽のCO₂分圧の順次計測を可能とした。

平成25年度以降は、上記システムを参考に開発した6チャンネル同時計測装置（紀本電子工業製、SDC-12型）が導入され、魚類の再生産実験、サンゴの飼育実験を効率化した。

また、海洋生物環境研究所柏崎実証試験場ではさらに大型の水槽を用いるCO₂分圧制御実験を行った。野外に設置された10t水槽3台のCO₂分圧を順次計測できるように可搬型二酸化炭素計を調整し、CO₂ガスを海水に溶解して高濃度CO₂海水を調整する溶解塔、マスフローコントローラ、海水流量計などの部品の多くを、全体の大容量化に合わせてスケールアップした。平成26年度の実験においては、3台の10t水槽で、かけ流



図(1)-1 海洋生物環境研究所実証試験場（新潟県柏崎市）施設にセットアップした1t水槽による魚類再生産実験用CO₂分圧制御海洋生物飼育装置の概念図。

し水の流量は0.5回転/h、すなわち約80L/hという大流量とし、光環境は自然日長の飼育環境としてマダイの再生産実験を行った。

(2) 我が国周辺のサンゴ種の成長への水温と海洋酸性化の影響

地球温暖化による海水温上昇の影響により、わが国の九州から本州に掛けての沿岸で急速な分布域北上が確認されているサンゴ種（北上種）があるが、分布域の変化が沿岸生態系の変化をもたらす可能性があるものの、大気CO₂濃度増大による炭酸カルシウム飽和度低下が石灰化を抑制するので分布域移動に制約がかかる可能性がある。ただし、北上種を含め、温帯性サンゴ自体のCO₂分圧に対する応答性が知られていないため確度の高い予測は難しい。温帯性サンゴでは、高水温・低水温ともその生息域を決める要因となるので、水温とCO₂分圧の複合影響を飼育実験から明らかにする。

研究課題初年度の平成24年度には、日本周辺域の北限域サンゴとして代表的なキクメイシモドキと、北上種を含む数種のサンゴについて、海水のCO₂分圧および水温を調整した水槽からの掛け流し配水による長期室内飼育実験系を確立した。各種の飼育環境条件や、照明機器や水槽等の飼育関連装置の検討を進めつつ、現在のCO₂分圧条件下で、多段階に水温設定した飼育実験により、サンゴの石灰化と成長が受ける水温影響を評価した。本州沿岸のサンゴ類のうち、急速に北上している種（北上種）、北限域に分布するが北上していない種（北限種）が知られている。まず、実験に必要な我が国沿岸のサンゴの採取とその長期畜養を行った。2012年6月に静岡県賀茂郡西伊豆町において採取された温帯性サンゴを公益財団法人海洋生物環境研究所（新潟県柏崎市）に輸送して実験に用いた。キクメイシ *Favia speciosa* のほか、サンゴ北限種として代表的なヒメエダミドリイシ *Acropora pruinosa*、北上種として代表的な *Acropora solitaryensis* とエンタクミドリイシ *Acropora sp.* などの種が採取された。また、2012年10月下旬には、和歌山県東牟婁郡串本町において、ヒメエダミドリイシ *Acropora pruinosa* とスギノキミドリイシ *Acropora muricata*、クシハダミドリイシ *Acropora hyacinthus*、そしてキクメイシモドキ *Oulastrea crispata* を採取し、同じく海洋生物環境研究所に移送して実験に用いた。海洋生物環境研究所では、採取されたサンゴについて、200 Lアクリル水槽にて長期畜養実験を行なった。蓄養条件として適切な水温、光条件、水質の調整を行うとともに、藻類の発生を防ぐために、サンゴに影響がなく藻類を摂食するサザエ、クボガイ、タツナミガイ等の藻食動物を各水槽内に入れ、サンゴの健康的な維持に努めた。

本研究課題で可能としたCO₂の精密制御技術を生かし、温帯性サンゴ類の骨格成長速度の温度依存性を検討するために、長期飼育が容易と判断されたエンタクミドリイシ等を対象に、2つの段階恒温飼育実験を実施した。最初の実験では、温度を5段階（13℃、17℃、21℃、25℃、29℃）として、さらに各温度区の二酸化炭素分圧（pCO₂）をほぼ一定にすることとした。原海水から、冷却および加熱により温度を調整された海水は、その温度に応じてCO₂分圧が変化するが、低温区ではCO₂分圧が低下するため、CO₂ガスを添加してCO₂分圧を一定化させた。この結果、低温区において炭酸塩（アラゴナイト）の飽和度（Ω）の低下が生じる。そこで、この第1の実験を「Ω調整実験」とした。第2の実験では、各温度区の炭酸系には操作を施さなかった。原海水から、冷却および加熱により得られた水温区は、その温度差に応じてCO₂分圧が変化するが、CO₂ガスを添加しないため、低温区においてもΩ値の低下は大きくない。結果としてΩ値は高温区から2.4、2.4、2.3、2.2、2.1と比較的狭い範囲に保たれた。この第2の実験を「Ω未調整実験」とした。

平成25年度には、前年度の検討結果を踏まえ、北上種を含む温帯性サンゴのうち飼育の容易なものを選定し、サンゴの成長期を想定した複合影響評価実験を行なうことを目標とした。具体的にはCO₂分圧を、現状の値を含め3段階以上に、さらに水温を現状と2℃程度上昇させた2段階の実験条件を設定してサンゴを飼育し、海水のアラレ石飽和度が石灰化量に与える影響を評価した。また、これまでの飼育実験で、期間中に成長した骨格について走査型電子顕微鏡観察を行って、骨格微細構造への影響の有無を検討した。

平成26年度には、実験対象種を拡大して長期飼育実験を行い、水温上昇と高CO₂の複合効果による石灰化と成長への影響を評価した。23℃および26℃の水温2条件において将来のCO₂排出シナリオによる大気CO₂濃度範囲を考慮しCO₂分圧を400、750、1200 μatmの3条件に変えて飼育実験を行った。

(3) 海洋生物の再生産過程における水温と海洋酸性化の影響

海洋酸性化の生物影響についての知見は、単一の生活史段階への影響や小型魚類について調べたものが多く、複数の生活史段階を含む魚類の再生産過程や水産有用魚種を対象とした研究例はほとんどない。また、水産有用種への水温と高CO₂分圧の複合影響を調べた研究例もない。そこで、これまでに研究例のない水産有用種であるシロギス (*Sillago japonica*) とマダイ (*Pagrus major*) を用いて、

魚類の再生産過程における水温と海洋酸性化の影響評価実験を行った。シロギスは、東アジアに広く分布し、北海道以南の日本各地の沿岸海域に広く分布しており、漁業及び遊漁の主要な対象種の一つとなっている。また、マダイは北海道以南から南シナ海北部までの北西太平洋に分布しており、高級魚として扱われる漁業の主要な対象種の一つとなっている。

具体的には、下記の5つの項目についての研究を行った。(1) シロギスの産卵適水温を調査した。(2) 飼育海水のCO₂分圧を変化させた条件を設け、産卵適水温下において酸性化がシロギスの再生産過程に及ぼす単純影響を調査した。(3) 飼育海水の水温とCO₂分圧を個別に変化させた条件及び同時に変化させた条件を設け、温暖化と酸性化がシロギスの再生産過程に及ぼす複合影響を調査した。(4) 産卵時の水温とCO₂分圧の違いによるシロギス卵のCO₂に対する耐性変化を調査した。(5) 開発した大型水槽(容量10t)におけるCO₂分圧の制御方法の有効性をマダイの産卵実験によって検証した。

ここでは、中心的な実験である(2)の実験法をまとめる。確立した容量1t水槽におけるCO₂分圧の制御方法を用いてシロギス親魚の産卵実験を行った。供試魚は、新潟県柏崎市地先にて釣獲後、海洋生物環境研究所実証試験場において1ヶ月以上予備飼育した天然魚を主に用いた。各実験水槽には、供試魚を雌雄各3個体の合計6個体として収容した。実験前に飼育海水の水温を自然水温から26℃へ1日に約1℃の割合で上昇させた。全ての実験水槽で産卵を確認した後、高CO₂分圧区の実験水槽4基において、飼育海水のCO₂分圧を徐々に上昇させて設定CO₂分圧へ変更した。飼育海水のCO₂分圧は、自然海水のCO₂分圧(対照)と高CO₂分圧条件として850、1,400、2,400及び4,000 μ atmの5段階に設定した。実験期間中の光条件は、水槽内に40W白熱灯1基を設置し日長を15時間明期、9時間暗期の長日条件に調整した。1回の産卵実験の期間はCO₂分圧が設定分圧になった時から4週間とし、産卵実験は合計3回繰り返して実施した。実験中は毎日、実験水槽のそばに設置した集卵水槽において卵の有無を確認した。卵が認められた場合、産卵数、浮上卵率及び浮上卵の正常発生率を求めた。産卵があった場合、卵の孵化実験を行った。供試材料は、各実験水槽で回収された産出後およそ14時間経過した受精卵とした。この受精卵10個を、各実験区の実験海水を満たした容量100 mLのスクリュウ管瓶にパスツールピペットで移し替えた後、26℃の恒温水槽へ約24時間静置した。静置後はスクリュウ管瓶内の供試材料について、正常孵化個体、奇形孵化個体、孵化後死亡個体、未孵化卵及び死卵を計数し、正常孵化率を求めた。シロギス卵の孵化実験で孵化した仔魚を用いて、仔魚の成長実験を行った。供試材料は、スクリュウ管瓶内で孵化した正常孵化個体とした。これらの個体は、孵化後約2日齢の仔魚である。仔魚は麻酔を施した後に、パスツールピペットを使ってスライドガラスへ移し、実体顕微鏡を用いて観察した。そして、仔魚全体と左右の耳胞像をデジタルカメラで撮影した。デジタル画像は、画像解析ソフトウェアに取り込んで解析し、仔魚の脊索長と左右それぞれの耳胞の面積を計測した。成長実験は、1つの実験区について約20個体の仔魚の観察を行い、各実験区について5回繰り返した。

(4) 植物プランクトンの増殖における水温と海洋酸性化の影響

本サブテーマでは、植物プランクトンの増殖速度と生産する有機物の量および質が水温とCO₂分圧が増加した環境下においてどのように変化するかを培養実験により明らかにする。海洋生態系における重要性が高い二大藻類グループとして珪藻類と円石藻類があげられるが、珪藻類は細胞が珪酸質の被殻に覆われ、円石藻類は細胞の表面に炭酸カルシウムの鱗片である円石を有していることを特徴としている。ここでは、珪藻と円石藻という石灰化をしない群とする群を対照して、これまでほとんど実験例のない水温増加とCO₂分圧増加の複合影響を、単離株による実験室レベル実験と沿岸海水(現場プランクトン群集)による現場型培養実験の両者から評価する。過去の研究では、植物プランクトンの増殖に対してCO₂分圧増加は光量が低い場合は促進効果を、光量が高い場合は阻害効果を示すことが報告されていることから、単離株実験では高光量と低光量において影響評価実験を行って結果を比較する。植物プランクトンが生産した有機物はPOMとDOMに分画し、両者の炭素量を測定する。これにより、粒子態有機炭素(POC)および溶存態有機炭素(DOC)を測定するとともに、粒子態と溶存態の生産比率を明らかにする。また、円石藻および現場プランクトン群集の実験では炭酸カルシウム殻の生産量の変化を明らかにするため粒子態無機炭素(PIC)を測定する。得られた実験的事実に基づき、有機物生産量および炭酸カルシウム生産量が将来の環境下で量的および質的にどのように変化する可能性があるのかを予測・検討する。

単離種の培養実験では、沿岸から外洋に分布する種からモデル藻類を選定した。選定した培養株の増殖特性をもとに、水温は各株の比増殖速度が直線的に増加する水温帯である12、16、20℃の3段階で実施した。光条件は、珪藻、円石藻のそれぞれについて高光量条件と低光量を選んだ。将来のCO₂排出シナリオによる大気CO₂濃度範囲を考慮し、珪藻の培養ではxCO₂調整済みの空気(400、550、750、1000 ppm)を培地に直接バブリングすることによりCO₂分圧を4段階に調節した。円石藻の培養においては、

バブリングにより増殖が阻害されることが明らかとなっているため、実験培地をバブリングせずにCO₂分圧を調節する実験を行うための半連続培養システムを構築した。

現場プランクトン群集を用いた影響評価実験では、2013年10月と2014年8月に、海洋生物環境研究所柏崎実証試験場において実験を実施した。2013年の実験では、CO₂濃度段階が400 ppmと1000 ppmの2段階であったが、2014年の実験では、400, 700, 1000 ppmの3段階とした。水温は現場水温、+2℃、+4℃の3段階とした。実験では、目標のCO₂分圧を達成するため、高CO₂海水を添加しながらCO₂分圧を実測して添加量を調節した。

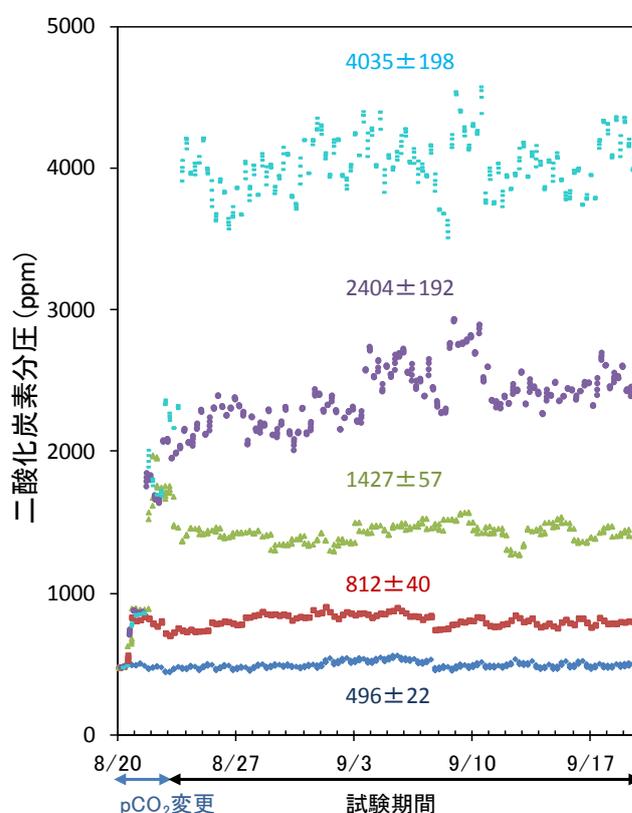
4. 結果及び考察

(1) 海洋生物飼育実験用CO₂分圧制御と実験管理手法の提供

魚類の再生産へのCO₂影響評価実験に用いた装置の概念は図(1)-2に示した。本実験の場合は、CO₂を加えない対照水槽に対し、4つの水槽の海水の全炭酸が等間隔で高まるように設定し、CO₂分圧として約500 (対照)、850、1400、2400および4000 μatmになった。実験期間中のCO₂分圧変動の例を図3に示す。CO₂分圧の異なる各濃度区の実測値は3回の繰り返し実験において860±60、1400±50、2500±60および4100±80 μatm (Mean±SD、n=3) となり、目標とする分圧の範囲に制御・維持することができた。

本研究課題のために製作したCO₂分圧制御飼育装置の海水CO₂分圧計測部をより高精度なCO₂分圧計測装置(紀本電子工業製、MOG-501型)と比較する実験を、平成24年12月から平成25年2月にかけて実施した。冬季の低水温期であったため、CO₂分圧は290~350 μatmの範囲で変動し、典型的な日内変動は10~20 μatmであった。高精度装置との平均的な偏差は±3 μatm程度であった。この実験から、本装置が生物飼育実験での制御に求められる正確さを十分に満たしていることが確認された。また、長期連続運付着藻類が付くことの影響が懸念されたが、目視で著しく汚れているように見える平衡器であっても、水槽内の水流の強い場所に置くことにより±3 μatmの正確さに影響を及ぼさないことが分かった。

平成26年2月に10t水槽のCO₂分圧制御予備実験を行った上で、平成26年6月には大容量(10 t)の屋外設置型水槽のCO₂分圧制御の本実験を行った。15日間にわたり対照区(無制御)、高CO₂分圧条件の1,000および2,000 μatmの実験設定を行い、それぞれ508±27.4、1,060±60.7 μatm、2,140±129 μatm(平均値±SD、n = 54、53、53)という安定的なCO₂分圧の制御を行なうことができた。また、各実験区に收容したマダイについて、全ての水槽で産卵が観察され、大型水産有用魚種の再生産過程における海洋酸性化を評価する実験に本課題で開発したCO₂分圧手法が有効であることが実証された。

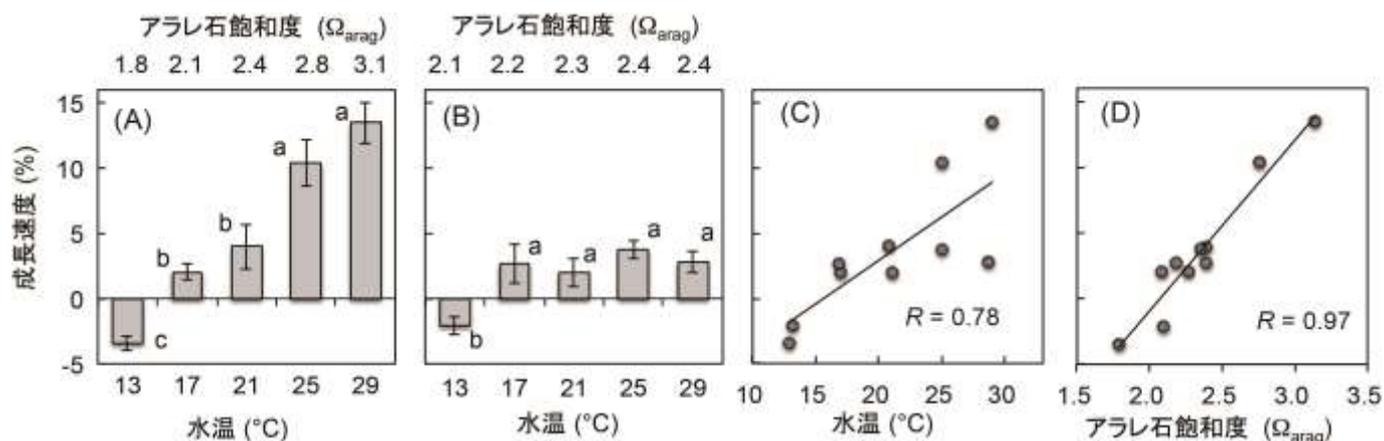


図(1)-2 シロギスの産卵実験における海水CO₂制御結果。平成24年度実験の2回目の結果を例示。

(2) 我が国周辺のサンゴ種の成長への水温と海洋酸性化の影響

温帯性サンゴの骨格性成長速度の温度依存性を「Ω非調整実験」の結果から評価した。炭酸系の調整を行わない「Ω非調整実験」では、アラレ石飽和度Ω aragは13℃区から29℃区にかけて約10%しか変化せず、骨格性成長速度の温度依存性を検討するには適当である。6週間の水中重量の変化では、温帯性サンゴは25℃区で最大骨格成長を示すものが多かった。一方、白化度は25℃区で最低を示したので、温帯性サンゴの最適水温は25℃に近いと考えられる。温帯性サンゴの中で、ヒメエダミドリイシのみ13℃区でも骨格成長が確認された。他のサンゴ種では、斃死し骨格の溶解が進行していた。北限種のヒメエダミドリイシが他の温帯性サンゴと異なっている点は、骨格成長速度が25℃から29℃にかけて、統計的に有意に減少することである。これは、水温の上昇が継続すると、むしろ石灰化量が減少する可能性を示唆している。北上種3種はいずれも25℃から29℃の骨格成長速度に有意な差はなかった。

エンタクミドリイシについて、「 Ω 調整実験」と「 Ω 非調整実験」の2つの実験結果を比較したところ、同一温度区での骨格成長速度が、アラレ石の飽和度 (Ω_{arag}) に対応していることがわかった (図(2)-1)。「 Ω 調整実験」の29°C区では6週間で14%の成長を示したエンタクミドリイシの骨格成長速度は、「 Ω 非調整実験」の29°C区では2.8%に大きく減退するが、同じ水温であってもアラレ石の飽和度 (Ω_{arag}) が「 Ω 調整実験」の3.1から「 Ω 非調整実験」の2.4に低下することに対応すると思われる。すべての実験区のデータをプールして相関を検討すると、エンタクミドリイシの骨格成長速度は、アラレ石の飽和度と水温の両方に統計的に有意な正相関関係を示すが (図(2)-1D)、アラレ石の飽和度の方がより高い相関係数を示し、危険率は極めて小さい。この結果は、エンタクミドリイシの骨格成長速度が海水のアラレ石の飽和度の変動敏感に反応していることを示唆する。海洋酸性化による炭酸塩の飽和度 (アラレ石の飽和度: Ω_{arag}) の低下が、サンゴの成長量に負の影響を与えることが明らかになった。

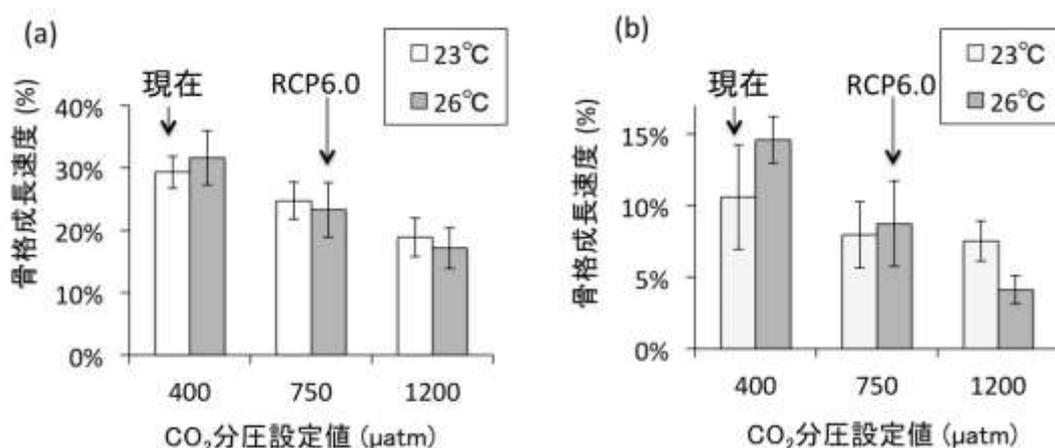


図(2)-1 2つの5段階水温飼育実験におけるエンタクミドリイシの骨格成長速度。(A) Ω 調整実験(pCO_2 一定実験)、(B) Ω 非調整実験、(C)骨格成長量の水温との相関($R=0.78$, $P=0.0075$) (D)骨格成長量のアラレ石飽和度との相関($R=0.96$, $P<0.0001$)。

平成26年度には海水温の上昇と海水の酸性化が、本州南岸に分布する温帯性サンゴに与える影響について、水温および CO_2 分圧を同時に調整した環境で飼育する実験から評価した。温帯性サンゴの代表的な生息地紀伊半島串本の年平均水温に近い約23°Cと、今世紀末に予測される水温上昇約3°Cを加えた26°C区の2つの温度区を設定し、また、 CO_2 分圧は、対照区として現在の約400 μatm 、代表的炭素パス(RCP) 6.5相当の750 μatm 、>RCP6.5相当の1200 μatm の3段階を設定した。長期飼育実験は、北上種のスギノキミドリイシとクシハダミドリイシを対象に、2014年7月から11月の約15週間と、北上種のスギノキミドリイシと北限種のヒメエダミドリイシ等を対象に、2014年11月から2015年1月の約8週間の2回にわたって実施した。

北上種のスギノキミドリイシとクシハダミドリイシを対象にした飼育実験の結果を図(2)-2に示す。現在の海洋条件に相当する400 μatm 区では、3°Cの昇温は、北上種のスギノキミドリイシとクシハダミドリイシの骨格成長を促進させる効果が見られた。

一方、 CO_2 分圧の増加に伴い、26°C区ではこれらの北上種の骨格成長率が低下した。今後、水温の上昇によるサンゴの骨格成長促進と、海洋酸性化による抑制がちょうど釣り合うような状態を経由して、それ以上の海洋酸性化の進行はサンゴの骨格成長を現在よ



図(2)-2 温帯性サンゴの北上種のスギノキミドリイシとクシハダミドリイシを対象にした水温2段階、 CO_2 分圧3段階の長期飼育実験による骨格成長速度の変化。

りも低下させてしまうことが示唆された。一方、北限種のヒメエダミドリイシではこのような傾向は認められなかった。沖縄に分布する熱帯・亜熱帯性の造礁サンゴ類には、海水のpHの低下、あるいはCO₂分圧の上昇に伴って、骨格成長速度が低下する種があることが知られている。生息に好適な水温の上限に近い熱帯・亜熱帯性のサンゴの場合は、地球温暖化による高水温化は、大きなストレスとなると考えられている。しかし、温帯域にあたる日本周辺では今後、地球温暖化によってサンゴ分布域が北上し、また、海洋酸性化による成長抑制から南下が予想されており、今回の実験結果は、基本的にこの傾向を支持する。しかし、北上種と北限種ではその傾向に違いが見られることが示唆された。

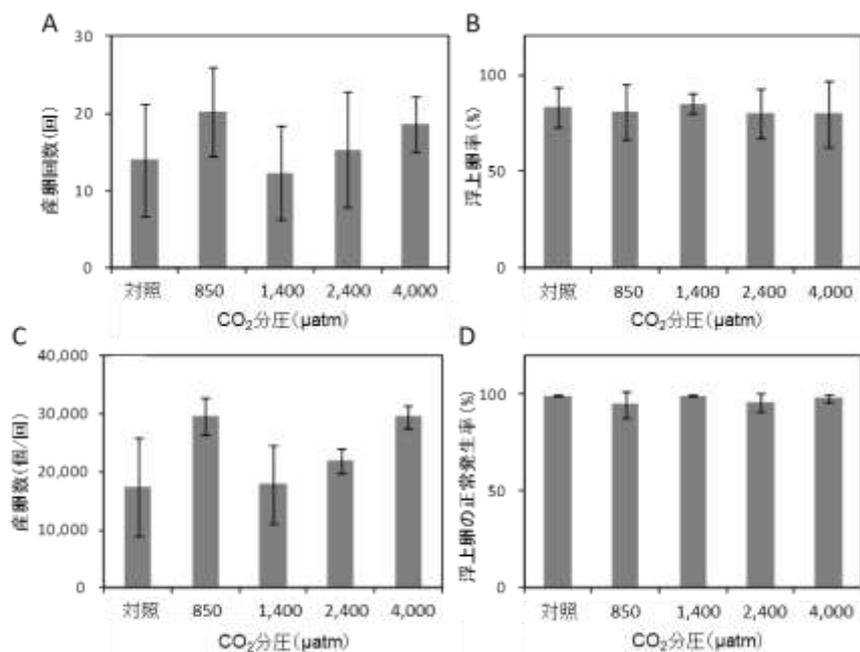
(3) 海洋生物の再生産過程における水温と海洋酸性化の影響

CO₂分圧を850、1,400、2,400及び4,000 μatm に設定した実験区での3回の産卵実験において、シロギスは対照区、850、1,400、2,400及び4,000 μatm のいずれの実験区でも産卵した。各実験区における卵の浮上卵率は60%以上であり、それらの正常発生率は90%以上と高かった。それぞれの実験区間の有意差を検定したところ産卵回数、産卵数、浮上卵率及び浮上卵の正常発生率のいずれについても有意差は確認されなかった

(ANOVA, $p > 0.05$ 、図(3)-1)。卵の孵化実験において、シロギス受精卵は、いずれの実験区でも孵化し、それらの正常孵化率は92%以上であった。各実験区の正常孵化率について各実験区間で有意な変化は検出されなかった(ANOVA, $p > 0.05$)。仔魚の成長実験において、各実験区のシロギス仔魚の脊索長は2.84 \pm 0.057 mm(対照区)、2.87 \pm 0.074 mm(850 μatm 区)、2.80 \pm 0.089 mm(1,400 μatm 区)、2.84 \pm 0.125 mm(2,400 μatm 区)及び2.80 \pm 0.099 mm(4,000 μatm 区)であり、各実験区間の脊索長に有意な変化は認められなかった(ANOVA, $p > 0.05$)。各実験条件下で産出された後に発育したシロギス孵化仔魚の耳胞面積は、左右いずれも各実験区間において有意な差は検出されなかった(ANOVA, $p > 0.05$)。

水温と酸性化の複合影響実験においては、4回の実験の結果、産卵好適水温(26 $^{\circ}\text{C}$)における高CO₂分圧条件下では同水温の対照区と比較して、産卵数、正常卵率、正常発生率、浮上卵の正常孵化率、孵化仔魚の脊索長及び耳胞の面積には有意な変化はみられず、好適水温下でのシロギスの再生産過程は海洋酸性化に対して強い耐性を持つことが示唆された。これは海洋酸性化の単純影響のみを調査した上述の実験結果と同様であり、実験結果の再現性が確認されたといえる。高水温(28 $^{\circ}\text{C}$)においては産卵数、孵化率、孵化仔魚の脊索長及び耳胞の面積について好適水温の場合と同様の傾向が認められ、高水温下においても酸性化に対して耐性を持つことが推察された。しかしながら、正常発生率は、28 $^{\circ}\text{C}$ -2,200 μatm 区において26 $^{\circ}\text{C}$ -2,200 μatm 区と比較すると有意な低下がみられた。これらの結果より、2,200 μatm という極端な海洋酸性化環境下ならば、シロギスの再生産において、さらに+2 $^{\circ}\text{C}$ の高水温の影響が加わるとシロギス卵の正常発生率が低下する複合影響が生じる可能性が示唆された。

卵に対する海洋酸性化の影響は、海洋へ産み出された段階で突然生じるわけではなく、親魚の体内における卵成熟過程から継続することが予想され、卵への影響実験は産卵前にある親魚の段階から検討する必要がある。しかしながら海水魚については、その多くの種類で決まった時季にしか産卵しないことや、繁殖行動を可能とする大型水槽が必要なことなどの制約から、産卵を制御する技術がほとんど確立されておらず、親世代から子世代を一貫して扱った実験がほとんど成立していない。今回、水産資源を担う多数の海水魚と同様に分離浮性卵を大量に生産するシロギスについて、親子の世代間で海洋酸性化影響実験が成立し成果が得られたことは、この技術を他魚種へ展開させることはもとより、海水魚に対する酸性化影響を予測評価する上で極めて意義深い。



図(3)-1 高CO₂分圧下に28日間おかれたシロギスの産卵回数。A: 産卵回数、B: 産出された卵の浮上卵率、C: 1回当たりの産卵回数、D: 浮上卵の正常発生率。棒グラフは3回の産卵実験の平均値、誤差棒はその標準偏差を示す。

(4) 植物プランクトンの増殖における水温と海洋酸性化の影響

本研究では珪藻と円石藻の2大藻類グループの複数種を水温3段階、CO₂分圧4段階、光量2段階の組合せで培養することにより、これまでに例のない規模の影響評価データを獲得できた。全ての結果を俯瞰するため、水温増加とCO₂分圧増加に対する応答を増加、減少、凸凹型に分類するとともに、水温およびCO₂分圧の交互作用(複合影響)が認められるか否かをまとめた(表(4)-1)。

表(4)-1 単離株実験での、水温およびCO₂分圧が増加した際の影響と交互作用の有無のまとめ
 ↑:増加 ↓:減少 凸:中間域で増加 凹:中間域で減少 ○:有意な影響あり ×:有意な影響なし

項目	種	水温増加		CO ₂ 分圧増加		交互作用	
		高光量	低光量	高光量	低光量	高光量	低光量
比増殖速度	<i>T. oceanica</i>	↑	↑	↓	↓	○	○
	<i>T. pseudonana</i>	↑	↑	↑	凹	○	○
	<i>T. weissflogii</i>	↑	↑	↑	↓	○	○
	<i>G. oceanica</i>	↑	↑	×	×	×	×
	<i>E. huxleyi</i>	↑	↑	×	×	×	×
POC生産	<i>T. oceanica</i>	↓	凹	×	↑	×	○
	<i>T. pseudonana</i>	↓	凸	↑	↑	○	○
	<i>T. weissflogii</i>	↓	↑	凸	×	○	×
	<i>G. oceanica</i>	↓	×	×	×	○	×
	<i>E. huxleyi</i>	↓	↓	×	×	×	×
DOC生産	<i>T. oceanica</i>	—	—	—	—	—	—
	<i>T. pseudonana</i>	—	—	—	—	—	—
	<i>T. weissflogii</i>	↓	凸	×	凹	○	○
	<i>G. oceanica</i>	↓	×	×	×	○	×
	<i>E. huxleyi</i>	↓	×	×	×	×	×
DOC割合	<i>T. oceanica</i>	—	—	—	—	—	—
	<i>T. pseudonana</i>	—	—	—	—	—	—
	<i>T. weissflogii</i>	↓	凸	凹	×	○	○
	<i>G. oceanica</i>	↓	×	×	×	×	×
	<i>E. huxleyi</i>	×	×	×	×	×	×
PIC生産量	<i>G. oceanica</i>	↓	×	↑	×	×	×
	<i>E. huxleyi</i>	凸	×	凹	↓	×	×

比増殖速度や有機物生産への影響はCO₂分圧よりも主に水温によってもたらされることがわかる。POC生産は高光量では全5種で水温増加により低下する一致した結果を示したが、低光量では水温増加に対する応答は種特異的だった。DOC生産についても同様の結果が得られた。一方、CO₂分圧増加は有意な影響をもたらすものの、全種が同様の応答を示すことはなかった。さらに、CO₂分圧増加が有意な影響をもたらした場合のほとんどのケースで水温との間の交互作用が認められたことは、CO₂分圧増加への応答が水温毎に異なることを示している。このことは、海洋酸性化の影響を評価する際、選択する試験水温によって、影響の評価結果が異なることを示す。CO₂分圧増加への応答が多様であるという培養実験の事実、将来の海洋生態系の変化を予測しようとする際に十分考慮されなければならない、非常に重要な知見である。

すべての現場実験の実験結果も合わせて考慮すると、水温およびCO₂分圧の増加に対する現場プランクトン群集の応答は実験実施時の水温などの環境条件により変化することがわかった。ただし、変化をもたらす要因は圧倒的に水温増加であることがわかった。CO₂分圧増加の影響はChl-a濃度の増加速度の抑制、POC生産量の促進とPOC:PN比の上昇にのみ認められた。交互作用がほとんど認められないことも特徴である。すなわち、現場プランクトン群集の増殖や有機物生産にかかわる過程はもっぱら水温に依存して変化することを示している。一方、海洋酸性化の影響が懸念される炭酸カルシウム殻生産への阻害作用は本実験からは明確でなかった。

本サブテーマで実施した単離株を用いた室内実験と沿岸海水を用いた現場実験からは、将来の植物プランクトンの動態は主に水温増加に依存して変化し、CO₂分圧増加の影響は比較的小さいことがわかった。植物プランクトンの増殖速度が水温増加に伴って促進される様子は室内および現場実験の両者で一致し、普遍的な結果と考えられる。一方、水温増加に伴う有機炭素生産量の応答は室内実験では減少傾向、現場実験では増加傾向であり、相反する結果となった。これは、室内実験では指数増殖期のみを測定対象としたのに対し、現場実験では増殖期から衰退期までを測定対象としたため、測定期間が異なることに起因したと考えられる。2013年秋季の実験ではCO₂分圧増加が増殖衰退期のプランクトン群集による有機炭素生産にプラス効果をもたらす様子が

捉えられたことから、増殖衰退期の有機炭素生産を詳細に把握することが将来の有機炭素生産量の変化を解明するうえでカギとなることがわかった。また、現場実験では植物プランクトン以外に動物プランクトンや細菌類が有機炭素生産にかかわっていることも結果の違いをもたらしたと推測され、今後はこれらの生物の役割とそれに対する水温とCO₂分圧増加の複合影響を解明することが課題と考えられる。

5. 本研究により得られた主な成果

(1) 科学的意義

先行研究で実施してきた海洋生物飼育において精密にCO₂分圧を調整する技術を発展させることにより、従来行うことが難しかった条件下での生物飼育実験が可能になった。具体的には、海水の水温とCO₂分圧の両者を調整したうえでそのCO₂分圧を計測し、将来の高CO₂と温暖化の両方が現れる条件で海洋生物の飼育を行う技術が確立した。研究課題最終年度までに、日本周辺のサンゴへの温暖化と海洋酸性化の複合影響評価および小型から大型に至る水産有用魚種への温暖化と海洋酸性化の複合影響評価を可能にした。その結果、近未来の日本沿岸のサンゴについては、水温上昇が熱帯性サンゴの北上を進めるが、今世紀後半など二酸化炭素分圧がさらに高まる場合において海洋酸性化影響が北上を抑制する可能性が示唆された。このような実験的研究例は世界で初めてであり、実際に北上サンゴが確認されているわが国でしかできない貴重な研究である。シロギスの再生産過程は、高CO₂による海洋酸性化の単純影響に対しては高い耐性がある。しかし、高水温との複合影響下では正常孵化率の低下に伴うシロギス個体数の低下が引き起こされる可能性が明らかとなった。ただし、このようなCO₂分圧影響が起こりうるのは将来予測される大気CO₂分圧よりはるかに高いレベルであることが分かった。水産有用魚種を用いて、魚類の再生産過程への高水温と海洋酸性化の複合影響評価を行った研究例はこれまでに無く、容量の大きな水槽において流水式でCO₂分圧制御が可能となったことで、従来よりも多様な魚種についての影響評価が可能になったことに意義がある。本研究はこれまでに報告例が少ない、植物プランクトンに対する水温とCO₂分圧増加の複合影響を評価する実験を、単離株を用いた室内培養実験と沿岸海水を用いた現場型培養実験の両者により実施したことから、植物プランクトンに対する水温増加とCO₂分圧増加の影響を相対的に比較することが可能になった。結果として、植物プランクトンの応答はCO₂分圧増加よりも水温増加に依存するものであることが明らかとなった。本研究ではこれに加えて、光量の違いが水温とCO₂分圧の複合影響にもたらす効果も考慮することができた。これら、各サブテーマの成果は本課題で実験的な基盤を整備したことによってはじめて得られた価値の高い科学的成果である。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

研究代表者は、IPCCの第5次評価報告書の執筆(第1作業部会第3章RE、第2作業部会第6章LA)に加わった。2014年に公開されたIPCC第5次評価報告書第2作業部会報告において、海洋酸性化影響に関するメタ分析がなされ、本課題と関連する先行課題(2008年～2010年度)の発表論文6件(先行課題期間中および終了後に印刷出版したもの)が引用された。ただし、本課題の直接の成果論文は、第5次評価報告書に引用されるには時間的な制約で困難であった。

また、研究代表者は中央環境審議会地球環境部会気候変動影響評価等小委員会の検討作業に加わり、海洋生態系への気候変動影響について専門的立場から貢献した。

平成27年2月21日には、本研究課題が主催し「海洋酸性化がわが国周辺の生物に与える影響を評価する」と題する一般向け研究成果報告会を実施した。平成27年3月16日には、那覇市で開催されたIPCC公開シンポジウム「地球温暖化問題について考えよう! 最新の科学と温室効果ガス排出量監視の取りくみ」において、研究代表者と分担者の鈴木淳が本課題の成果に関連する講演を行った。

<行政が活用することが見込まれる成果>

本研究課題は、わが国の沿岸海洋環境にとって重要であるサンゴが温暖化と海洋酸性化で受ける影響予測に関わる研究であり、自然環境保全に意義が大きい。また、温暖化と海洋酸性化で水産有用魚種が受ける影響の評価は社会的意義がある。海洋酸性化の生物影響評価は、海洋への地球温暖化影響を評価する上で極めて重要な観点であるので、次期IPCC評価報告書でも第5次評価報告書と同様に海洋酸性化の生物影響に関してメタ分析がなされると考えられる。メタ分析には、生物種ごとの詳細な評価結果をあまねく収集して解析するので、本課題の成果である生物種毎に影響評価する研究成果が必要であり、今回同様に引用されるものと思われる。

一方で、温暖化と海洋酸性化が海洋生態系に及ぼす影響評価が今後重要性を増すので、植物プランクト

ンに対する水温とCO₂の影響評価結果は、将来予測モデルにぜひ必要となり、次期IPCC評価報告書に寄与することが期待される。

6. 研究成果の主な発表状況

(1) 主な誌上発表

<査読付き論文>

- 1) A. Kato, M. Hikami, N. H. Kumagai, A. Suzuki, Y. Nojiri, and K. Sakai,
“Negative effects of ocean acidification on two crustose coralline species using genetically homogenous samples”,
Marine Environmental Research, 94, 1-6, 2013. doi:10.1016/j.marenvres.2013.10.010
- 2) T. Onitsuka, R. Kimura, T. Ono, H. Takami, and Y. Nojiri,
“Effects of elevated pCO₂ on the early developmental stages of the horned turban, Turbo cornutus”,
Marine Biology, available on line 18 February 2014. doi:10.1007/s00227-014-2405-y
- 3) S. Ohki, T. Irie, M. Inoue, K. Shinmen, H. Kawahata, T. Nakamura, A. Kato, Y. Nojiri, A. Suzuki, K. Sakai, and R. van Woesik,
“Calcification responses of symbiotic and aposymbiotic corals to near-future levels of ocean acidification”,
Biogeosciences, 10, 6807-6814, 2013. doi:10.5194/bg-10-1-2013
- 4) R. Suwa, Y. Nojiri, T. Ono, and Y. Shirayama,
“Effects of low pCO₂ conditions on sea urchin larval size”,
Marine Ecology-An Evolutionary Perspective, 34, 443-450, 2013. doi: 10.1111/maec.1204

(2) 主な口頭発表(学会等)

- 1) 鈴木 淳、林 正裕: 第12回環境研究シンポジウム、東京(2014)
「海洋酸性化がサンゴの成長に与える影響についての飼育実験研究」
- 2) Yukihiro Nojiri: Human Impacts on Oceanic Environment, Ecosystem, and Fisheries, Nagasaki University International Symposium, Nagasaki, Japan (2014)
“Collaboration of Japanese maritime laboratories for CO₂ manipulation experiments assessing impact of ocean acidification on coastal ecosystem”
- 3) 野尻幸宏: 気候変動に関する政府間パネル(IPCC) 公開シンポジウム、那覇 (2015)
「気候変動に関する新たな科学的知見: IPCC第5次評価報告書」
- 4) 鈴木 淳、山野博哉: 気候変動に関する政府間パネル(IPCC) 公開シンポジウム、那覇(2015)
「日本周辺域で見られるサンゴの生息域変化と海洋酸性化」
- 5) 鈴木 淳: 日本地球惑星科学連合大会スペシャルレクチャー、千葉(2015)
「サンゴ、サンゴ礁と地球環境ー生物学と地球科学の連携研究ー」

7. 研究者略歴

課題代表者: 野尻 幸宏

東京大学理学部卒業、理学博士、現在、独立行政法人国立環境研究所地球環境研究センター
上級主席研究員

研究分担者

- 1) 鈴木 淳
東北大学理学部卒業、現在、独立行政法人産業技術総合研究所海洋環境地質研究グループ
研究グループ長
- 2) 林 正裕
長崎大学水産学部卒業、現在、公益財団法人海洋生物環境研究所実証試験場主査研究員
- 3) 吉村 毅
北海道大学水産学部卒業、現在、一般財団法人電力中央研究所環境科学研究所主任研究員

2A-1203 海洋生物が受ける温暖化と海洋酸性化の複合影響の実験的研究

(1) 海洋生物飼育実験用CO₂分圧制御と実験管理手法の提供

独立行政法人国立環境研究所

地球環境研究センター

野尻 幸宏

平成24～26年度累計予算額：46,774千円（うち、平成26年度予算額：17,843千円）

予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

本サブテーマは、研究組織全体の中で技術的基盤を提供するものであり、本研究計画が目的とする二酸化炭素分圧と水温の両方を変化させて生物の応答を見る実験に適した海洋生物飼育実験用二酸化炭素分圧制御装置を開発運用することを目的として実施した。従来装置には海水の温度を変化させると同時に海水の二酸化炭素分圧が化学平衡のために変化する問題があるだけでなく、水産有用魚類の再生産実験を行うには従来装置に比して数十倍の水量を確保する必要があった。そこで、水槽の海水二酸化炭素分圧の新しい制御法として、海水に純二酸化炭素ガスを溶解して高濃度の二酸化炭素を含む海水を生成し、それと原海水を定量的に混合する手法を開発し、本研究課題では利用することとした。

大量の試験海水が必要である魚類の再生産実験においては、投げ込み式平衡器を用いる海水二酸化炭素分圧測定装置を利用し、試験的装置での特性試験を行ったうえで、新規の海水中二酸化炭素分圧制御計測装置を導入し、実際のシロギスの再生産実験を1t水槽5連もしくは6連で実施した。また、マダイの再生産実験には10t水槽が必要とされたために装置をスケールアップして実施を可能とした。これらの装置による二酸化炭素分圧制御は、精度を確認された船上用計測装置で検定した。

サンゴの飼育実験においては、温度と海水中二酸化炭素分圧を同時に精密に制御することが必要であり、試験施設の水温調整海水供給能力を生かし、装置運用を行った。炭酸カルシウム飽和度調整及び非調整実験を行い、サンゴ種の炭酸カルシウム飽和度への応答試験を行った。次に、3段階の水温下での二酸化炭素分圧制御実験を行い温度ごとの二酸化炭素影響を評価した。最終的に水温と二酸化炭素分圧の同時制御を行うことで、サンゴ種が受ける将来影響の評価を行った。

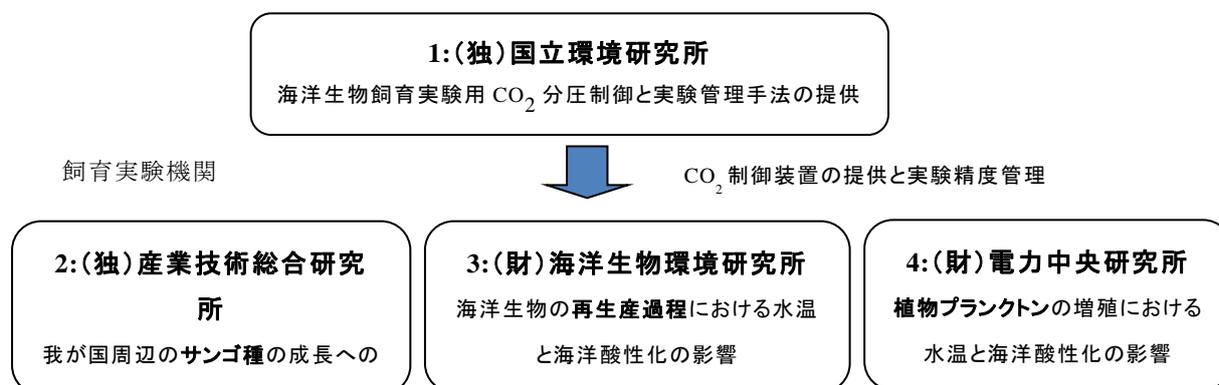
[キーワード]

二酸化炭素、海洋酸性化、地球温暖化、沿岸生物、複合影響

1. はじめに

人為的な二酸化炭素排出量増加は大気二酸化炭素濃度上昇を通して、地球温暖化と海洋酸性化を同時進行させている。海洋生物は、温暖化のみならず人為起源二酸化炭素の直接影響として海洋酸性化の影響を受け得るため、同時進行を踏まえてその複合影響評価が必要である。技術・設備の実現性と研究ニーズから、日本周辺の北限域サンゴ種、水産有用魚種、ケイ藻・円石藻等の

植物プランクトン種を研究対象とした。参画機関の協力のもと、先駆的な二酸化炭素制御系を活用する飼育・培養実験を行い、地球温暖化と海洋酸性化の近未来影響を評価する実験的研究を行う。成果として、沿岸海洋生態系変化予測、水産資源将来予測、炭素循環将来予測等に活用される基礎的な科学的知見が期待される。水温と二酸化炭素の正確な制御という物理化学面と、対象生物種の入手・維持という生物面の両技術・設備がない限り、環境制御飼育実験には新たに大きな投資や長い経験蓄積が必要となる。そこで、技術・設備の実現性と研究ニーズを考慮し研究対象を設定した。本サブテーマは、参加機関が担当する生物飼育実験において、海水の二酸化炭素分圧を制御する技術的基盤を提供する。機器の開発運用支援により、実際の実験の確実な実施を図る。



図(1)-1 本課題の研究体制。

2. 研究開発目的

わが国沿岸で急速な分布域北上が確認されているサンゴは、分布域の変化が沿岸生態系の変化をもたらす可能性があるものの、大気二酸化炭素濃度増大による炭酸カルシウム飽和度低下が石灰化を抑制するので分布域移動に制約がかかる可能性がある。ただし、北上サンゴ種自体の二酸化炭素に対する応答性が知られていないため予測は難しい。北上サンゴ種では、高水温・低水温ともその生息域を決める要因となるので、水温と二酸化炭素の複合影響を飼育実験から明らかにする。一般に生物では再生産プロセスが環境因子の変化に対して脆弱であり、二酸化炭素に対する急性毒性レベルが高い魚類においても、今後予想される大気二酸化炭素増加レベルでの影響を評価する必要がある。しかしながら、影響評価実験例は飼育実験が容易な極小型魚種に限られている。そこでこれまで例のなかった大型水槽での二酸化炭素制御を行い、有用魚種を対象とする影響評価実験を行う。産卵前から高CO₂環境に順化させた上で、産卵・受精から稚魚成長段階における水温と二酸化炭素の複合影響を明らかにする。これは、今後の水産資源への海洋酸性化影響評価に重要である。植物プランクトンは、海洋表層の炭素循環の出発点であり、昇温と二酸化炭素増大という環境変化が生産に及ぼす影響は、気候フィードバック解明のカギであるが、現実海洋の応答を評価するには、種レベル実験から大規模なメソコスム実験までが必要とされている。ここでは、ケイ藻と円石藻という石灰化をしない群とする群を対照して、これまでほとんど実験例のない昇温と二酸化炭素濃度増加の複合影響を、単離種による実験室レベル実験と自然プラン

クトン群集による現場型培養実験の両者から評価する。評価実験に必要な二酸化炭素濃度制御については、高度な実験管理技術を共通に利用して実施する。

本サブテーマは、図(1)-1の研究組織において技術的基盤を提供するものであり、本研究計画が目的とする二酸化炭素分圧と水温の両方を変化させて生物の応答を見る実験に適した海洋生物飼育実験用二酸化炭素分圧制御装置を開発運用することが目的である。従来装置には海水の温度を変化させると同時に海水の二酸化炭素分圧が化学平衡のために変化する問題があるだけでなく、水産有用魚類の再生産実験を行うには従来装置に比して数十倍の水量を確保する必要がある。そこで、水槽の海水二酸化炭素分圧の新しい制御法として、海水に純二酸化炭素ガスを溶解して高濃度の二酸化炭素を含む海水を生成し、それと原海水を定量的に混合する手法を開発し、本研究課題では利用することとした。

3. 研究開発方法

(1) 大型水槽の二酸化炭素分圧調整飼育装置の開発

先行課題では、海洋生物飼育実験用二酸化炭素分圧制御実験装置として、臨海施設が取り込んでいる海水を濃度既知の二酸化炭素を含む空気でバブリングして目的二酸化炭素分圧を達成し、合わせて達成度を分析確認するものを開発し(AICAL装置)、国内の連携研究機関で利用してきた。しかし、本研究計画が目的とする二酸化炭素分圧と水温の両方を変化させて生物の応答を見る実験での利用には、2点の問題があった。ひとつは海水の温度を変化させると、同時に海水の二酸化炭素分圧が化学平衡のために変化する事である。もうひとつは魚類の再生産実験を行うには少なくとも1tスケールのかげ流し水槽の二酸化炭素分圧を制御する必要があり、AICAL装置の数十倍の水量確保が必要な事である。そこで(公財)海洋生物環境研究所実証試験場(新潟県柏崎市、以下、海生研と記述)の施設を用い、300 L水槽で予備実験を行った。海水中二酸化炭素分圧の新制御法として、海水に純二酸化炭素ガスを溶解して高二酸化炭素分圧の海水を作り、それと原海水を定量的に混合する方法を開発した。この際に、目的二酸化炭素分圧に達したかどうかは、先行研究の過程で開発した投げ込み平衡器式二酸化炭素分圧計測装置で確認した。結果は良好で、大容量の二酸化炭素制御が行える目途が立ち、本課題のための新しい二酸化炭素制御実験装置を設計製作した。装置は簡易な二酸化炭素ガスセンサーを用いる二酸化炭素分圧制御部6連を有し、海水・ガス制御系と組み合わせ水水槽6台のCO₂制御と二酸化炭素分圧計測を行うことができるものである。

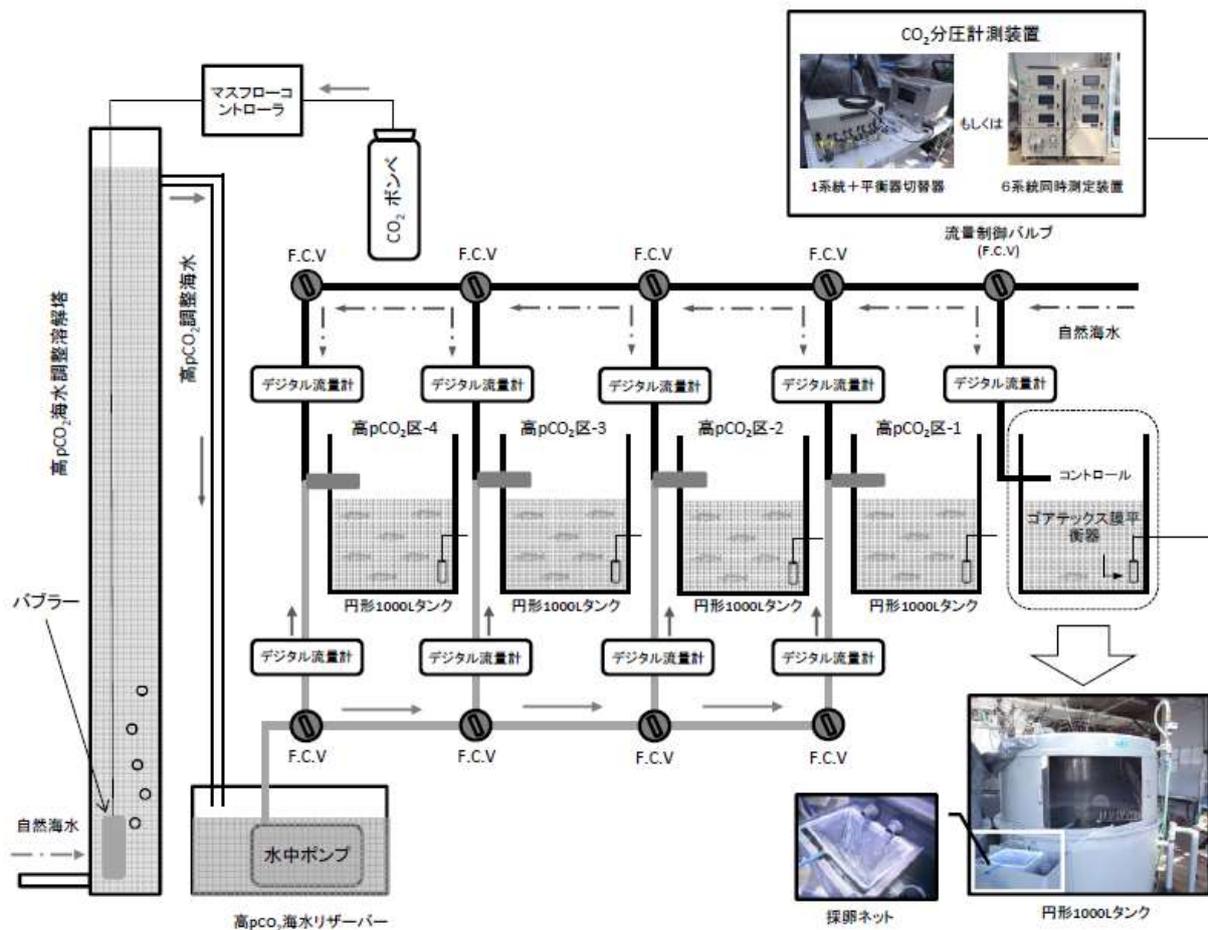
図(1)-2に魚類の再生産実験のために組みあげた飼育装置全体構成図を示す。本課題開始早々の平成24年7月の実験開始には、先行研究で開発した投げ込み平衡器(5mm径ゴアテックス管5m巻)式二酸化炭素分圧計測装置(赤外分光計1チャンネル:紀本電子工業製C02-09型)を使用した。装置に平衡器5連自動切り替え装置を組み合わせ、5台の水槽の二酸化炭素分圧の順次計測を可能とした。海生研には圧力制御された沿岸表層海水供給があるので、デジタル流量計で流量をモニターしながら、流量制御バルブにより安定な流量でタンク毎に供給できる。高二酸化炭素分圧海水調整溶解塔では、海水流に並流溶解するように純二酸化炭素ガスを底部からバブラーで供給する。気泡上昇とともに上端から流れ出るオーバーフロー海水の二酸化炭素濃度を最も高くする方法である。目視観察によれば、標準的な条件で二酸化炭素気泡はほぼ完全溶解していた。そのため、高二酸化炭素分圧海水のリザーバーの二酸化炭素分圧はガス流量と海水流量から計算できる。サ

ブテーマ(3)の項で示すシロギス産卵実験の標準的条件では、その値は約17000 μatm であった。高二酸化炭素分圧海水は、小型水中ポンプで流量を制御し、デジタル流量計で流量をモニターして飼育水槽(1t)に送り、自然海水と水槽の注入口で混合される。水槽に送る水流は、水槽内に回転流を作る目的で水面をたたくよう供給するので、一部の二酸化炭素はガス交換で大気に抜ける。その結果、海水の混合比から想定される二酸化炭素分圧より水槽内の実二酸化炭素分圧は低くなる。本システムの特長は、水槽内の二酸化炭素分圧を実計測できることであり、結果としての水槽の実二酸化炭素分圧を測定するので、目的二酸化炭素分圧となるように高二酸化炭素濃度海水供給量と自然海水混合量を微調整することで、実験区の二酸化炭素分圧を目的値に一定に保つことができる。

平成24年10月に、本課題のための新規装置(紀本電子工業製、SDC-12型)を導入し6系統同時計測が可能となった。シロギス飼育実験の1-2回目は平衡器5連自動切り替え装置で、3回目は6系統同時計測装置で二酸化炭素分圧を計測しながら行った。また、サブテーマ(2)で結果を示すサンゴ飼育実験でも、前半の実験は1系統測定装置を使ったが、後半の実験から6連自動計測装置が使えるようになった。一方、新規に導入したこれらの装置の計測の正確さを確認する目的で、従来から船上二酸化炭素分圧観測に用いてきた高精度な二酸化炭素分圧計測装置(紀本電子工業製、MOG-501型)との、長期の連続比較実験を海生研で行った。高精度装置は、国際相互比較実験等で、正確さが確認されたものである。

平成25年度においては、装置を継続的に実験利用してその精度管理を行うとともに、魚類の再生産実験の対象種を拡大する目的でより大容量の水槽の二酸化炭素分圧制御実験を行った。これまでの実験の水槽サイズは最大1tで屋内設置型であったが、水槽のさらなる大型化は屋外実験になる。そこで、琉球大学熱帯生物圏研究センター瀬底研究施設の協力を得て、屋外で二酸化炭素計測制御装置を利用する実験を行った。本課題向けに製作した6連計測装置(上述)は屋外設置が困難なため、先行研究で開発した可搬型二酸化炭素計を収納庫に入れて屋外に設置した。二酸化炭素溶解塔で高濃度二酸化炭素海水を調整して原海水と定量混合することにより、200 L水槽5連で二酸化炭素分圧の調整を行った。自動平衡器切替器により、5つの水槽の二酸化炭素分圧を順次切り替え測定した。瀬底研究施設では平成25年4月から現在に至るまで長期継続使用中である。水槽で調整した海水を生物飼育実験に利用しており、天然光条件下で生物飼育ができるという大きな長所を確認した。

上記の実績を踏まえ、海生研柏崎で実施を予定している大型水槽を用いる本実験に備えた予備実験を行った。10t水槽3台の CO_2 分圧を順次計測できるように可搬型二酸化炭素計を野外設置した(図(1)-3左)。予定しているマダイの再生産実験に必要な水槽サイズ10tにあわせて、二酸化炭素ガスを海水に溶解して高濃度二酸化炭素海水を調整する溶解塔を100mm径から150mm径へスケールアップし、海水を大流量にしても流速が高まり過ぎないようにした(図(1)-3中)。マスフローコントローラ、海水流量計などの部品の多くを、全体の大容量化に合わせてスケールアップした。平成26年度の実験においては、3台の大型水槽(容量10 t)で、かけ流し水の流量は0.5回転/h、すなわち約80L/hという大流量とし、光環境は自然日長の飼育環境としてマダイの再生産実験を行った。



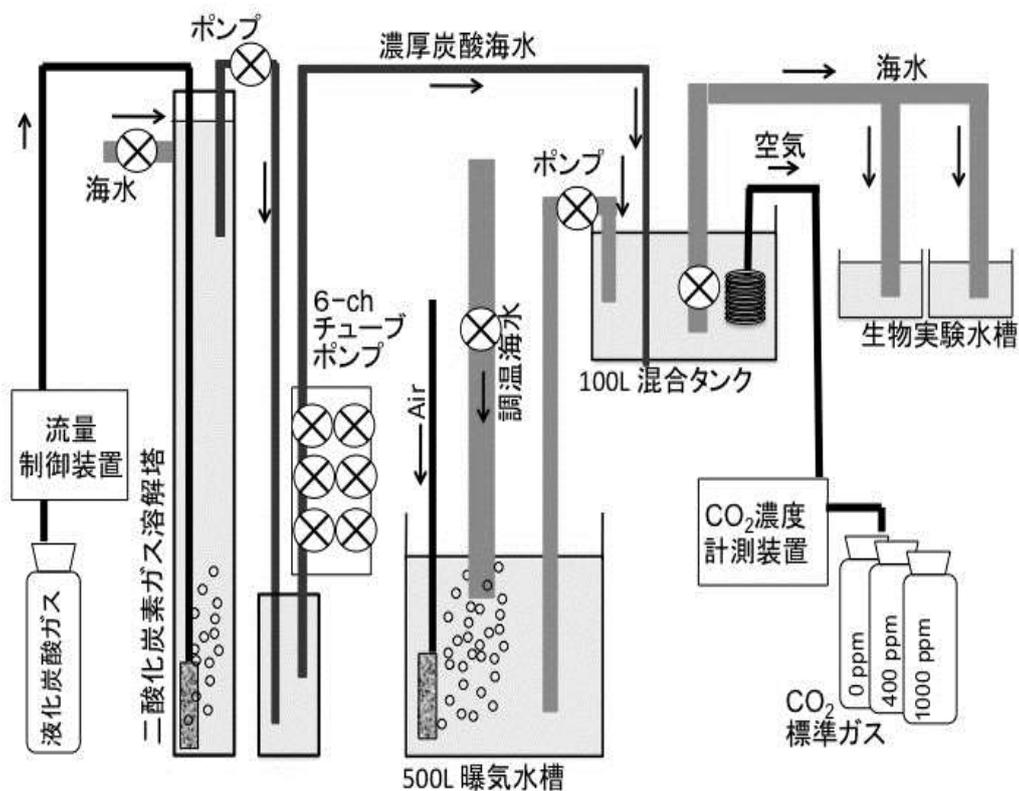
図(1)-2 海洋生物環境研究所実証試験場（新潟県柏崎市）施設にセットアップした1t水槽による魚類再生産実験用二酸化炭素分圧制御海洋生物飼育装置の概念図。



図(1)-3 大型水槽(10t)の二酸化炭素分圧調整予備試験。左：可搬型二酸化炭素分圧計測装置の設置、中：10t水槽の脇に二酸化炭素溶解塔を設置、右：蓄養中のマダイと設置した投げ込み式平衡器。

(2) サンゴの飼育実験用の水温と二酸化炭素分圧を調整する飼育装置の開発

投げ込み平衡器式二酸化炭素分圧測定装置、および、本課題のために新規に設計製作した海洋生物飼育実験用二酸化炭素分圧制御装置を、温帯性サンゴを対象にした一連の飼育実験に応用した。装置全体の概要を図(1)-4に示す。先行課題である環境研究総合推進費「海洋酸性化が石灰化生物とその生態系に与える影響の実験的研究」（課題代表：国立環境研究所・野尻幸宏、平成20～22年度）によって開発され、琉球大学熱帯生物圏研究センターで使用された海洋生物飼育実験用二酸化炭素分圧制御装置は、課題名から通称、AICAL装置と呼ばれている（Ohki et al., 2013）。これに習い、本研究課題で開発された装置をAICAL-II装置と呼称する。

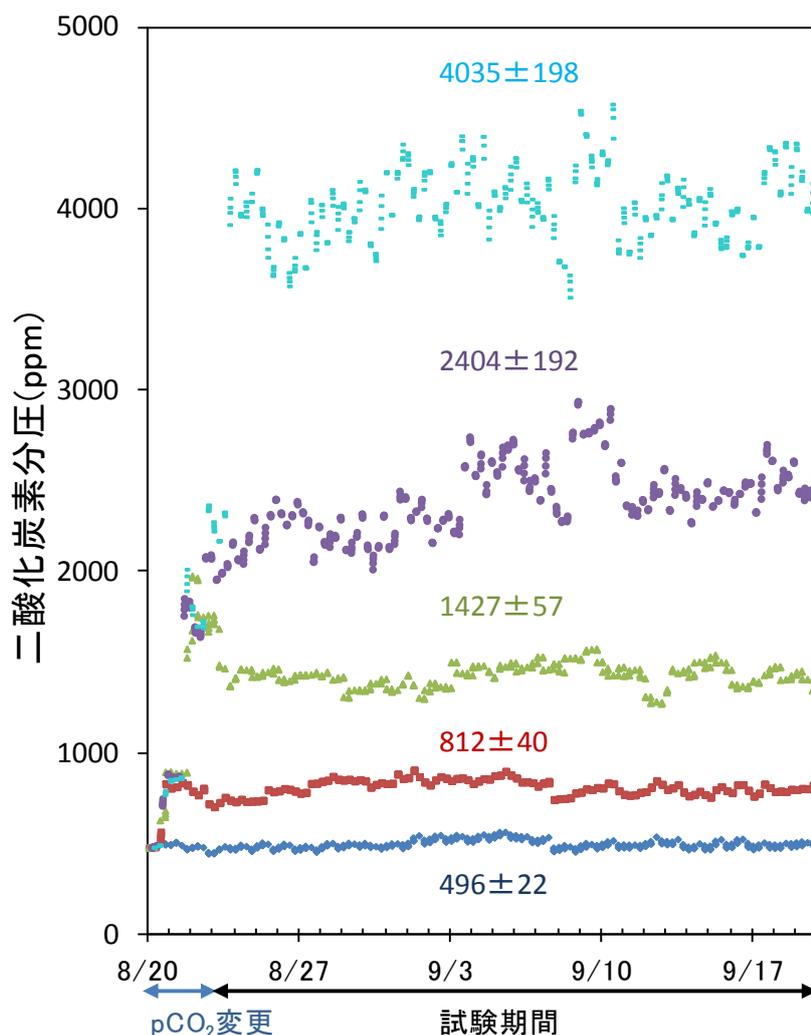


図(1)-4 5段階水温飼育実験における海水二酸化炭素分圧の調整方法の概要。全期間の温帯性サンゴを対象とした飼育実験にこのシステムが使用された。

4. 結果及び考察

(1) 大型水槽の二酸化炭素分圧調整飼育装置の開発

魚類の再生産への二酸化炭素影響評価実験に用いた装置の概念は図(1)-2に示した。本実験の場合は、二酸化炭素を加えない対照水槽に対し、4つの水槽の海水の全炭酸が等間隔で高まるように設定し、二酸化炭素分圧として約500（対照）、850、1400、2400および4000 μatm になった。実験期間中の二酸化炭素分圧変動の例を図(1)-5に示す。二酸化炭素分圧の異なる各濃度区の実測値は3回の繰り返し実験において 860 ± 60 、 1400 ± 50 、 2500 ± 60 および 4100 ± 80 μatm (Mean \pm SD、n=3)となり、目標とする分圧の範囲に制御・維持することができた。



図(1)-5 シロギスの産卵実験における海水二酸化炭素制御結果。平成24年度実験の2回目の結果を例示。

本研究課題のために製作した二酸化炭素分圧制御飼育装置の海水二酸化炭素分圧計測部をより高精度な二酸化炭素分圧計測装置（紀本電子工業製、MOG-501型）と比較する実験を、平成24年12

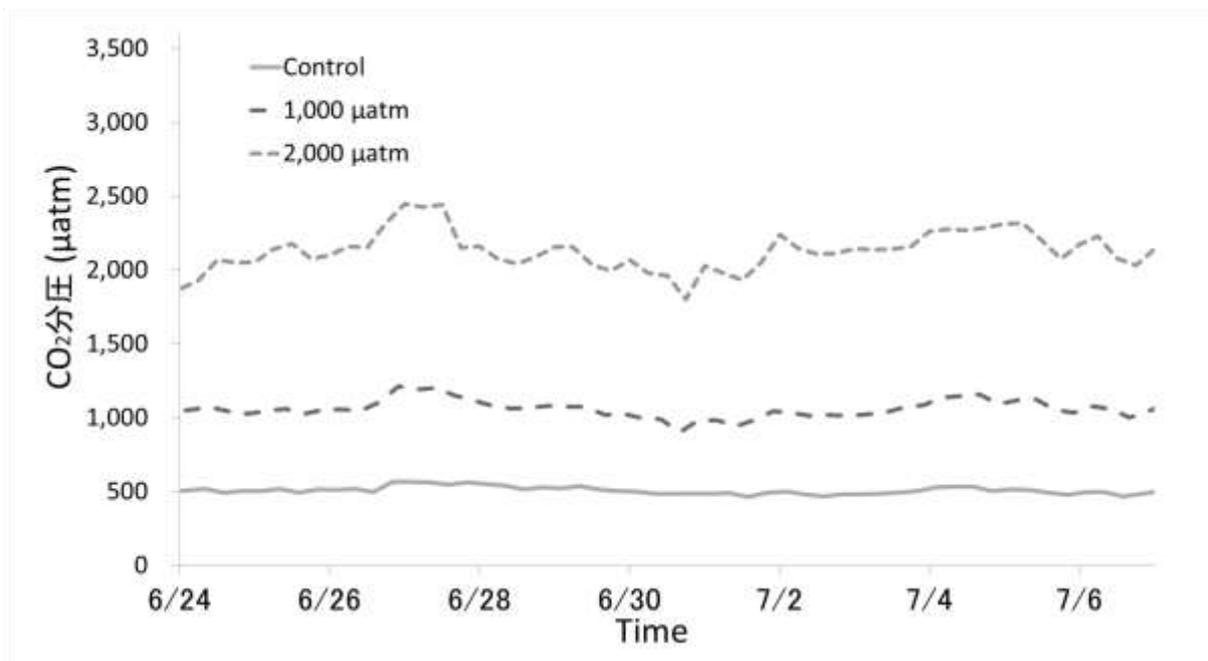
月から平成25年2月にかけて実施した。冬季の低水温期であったため、二酸化炭素分圧は290～350 μatm の範囲で変動し、典型的な日内変動は10～20 μatm であった。高精度装置との平均的な偏差は $\pm 3 \mu\text{atm}$ 程度であった。この実験から、本装置が生物飼育実験での制御に求められる正確さを十分に満たしていることが確認された。また、長期連続運付着藻類が付くことの影響が懸念されたが、目視で著しく汚れているように見える平衡器であっても、水槽内の水流の強い場所に置くことにより $\pm 3 \mu\text{atm}$ の正確さに影響を及ぼさないことが分かった。

平成26年2月20日から21日にかけて行った10 t水槽の二酸化炭素分圧制御予備実験では、表(1)-1のような海水の二酸化炭素分圧調整結果が得られた。実験前に二酸化炭素平衡計算プログラムCO2sysを用いて、海水温度、海水塩分、二酸化炭素添加による海水の全炭酸増加量、を考慮し、おおむね適当と思われる実験条件を推定した。1日目には二酸化炭素溶解塔に加える純二酸化炭素ガス流量を1L/min、溶解塔に流す海水流量を10 L/min、10 t水槽に加える高二酸化炭素濃度海水流量を5 L/min、10 t水槽に流す原海水流量を80 L/minとした。原海水が320 ppm程度で、二酸化炭素調整海水は1238 ppmとなった。昇温海水槽は、加温海水を加えてマダイを蓄養している水槽であり原海水より二酸化炭素分圧が高い。2日目に向けて、二酸化炭素ガス流量を2 L/minとして翌朝までの安定状況を見たところ、 $2923 \pm 81 \text{ ppm}$ と安定な高二酸化炭素条件が達成された。この結果を受け、平成26年度の10 t水槽によるマダイの再生産実験においては、コントロール、高二酸化炭素区1、高二酸化炭素区2の3水槽で実験を行う計画とした。高二酸化炭素区1、高二酸化炭素区2のそれぞれに高二酸化炭素濃度海水を2.5 L/minおよび5 L/minの流量で加えることで、+1000 ppm程度と+2500 ppm程度の二酸化炭素上昇設定が可能である。一般的な二酸化炭素ガスポンペ (30 kg充填) を二酸化炭素源として用いる場合、約5日で1本を消費するが、週2回の交換で実験が行えるので、現実的な実験条件と考えられた。

表(1)-1 10 t水槽の二酸化炭素調整実験結果、二酸化炭素分圧レベルを平衡乾燥空気の二酸化炭素分率ppmで表示。

	2月20日 12時－15時	2月20日 15時－18時	2月20日 21時－24時	2月21日 0時－3時	2月21日 3時－6時	2月21日 6時－9時
昇温海水槽	383	381	371	371	372	373
CO ₂ 調整槽	1284	1238	2897	3028	2933	2835
原海水槽	338	320	319	321	323	328

図(1)-6に、魚類の再生産実験の対象種を拡大する目的で平成26年6月に大容量(10 t)の屋外設置型水槽の二酸化炭素分圧制御実験を行った結果を示す。15日間にわたり対照区(無制御)、高二酸化炭素分圧条件の1000および2000 μatm の実験設定を行い、それぞれ 508 ± 27.4 、 $1060 \pm 60.7 \mu\text{atm}$ 、 $2140 \pm 129 \mu\text{atm}$ (平均値 \pm SD、n = 54、53、53) という安定的な二酸化炭素分圧制御を行なうことができた。また、各実験区に収容したマダイについて、全ての水槽で産卵が観察され、大型水産有用魚種の再生産過程における海洋酸性化を評価する実験に本課題で開発した二酸化炭素分圧手法が有効であることが実証された。



図(1)-6 大型10t水槽を用いた15日間におたる二酸化炭素分圧制御試験期間における二酸化炭素分圧値の時間変動。

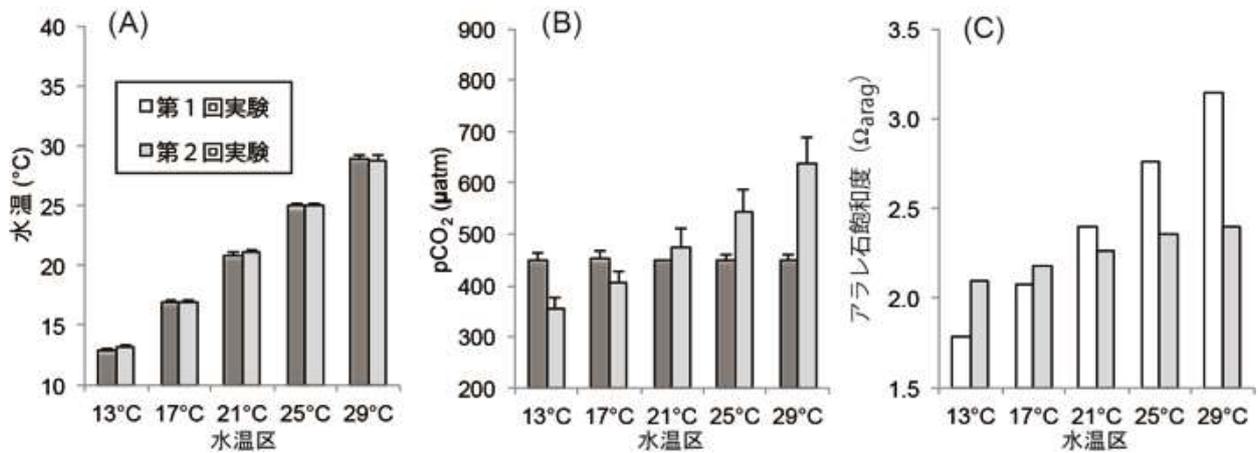
(2) サンゴの飼育実験用の水温と二酸化炭素分圧を調整する飼育装置の開発

研究開始初年度の平成24年度には、温帯性サンゴ類の骨格成長速度の温度依存性を検討するために、本研究では長期飼育が容易と判断されたエンタクミドリイシ等を対象に、2つの段階恒温飼育実験を実施した。最初の実験では、温度を5段階（13℃、17℃、21℃、25℃、29℃）として、さらに各温度区の二酸化炭素分圧（ $p\text{CO}_2$ ）をほぼ一定にすることを試みた。原海水から、冷却および加熱により温度を調整された海水は、その温度に応じて二酸化炭素分圧が変化するが、低温区では二酸化炭素分圧が低下するため、二酸化炭素を添加して二酸化炭素分圧を一定化させるものである。この結果、低温度区において炭酸塩の飽和度（ Ω ）の低下が生じる。そこで、この第1の実験を「 Ω 調整実験」と呼称する。実証試験場に送水された海水をまず容量500 Lのチタン製大型水槽で曝気し、各温度区の二酸化炭素分圧を大気条件に近づくようにバブリングを行った（図(1)-3）。しかし、低温度区では、二酸化炭素分圧が低くなるため、炭酸ガス溶解塔からの炭酸濃厚海水をペリスタポンプで200 L水槽に添加し、全温度区で除湿後の二酸化炭素濃度の計測値がほぼ一定になるように調整を行った。このシステムは4基設置し（13℃、17℃、25℃、29℃）、21℃区は17℃と25℃の海水を混合することで調整を行った。結果として、 Ω 値は高温度区から3.1、2.8、2.4、2.1、1.8と大きな違いが生じた（表(1)-2）。各温度区に二酸化炭素分圧をほぼ一定に調整した海水を4 L/minでプラスチック製サンゴ飼育水槽（ニッソー社、3 L、226×151×148 mm）に供給し、水槽あたり0.6 L/minの流量で掛け流し給水した。

表 (1)-2 温帯性サンゴについて実施した2回の5段階水温実験における水温および炭酸系緒量の平均値。海水の炭酸系緒量として、除湿後の二酸化炭素濃度 $x\text{CO}_2$ とアラレ石飽和度 Ω_{arag} および炭酸イオン濃度 $[\text{CO}_3^{2-}]$ を示した。第1回の5段階水温実験における塩分および全アルカリ度は 32.4 ± 0.2 and $2156 \pm 16 \mu\text{mol kg}^{-1}$ 、第1回の実験については、 31.8 ± 0.6 および $2129 \pm 24 \mu\text{mol kg}^{-1}$ であった。海水のpH (total hydrogen ion scale) ほかの炭酸系緒量は計算プログラムソフトウェア CO2calc (Pierrot *et al.*, 2006) を用いた。

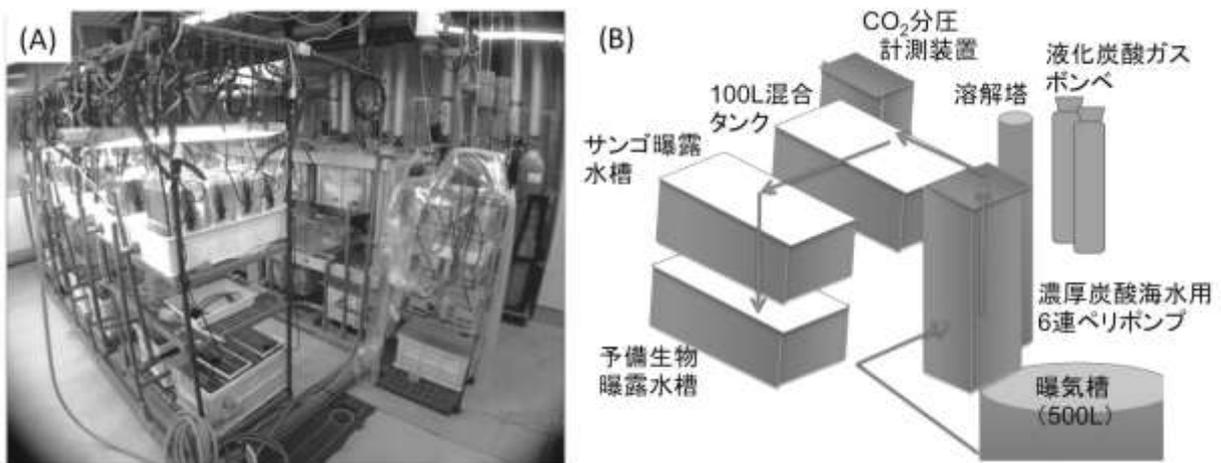
条件	水温 (°C)			$x\text{CO}_2$ (ppm)			Ω_{arag}	pH	$[\text{CO}_3^{2-}]$
	平均	標準偏差	変動係数	平均	標準偏差	変動係数	平均	平均	平均
第1回実験 (Ω 調整 (pCO_2 一定) 実験)									
13°C	12.9	0.2	1.6%	450	13	2.9%	1.79	7.982	116
17°C	17.0	0.2	1.0%	451	16	3.6%	2.08	7.984	133
21°C	20.9	0.3	1.3%	450	-	-	2.40	7.986	151
25°C	25.0	0.2	0.8%	450	12	2.6%	2.76	7.986	171
29°C	29.0	0.2	0.7%	450	10	2.3%	3.14	7.984	191
第2回実験 (Ω は水温変化に合わせた成り行き)									
13°C	13.2	0.1	1.1%	354	22	8.1%	2.10	8.070	136
17°C	16.9	0.2	1.1%	405	23	8.2%	2.18	8.021	139
21°C	21.1	0.2	1.1%	473	36	7.7%	2.26	7.965	143
25°C	25.0	0.1	0.6%	544	45	5.7%	2.35	7.913	145
29°C	28.7	0.4	1.5%	637	52	6.2%	2.39	7.855	145

第2の実験では、各温度区の炭酸系には操作を施さなかった。原海水から、冷却および加熱により得られた水温区は、その温度差に応じて二酸化炭素分圧が変化するが、二酸化炭素を添加しないため、低温度区においても Ω 値の低下は大きくない。結果として Ω 値は高温区から 2.4, 2.4, 2.3, 2.2, 2.1 と比較的狭い範囲に保たれた (表 (1)-2)。この第2の実験を、「 Ω 未調整実験」と呼称する。両実験の結果は図 (1)-7 にグラフとして示した。

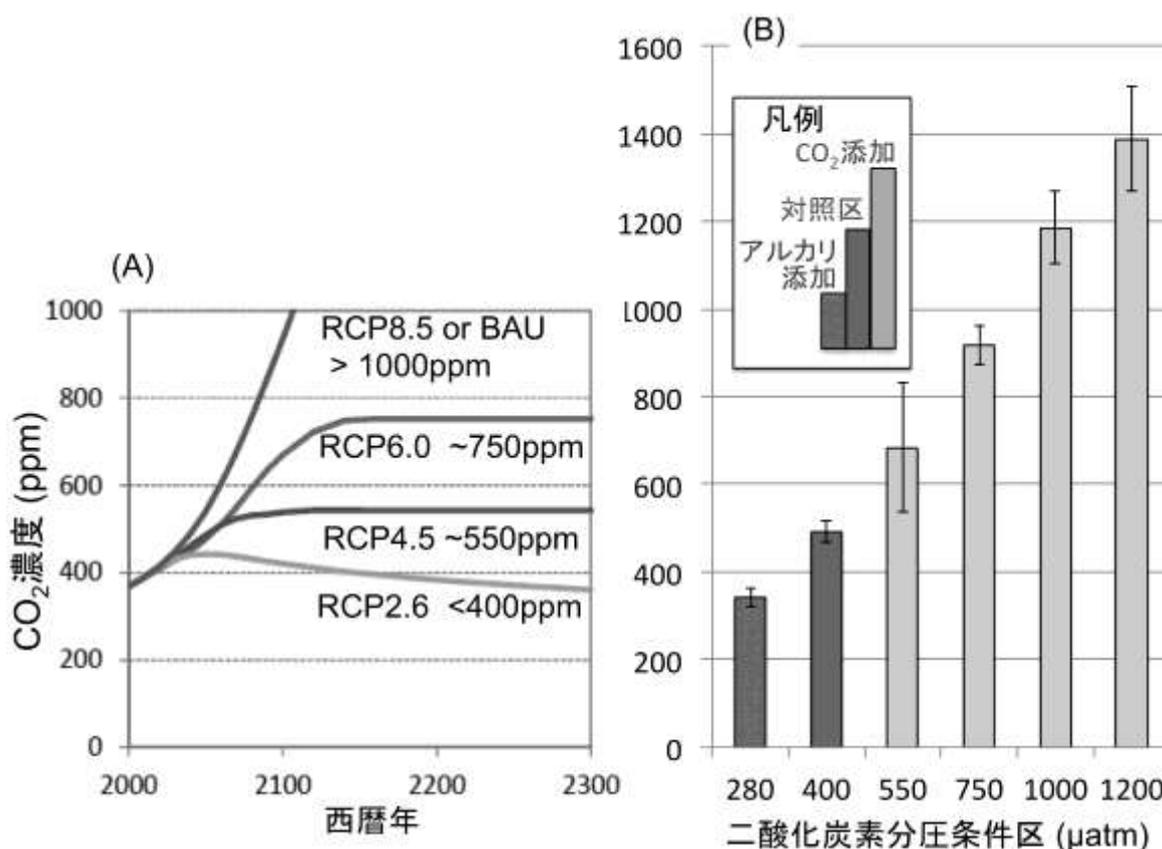


図(1)-7 温帯性サンゴを対象に実施した2回の5段階水温実験における期間中の水温 (A)、水槽温度における二酸化炭素分圧(B)とアラレ石飽和度 (Ω_{arag}) (C)。誤差棒は標準偏差を示す。

平成25年度には、温帯性サンゴ種の海洋酸性化影響評価試験のために、二酸化炭素分圧を6段階に調整できる飼育装置を製作した(図(1)-8)。基本構成は、図(1)-2に示したものと同様であるが、100L混合タンクとサンゴ曝露水槽の組み合わせを6連で設置し、すべてに濃厚炭酸海水を任意の流量で添加し、二酸化炭素分圧を調整することができる。また、水酸化ナトリウム溶液をペリスタチックポンプで添加する装置を2系統用意し、無添加海水(対照区の海水)の二酸化炭素分圧よりも低い値にも設定することが可能で、産業革命前の二酸化炭素分圧を想定した条件区を設けることができる。



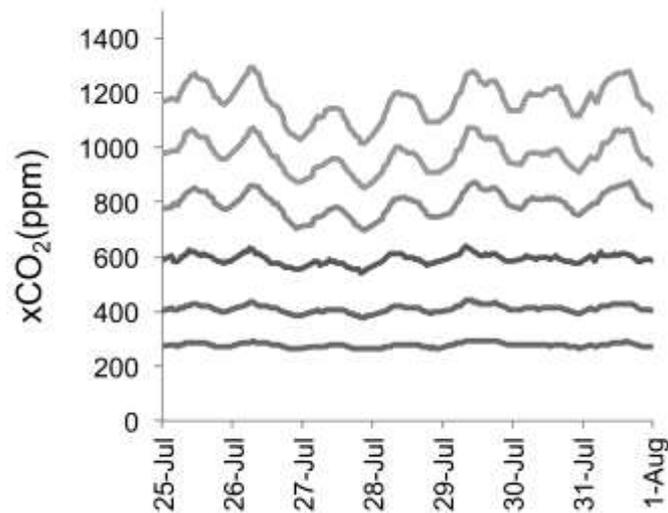
図(1)-8 サンゴ飼育実験用の精密海水二酸化炭素分圧調整装置(通称、AICAL-II装置)の全景写真(A)とシステム構成の見取図(B)。



図(1)-9 IPCC の第5次評価報告書 (IPCC, 2014) で議論されている代表的温室効果ガス濃度経路 (RCP) と、水温25℃における二酸化炭素分圧6段階実験の制御結果 (期間平成25年11月7日-12月23日の毎時測定値の平均、誤差棒はSD)。二酸化炭素分圧の最も低い条件区には、水酸化ナトリウム溶液の添加が行われている。

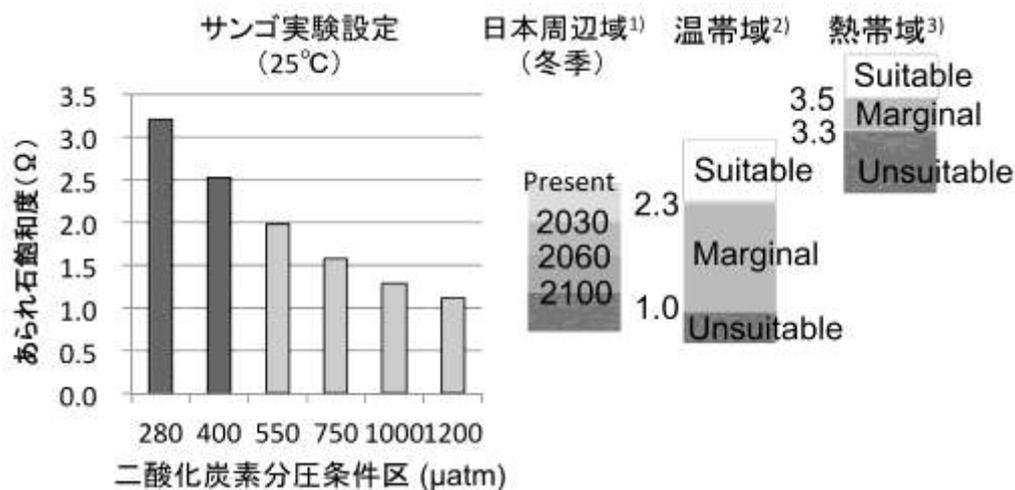
二酸化炭素分圧の設定は、対照区として現在の約400 μatm、気候変動に関する政府間パネル (Intergovernmental Panel on Climate Change : IPCC) の第5次評価報告書 (IPCC, 2014) で議論されている代表的温室効果ガス濃度経路 (RCP) 4.5相当の550 μatm、6.5相当の750 μatm、>RCP8.5相当の1000 μatmおよび1200 μatmの5段階と、産業革命前の280 μatmを加えた6段階とした (図(1)-9)。

この装置を用いて、水温17℃における飼育実験を1回、25℃における飼育実験を2回、27℃における飼育実験を1回実施した。水温17℃における実験期間中の二酸化炭素濃度の変動を図(1)-10に、水温17℃と水温25℃における実験の期間中の炭酸系総量の平均値を表(1)-3に示した。海水の炭酸系の化学平衡の特徴から、二酸化炭素分圧が高い条件区では、二酸化炭素分圧の変動係数が増大する傾向が見られるが、概ね15%以内の制御が可能であった。



図(1)-10 水温17℃における二酸化炭素分圧6段階の飼育実験期間中における二酸化炭素濃度の変動。平成25年7月25日から8月1日までの結果を示す。二酸化炭素分圧の最も低い条件区には、水酸化ナトリウム溶液の添加が行われている。

今回の二酸化炭素分圧6段階実験のあられ石飽和度 (Ω_{arag}) は概ね3.0から1.0の範囲に設定された。これは、日本周辺海域の冬季のあられ石飽和度の現在から2100年予測値 (Yara et al., 2012) に対応する範囲であり、図(1)-11に温帯域のサンゴ礁の健全性の指標として提唱されているあられ石飽和度の閾値を示した (Guinotte et al., 2003)。今回のあられ石飽和度の設定範囲は、熱帯域のサンゴ礁にとっての健全性の閾値とされている3.5までは到達していない (Kelypas et al., 1999)。

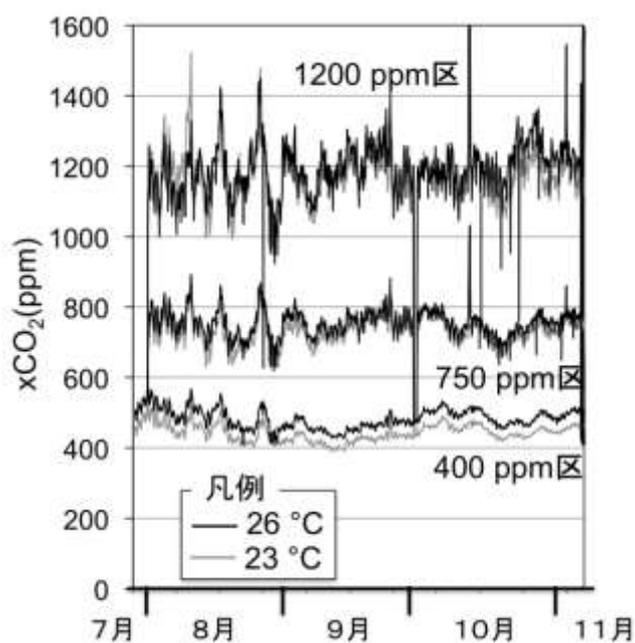


図(1)-11 水温25℃における二酸化炭素分圧6段階実験のあられ石飽和度 (期間2013年11月7日-12月23日の毎時測定値の平均、誤差棒はSD)。日本周辺海域の冬季のあられ石飽和度の将来予測値 (1: Yara et al., 2012) と温帯域および熱帯域のサンゴ礁の健全性とあられ石飽和度の閾値を示した (2: Guinotte et al., 2003, 3: Kelypas et al., 1999)。

表 (1)-3 温帯性サンゴについて平成25年度に実施した17°Cおよび25°Cにおける二酸化炭素分圧6段階の海洋酸性化影響評価試験における水温および炭酸系総量の平均値。海水の炭酸系総量として、除湿後の二酸化炭素濃度 $x\text{CO}_2$ とアラレ石飽和度 Ω_{arag} を示した。海水の炭酸系総量は計算プログラムソフトウェアCO2calc (Pierrot *et al.*, 2006) を用いて算出した。塩分および全アルカリ度は 32.4, 2156 $\mu\text{mol kg}^{-1}$ とした。すべての実験の280 μatm 区と第4回27°C実験の400 μatm 区は、水酸化ナトリウム溶液の添加を実施した（条件区名称の右肩に*を付した）。

条件	水温 (°C)			xCO ₂ (ppm)			Ω _{arag}
	平均	標準偏差	変動係数	平均	標準偏差	変動係数	平均
第1回実験	17°C一定	2013年7月8日-8月21日					
280 μatm *	17.0	0.2	1.6%	273	22	7.9%	2.94
400 μatm	17.0	0.2	1.0%	389	24	6.1%	2.31
550 μatm	17.0	0.3	1.3%	561	45	8.0%	1.77
750 μatm	17.0	0.2	0.8%	778	83	11%	1.36
1000 μatm	17.0	0.2	0.7%	969	120	12%	1.14
1200 μatm	17.0	0.2	0.7%	1142	148	13%	0.99
第3回実験	25°C一定	2013年11月7日-12月23日					
280 μatm *	25.0	0.2	1.6%	342	8	2.3%	3.21
400 μatm	25.0	0.2	1.0%	491	34	6.8%	2.53
550 μatm	25.0	0.3	1.3%	683	75	10.9%	1.99
750 μatm	25.0	0.2	0.8%	917	83	9.1%	1.59
1000 μatm	25.0	0.2	0.7%	1186	105	8.9%	1.29
1200 μatm	25.0	0.2	0.7%	1388	151	11%	1.13
第4回実験	27°C一定	2013年11月7日-12月23日					
280 μatm *	25.0	0.2	1.6%	345	8	2.3%	3.40
400 μatm *	25.0	0.2	1.0%	469	34	6.8%	2.79
550 μatm	25.0	0.3	1.3%	550	75	10.9%	2.50
750 μatm	25.0	0.2	0.8%	896	83	9.1%	1.74
1000 μatm	25.0	0.2	0.7%	1149	105	8.9%	1.43
1200 μatm	25.0	0.2	0.7%	1408	151	11%	1.21

平成26年度には、温帯性サンゴについて、水温2条件二酸化炭素分圧3段階の複合影響実験を実施した。前年度の平成25年度には、水温が同一で二酸化炭素分圧を6段階に設定した飼育実験を、水温を変えて繰り返し実施したが、実験時期によって水質の違いやサンゴ片の状態の違いなどが結果に影響することが懸念される。そこで、より正確な水温と二酸化炭素分圧の複合影響評価を目指した。温帯性サンゴの代表的な生息地である紀伊半島串本の年平均水温に近い23℃と、今世紀末に予測される水温上昇約3℃を加えた26℃区の2つの温度区を設定し、また、二酸化炭素分圧は、対照区として現在の約400 μatm 、代表的温室効果ガス濃度経路（RCP）6.5相当の750 μatm 、>RCP8.5相当の1200 μatm の3段階を設定して、この6つの条件区におけるサンゴ片の飼育を同時に実施した。約15週間にわたる実験水槽の二酸化炭素濃度の測定記録を図(1)-12に、平均値を表(1)-4に示した。長期安定な二酸化炭素濃度制御実験を実現することができた。



図(1)-12 温帯性サンゴについて実施した第1回目の長期飼育実験（平成26年7月29日から11月10日に至る約15週間）の6つの実験区の二酸化炭素濃度の変化。

表(1)-4 温帯性サンゴについて実施した第1回目の長期飼育実験期間中の海水の二酸化炭素濃度 ($x\text{CO}_2$, ppm) の平均値と標準偏差および変動係数 (CV値)。

水槽	条件	$x\text{CO}_2$ (ppm)	CV (%)
6	23°C 1200 μatm	1147 \pm 147	13
5	26°C 1200 μatm	1173 \pm 164	14
4	23°C 750 μatm	723 \pm 61	8
3	26°C 750 μatm	743 \pm 69	9
2	23°C 400 μatm	443 \pm 24	5
1	26°C 400 μatm	483 \pm 29	6

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

先行研究で実施してきた海洋生物飼育において精密に二酸化炭素分圧を調整する技術を発展させることにより、従来行うことが難しかった二酸化炭素分圧条件での実験を可能とした。具体的には、海水の水温と二酸化炭素分圧の両者を調整したうえでその二酸化炭素分圧を計測し、将来の高二酸化炭素と温暖化の両方が現れる条件でさまざまな海洋生物の飼育を行う技術が確立した。サンゴへの海洋酸性化と地球温暖化の複合影響評価と、有用魚種への海洋酸性化と地球温暖化の複合影響評価が可能になった。ただし、10t水槽を使った魚類の再生産過程への影響評価実験で水温調整をするには大きな投入エネルギーが必要であるために行わなかったが、技術的には可能である。本課題を構成する各サブテーマで実験的研究の成果が得られたが、これは本サブテーマで実験的な基盤を整備したことによって得られたものである。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

研究代表者はIPCCの第5次評価報告書の執筆に加わった。2014年に公開されたIPCC第5次評価報告書第2作業部会報告において、海洋酸性化影響に関するメタ分析がなされ、本課題と関連する先行課題（2008年～2010年度）の発表論文6件（先行課題期間中および終了後に印刷出版したもの）が引用された。本課題の直接の成果論文は第5次評価報告書に引用されるには時間的な制約で困難であった。

また、研究代表者は中央環境審議会地球環境部会気候変動影響評価等小委員会の検討作業に加わり、海洋生態系への気候変動影響について専門的立場から貢献した。

平成27年2月21日には、本研究課題が主催し「海洋酸性化がわが国周辺の生物に与える影響を評価する」と題する一般向け研究成果報告会を実施した。平成27年3月16日には、那覇市で開催されたIPCC公開シンポジウム「地球温暖化問題について考えよう！最新の科学と温室効果ガス

排出量監視の取りくみ」において、研究代表者と分担者の鈴木淳が本課題の成果に関連する講演を行った。この講演の発表資料は、公益財団法人地球環境戦略研究機構ホームページにて公開されている（日本語版：<http://www.iges.or.jp/jp/alliges/20150316.html>、英語版：<http://www.iges.or.jp/en/alliges/20150316.html>）。

<行政が活用することが見込まれる成果>

本研究課題は、わが国の沿岸海洋環境にとって重要であるサンゴが温暖化と海洋酸性化で受ける影響予測に関わる研究であり、自然環境保全に意義が大きい。また、温暖化と海洋酸性化で水産有用魚種が受ける影響の評価は社会的意義がある。

海洋酸性化の生物影響は海洋への地球温暖化影響評価の上で重要な観点であるので、次期IPCC評価報告書でも第5次評価報告書と同様に海洋酸性化の生物影響に関してメタ分析がなされると考えられ、本課題の成果である生物種影響評価関連の成果が引用されるものと思われる。

6. 国際共同研究等の状況

ヨーロッパの海洋酸性化国際共同プロジェクトであるEPOCA (European Program on Ocean Acidification) の事務局（代表、Jean-Pierre Gattuso博士、パリ大学ヴィレフランシェ海洋研究所）は、国際ワークショップ開催、標準実験法の取りまとめと出版、ウェブによる最新研究情報の収集と発信などで、ヨーロッパのみならず世界の国際研究連携に貢献してきた。2012年6月のEPOCAプロジェクト終了とともにその機能が停止することなく、発展的に継続させることを計画して、各国を代表する海洋酸性化の研究者が集まり、海洋酸性化国際連携センター (Ocean Acidification International Coordination Center) の設立を企画立案した。研究代表者は日本を代表する実行委員として活動に加わっている。各国からの活動支援表明を取りまとめ、従来から海洋生物研究支援に実績のあるIAEA (International Atomic Energy Association、国際原子力エネルギー機関) に資金援助を求めた結果、2013年からの予算が認められ活動が開始された。責任者はフランス・ラプラス研究所 (IPSL: Institute Pierre Simon Laplace) のJim Orr博士が務めることになった。研究代表者は本センターの年次会合に参加して、研究の国際協力とわが国の活動の国際的な周知に努めてきた。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文 (査読あり) >

- 1) A. Kato, M. Hikami, N. H. Kumagai, A. Suzuki, Y. Nojiri, and K. Sakai, “Negative effects of ocean acidification on two crustose coralline species using genetically homogenous samples”, *Marine Environmental Research*, 94, 1-6, 2013. doi:10.1016/j.marenvres.2013.10.010
- 2) T. Onitsuka, R. Kimura, T. Ono, H. Takami, and Y. Nojiri, “Effects of elevated pCO₂ on the early developmental stages of the horned turban, *Turbo cornutus*”, *Marine Biology*, available on line 18 February 2014. doi:10.1007/s00227-014-2405-y
- 3) S. Ohki, T. Irie, M. Inoue, K. Shinmen, H. Kawahata, T. Nakamura, A. Kato, Y. Nojiri, A.

Suzuki, K. Sakai, and R. van Woesik,

“Calcification responses of symbiotic and aposymbiotic corals to near-future levels of ocean acidification,

Biogeosciences, 10, 6807-6814, 2013. doi:10.5194/bg-10-1-2013

4) R.Suwa, Y. Nojiri, T. Ono, and Y. Shirayama, “Effects of low pCO₂ conditions on sea urchin larval size,

Marine Ecology-An Evolutionary Perspective, 34, 443-450, 2013. doi: 10.1111/maec.1204

<その他誌上発表（査読なし）>

特に記載すべき事項はない。

(2) 口頭発表（学会等）

1) 野尻幸宏：日本地球化学会年会、福岡（2012）

「海洋生物が受ける温暖化と海洋酸性化の複合影響の実験的研究」

2) 野尻幸宏：東京大学大気海洋研究所共同利用研究集会「バイオミネラリゼーションと石灰化－遺伝子から地球環境まで」、柏（2012）

「大容量CO₂制御を使った生物飼育実験」

3) Christelle Not、横山祐典、川久保友太、氷上 愛、鈴木 淳、宮入陽介、川幡 穂高、野尻幸宏：日本地球惑星科学連合2012年大会、千葉（2012）

「Effects of ocean acidification on trace elements ratio (Mg/Ca, Sr/Ca, Ba/Ca and U/Ca) in two foraminifer species」

4) 氷上 愛、石村 豊穂、藤田和彦、鈴木 淳、酒井一彦、野尻幸宏、川幡 穂高：日本地球惑星科学連合2012年大会、千葉（2012）

「高pCO₂海水における大型有孔虫殻の酸素炭素同位体比」

5) 加藤亜記、氷上 愛、鈴木 淳、野尻幸宏、酒井一彦、日本藻類学会第36回大会、札幌（2012）

「海洋酸性化による無節サンゴモ2種の成長阻害」

6) 氷上 愛、石村豊穂、藤田和彦、鈴木 淳、野尻幸宏、酒井一彦、川幡穂高：日本地球惑星科学連合大会、千葉（2013）

「海洋酸性化によるサンゴ礁棲有孔虫殻の安定同位体比の変化」

7) 森 千晴、鈴木 淳、磯野良介、渡邊裕介、林 正裕、山本雄三、野尻幸宏、山野博哉、野村恵一、井上 麻夕里、西田 梢、中島 礼、川幡穂高：日本地球惑星科学連合大会、千葉（2013）

「気候変動が温帯性サンゴの成長に及ぼす影響の飼育実験による検討」

8) M. Hikami, T. Ishimura, K. Fujita, A. Suzuki, Y. Nojiri, H. Kawahata,

“The carbon and oxygen isotope records of reef-dwelling foraminifers subjected to five varied pCO₂ seawater”, Fall Meeting, American Geophysical Union, San Francisco, USA, 2013.

9) 山本雄三、林正裕、磯野良介、堀田公明、渡邊裕介、野尻幸宏：日本海洋学会2014年度春季大会シンポジウム、東京（2014）

「海洋酸性化がシロギス再生産に与える影響」

10) 山本雄三、林 正裕、磯野良介、堀田公明、渡邊裕介、野尻幸宏：日本水産学会平成26年度

春季大会、東京 (2014)

「海洋酸性化がシロギス再生産に与える影響」

11) 芳村 毅、野尻幸宏：日本海洋学会2014年度春季大会、東京 (2014)

「珪藻*Thalassiosira weissflogii*の増殖に対する水温およびCO₂分圧の増加の影響評価」

12) 林 正裕、山本雄三、諏訪僚太、吉川貴志、渡邊裕介、西田 梢、鈴木 淳、野尻幸宏：第9回バイオミネラリゼーションワークショップ、東京 (2014)

「水産有用種への海洋酸性化影響」

13) Yukihiro Nojiri: Human Impacts on Oceanic Environment, Ecosystem, and Fisheries, Nagasaki University International Symposium, Nagasaki, Japan (2014)

“Collaboration of Japanese maritime laboratories for CO₂ manipulation experiments assessing impact of ocean acidification on coastal ecosystem”

14) 芳村 毅、野尻幸宏：日本海洋学会2014年度秋季大会、長崎 (2014)

「円石藻類の増殖に対する水温およびCO₂分圧の増加の影響評価」

15) 野尻幸宏：環境研究総合推進費成果報告会「海洋酸性化がわが国周辺の生物に与える影響を評価する」、東京 (2015)

「海洋酸性化の生物影響に関する国内共同研究課題の連携」

16) 野尻幸宏：気候変動に関する政府間パネル(IPCC) 公開シンポジウム、那覇 (2015)

「気候変動に関する新たな科学的知見：IPCC第5次評価報告書」

17) 芳村 毅、野尻幸宏、堀田公明：日本海洋学会2015年度春季大会、東京 (2015)

「沿岸域のプランクトン群集に対する水温およびCO₂分圧の増加の影響評価」

18) 野尻幸宏：日本海洋学会2015年度春季大会、東京 (2015)

シンポジウム温暖化適応策に対する海洋学の貢献

「環境省の気候変動影響評価等小委員会で進む検討について」

19) 諏訪僚太、山本雄三、林 正裕、吉川貴志、箕輪 康、渡邊裕介、野尻幸宏：平成27年度日本水産学会春季大会、東京 (2015)

「海洋酸性化の生物影響-2：シロギスの再生産に与える高水温との複合影響」

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない。

(4) 「国民との科学・技術対話」の実施

1) 環境省環境研究総合推進費一般向け研究成果報告会「海洋酸性化がわが国周辺の生物に与える影響を評価する」(平成27年2月21日、TKP市ヶ谷カンファレンスセンター・東京、聴講者約60名)

(5) マスコミ等への公表・報道等

1) 朝日新聞(平成25年3月18日、土曜版、e6頁)「今さら聞けない・海洋酸性化」

2) 朝日小学生新聞(平成26年1月15日、1頁)「進む海の酸性化」

3) 今さら聞けない科学の常識3「聞くななら今でしょ!」(ブルーバックス、平成26年1月21日刊)

- 4)「海から貝が消える？海洋酸性化の危機」（平成26年5月8日、NHK衛星BS1、7:00- キャッチ！世界の視点）」要約をホームページで公開 <http://www.cger.nies.go.jp/ja/news/2014/140516.html>

(6) その他

特に記載すべき事項はない。

8. 引用文献

- 1) Ohki, S., Irie, T., Inoue, M., Shinmen, K., Kawahata, H., Nakamura, T., Kato, A., Nojiri, Y., Suzuki, A., Sakai, K., van Woesik, R. (2013) Calcification responses of symbiotic and aposymbiotic corals to near-future levels of ocean acidification. *Biogeosciences*, 10; 6807-6814, doi: 10.5194/bg-10-6807-2013
- 2) Pierrot, D., Lewis, E., Wallace, D.W.R. (2006). MS Excel Program Developed for CO₂ System Calculations. ORNL/CDIAC-105a. Carbon Dioxide Information Analysis Center, Oak Ridge National Laboratory, U.S. Department of Energy, Oak Ridge, Tennessee.
- 3) IPCC, 2014: Summary for policymakers. In: *Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Part A: Global and Sectoral Aspects. Contribution of Working Group II to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Field, C. B., V. R. Barros, D. J. Dokken, K. J. Mach, M. D. Mastrandrea, T. E. Bilir, M. Chatterjee, K. L. Ebi, Y. O. Estrada, R. C. Genova, B. Girma, E. S. Kissel, A. N. Levy, S. MacCracken, P. R. Mastrandrea, and L. L. White (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, pp. 1-32.
- 4) Yara, Y., Vogt, M., Fujii, M., Yamano, H., Hauri, C., Steinacher, M., Gruber, N. and Yamanaka, Y. (2012) Ocean acidification limits temperature-induced poleward expansion of coral habitats around Japan. *Biogeosciences*, 9: 4955–4968.
- 5) Guinotte, J. M., Buddemeier, R. W., and Kleypas, J. A. (2003) Future coral reef habitat marginality: temporal and spatial effects of climate change in the Pacific basin. *Coral Reefs*, 22: 55-558, doi: 10.1007/s00338-003-0331-4
- 6) Kleypas, J. A., Buddemeier, R. W., Archer, D., Gattuso, J. P., Langdon, C., and Opdyke, B. N. (1999) Geochemical consequences of increased atmospheric carbon dioxide on coral reefs. *Science*, 284: 118-120, doi: 10.1126/science.284.5411.118

(2) 我が国周辺のサンゴ種の成長への水温と海洋酸性化の影響

独立行政法人産業技術総合研究所

地質情報研究部門 海洋環境地質研究グループ

鈴木 淳

地質情報研究部門 層序構造地質研究グループ

中島 礼

<研究協力者>

公益財団法人海洋生物環境研究所 実証試験場 応用生態グループ

林 正裕・吉川貴志・山本雄三・磯野良介・渡邊裕介・諏訪僚太

独立行政法人国立環境研究所 山野博哉

(株)串本海中公園センター 野村恵一

平成24～26年度累計予算額：20,476千円（うち、平成26年度予算額：6,167千円）

予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

人為的なCO₂排出量増加は、地球温暖化と海洋酸性化を同時進行させている。海洋生物は、温暖化のみならず海洋酸性化の影響をも受け得るため、複合影響評価が必要である。水温上昇の影響により、九州から本州沿岸で分布域が北上しているサンゴ種（北上種）が知られているが、海洋酸性化による炭酸カルシウム飽和度低下は石灰化を抑制しうるので、分布域移動に今後制約がかかる可能性がある。しかし、北上種を含め温帯性サンゴ自体のCO₂に対する応答特性が未知で予測は難しい。温帯性サンゴでは、高水温・低水温ともその生息域を決める要因となり、水温とCO₂の複合影響を飼育実験から評価することが求められる。本州南岸のスギノキミドリイシ、クシハダミドリイシ、エンタクミドリイシおよびヒメエダミドリイシを実験に用いて、水温5段階（13～29℃）の骨格成長への影響評価試験により、温帯性サンゴは熱帯性のミドリイシ類に比べて低水温側での生存可能範囲が広いことが確認された。温帯性サンゴの中ではスギノキミドリイシなどの北上種がやや高温寄りの温度適性を示した一方、近年の温暖化傾向にも関わらず分布域の北上が認められない北限種として代表的なヒメエダミドリイシは、13℃でも生存可能であり、やや低温寄りの温度特性を示した。北上種のスギノキミドリイシとクシハダミドリイシを対象にした水温とCO₂の複合影響の評価試験では、現在の条件に相当するCO₂分圧区では23℃から3℃の昇温に骨格成長を促進させる効果が見られた一方で、26℃区ではCO₂分圧の増加に伴い骨格成長率が低下した。今後、水温上昇によるサンゴの骨格成長促進と海洋酸性化による抑制が釣り合う状態を経由し、それ以上の海洋酸性化の進行がサンゴの骨格成長を現在より低下させることが示唆された。一方、北限種のスギノキミドリイシにこのような傾向は認められなかった。これらの結果は、温帯域にあたる日本周辺で、地球温暖化によるサンゴ分布域の北方拡大に対し、海洋酸性化による成長抑制がかかりうることを示すとともに、北上種と北限種でその傾向に違いが見られることが示された。

[キーワード]

地球温暖化、海洋酸性化、サンゴ、複合影響、飼育実験

1. はじめに

人為的な二酸化炭素排出量増加は大気二酸化炭素濃度上昇を通して、地球温暖化と海洋酸性化を同時進行させている。海洋生物は、温暖化のみならず人為起源二酸化炭素の直接影響として海洋酸性化の影響を受け得るため、同時進行を踏まえてその複合影響評価が必要である。本サブテーマでは、技術・設備の実現性と研究ニーズから、日本周辺の温帯性サンゴ類を研究対象とした。わが国の九州から本州に掛けての沿岸海域は、世界的にも造礁サンゴ類の分布の北限域にあたり、将来の気候変動の影響を大きく受ける可能性がある。これらのサンゴ類について、先駆的な二酸化炭素制御系を活用する飼育実験を行い、地球温暖化と海洋酸性化の近未来影響を評価する実験的研究を行う。成果として、沿岸海洋生態系変化予測や炭素循環将来予測等に活用される基礎的な科学的知見が期待される。水温と二酸化炭素分圧の正確な制御という物理化学面と、対象生物種の入手・維持という生物面の両技術・設備がない限り、環境制御飼育実験には新たに大きな投資や長い経験蓄積が必要となる。そこで、技術・設備の実現性と研究ニーズを考慮し研究対象を設定した。

2. 研究開発目的

地球温暖化による海水温上昇の影響により、わが国の九州から本州に掛けての沿岸で急速な分布域北上が確認されているサンゴ種（北上種）があるが、分布域の変化が沿岸生態系の変化をもたらす可能性があるものの、大気二酸化炭素濃度増大による炭酸カルシウム飽和度低下が石灰化を抑制するので分布域移動に制約がかかる可能性がある。ただし、北上種を含め、温帯性サンゴ自体の二酸化炭素分圧に対する応答性が知られていないため確度の高い予測は難しい。温帯性サンゴでは、高水温・低水温ともその生息域を決める要因となるので、水温と二酸化炭素分圧の複合影響を飼育実験から明らかにする。

研究課題初年度の平成24年度には、日本周辺域の北限域サンゴとして代表的なキクメイシモドキと、北上種を含む数種のサンゴについて、海水の二酸化炭素分圧および水温を調整した水槽からの掛け流し配水による長期室内飼育実験系の確立を目標とした。サンゴの石灰化量は水中重量法による評価法を採用する。各種の飼育環境条件や、照明機器や水槽等の飼育関連装置の検討を進めつつ、良好な状態での長期飼育が可能となった1種について、現在の二酸化炭素分圧条件下で、多段階に水温設定した飼育実験により、サンゴの石灰化と成長が受ける水温影響を評価することを目標とした。

平成25年度には、前年度の検討結果を踏まえ、北上種を含む温帯性サンゴのうち飼育の容易なものを選定し、サンゴの成長期を想定した複合影響評価実験を行なうことを目標とした。具体的には二酸化炭素分圧を、現状の値を含め3段階以上に、さらに水温を現状と2℃程度上昇させた2段階の実験条件を設定してサンゴを飼育し、海水のアラレ石飽和度が石灰化量に与える影響を評価することを目標とした。また、これまでの飼育実験で、期間中に成長した骨格について走査型電子顕微鏡観察を行って、骨格微細構造への影響の有無を検討する。

研究期間最終年度の平成26年度には、実験対象種を拡大して長期飼育実験を行い、水温上昇と高CO₂の複合効果による石灰化と成長への影響を評価することを目指した。本州沿岸のサンゴ類のうち、急速に北上している種（北上種）、北限域に分布するが北上していない種（北限種）が知られ、これらに二酸化炭素分圧増加および水温上昇に対する応答の違いがあるかどうかを検討し、

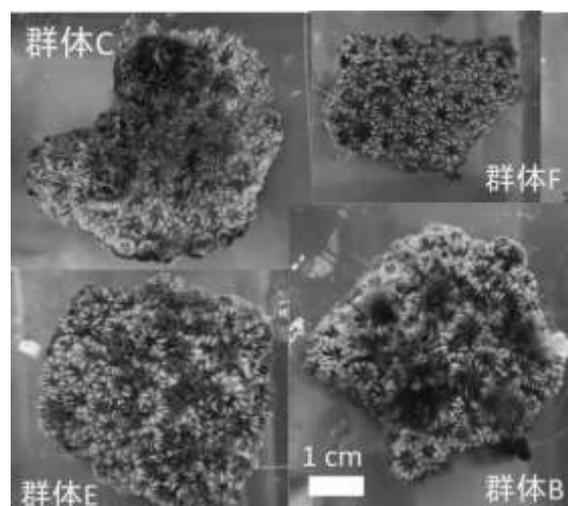
今後起こり得る影響を総合的に考察する。

3. 研究開発方法

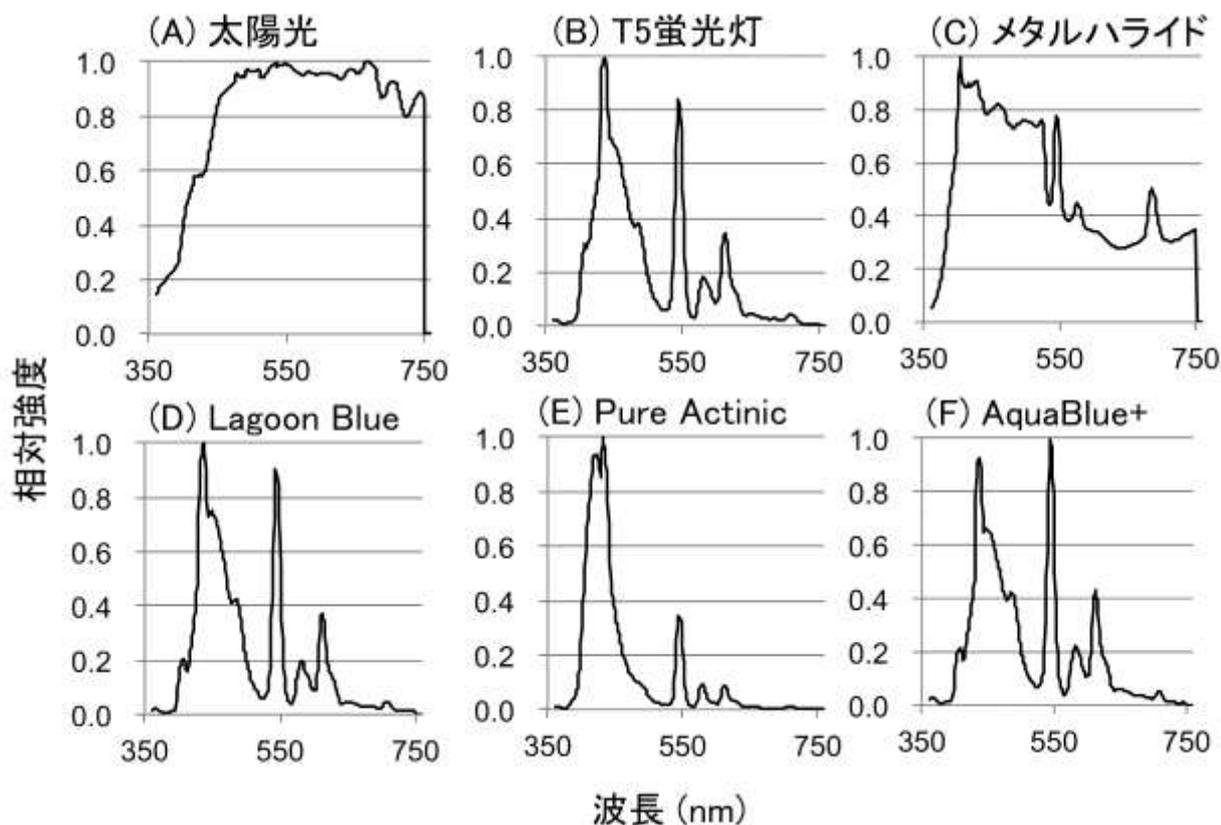
(1) サンゴ採取と長期畜養実験

初年度の検討には、2012年6月に静岡県賀茂郡西伊豆町において採取された温帯性サンゴを公益財団法人海洋生物環境研究所（新潟県柏崎市）に輸送して実験に用いた。キクメイシ *Favia speciosa*のほか、サンゴ北限種として代表的なヒメエダミドリイシ *Acropora pruinosa*、北上種として代表的な *Acropora solitaryensis* とエンタクミドリイシ *Acropora* sp. などの種が採取された。*A. solitaryensis* とエンタクミドリイシについては本来別種と思われるが、分類学上の混乱があり、*A. solitaryensis* に適当な和名がなく、一方、和名でエンタクミドリイシと呼称されるものには、有効な学名が提唱されていない。また、2012年10月下旬に、和歌山県東牟婁郡串本町において、ヒメエダミドリイシ *Acropora pruinosa*とスギノキミドリイシ *Acropora muricata*、クシハダミドリイシ *Acropora hyacinthus*、そしてキクメイシモドキ *Oulastrea crispata*を採取し、同じく海洋生物環境研究所に移送して実験に用いた（図(2)-1）。

海洋生物環境研究所では、採取されたサンゴについて、200 L (120 x 60 x 60 cm) のアクリル水槽にて長期畜養実験を行なった。アクリル水槽の水温は約23℃に維持され、一部の海水はろ過システムを通して循環された。光源としてT5蛍光灯（GROW WORKS製，T5-System；GIESEMANN製，PowerChrome T5 series）を設置し、12時間毎の明暗周期とした。光量はサンゴ片上部の水深においておよそ300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ に設定した。T5 蛍光灯は、メタルハライドライトの代替として、近年ヨーロッパを中心にサンゴ実験にもよく使用されているが、日本国内ではまだ一般的ではない。小型分光高度計を用いて、360 - 760 nmの波長範囲での相対強度を計測した結果を図(2)-2に示す。また、藻類の発生を防ぐために、サンゴに影響がなく藻類を摂食するサザエ、クボガイ、タツナミガイ等の藻食動物を各水槽内に入れた。



図(2)-1 和歌山県串本町地先で採取されたキクメイシモドキの小群体。

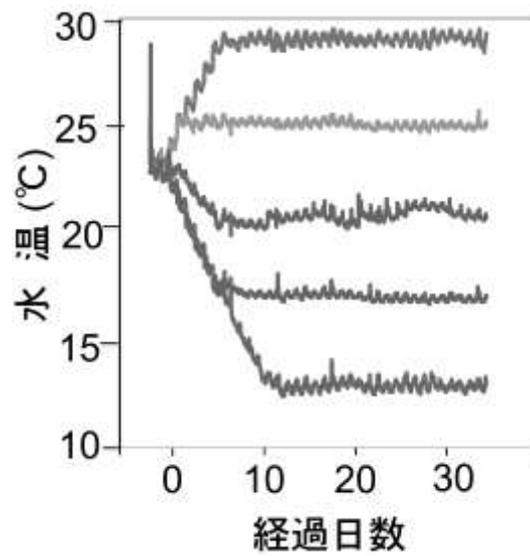


図(2)-2 太陽光(A)、本研究で用いたT5蛍光灯(B)およびメタルハライドライト(C)の360 - 760 nmの波長範囲での相対強度。本研究では、T5蛍光灯は39 W出力4灯を1セットとして使用し、4灯の内訳はLagoon Blue 2本、Pure Actinic 1本、AquaBlue+ 1本とした。これらのT5蛍光灯の個別点灯状態での相対強度を(D)から(F)に示した。

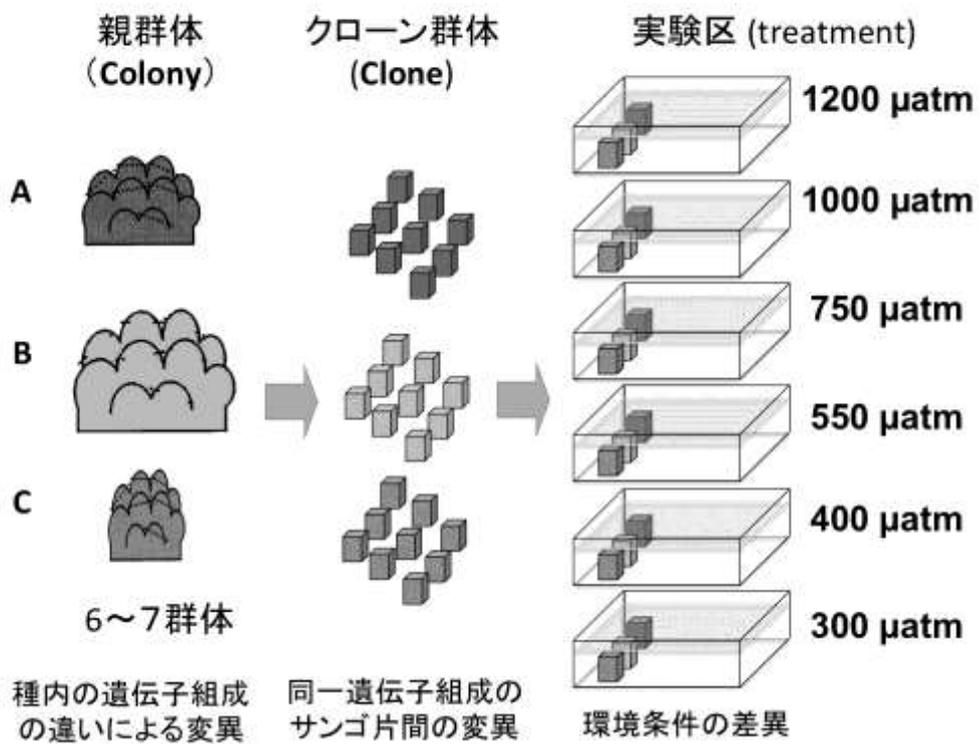
(2) 5段階水温飼育実験

二酸化炭素分圧および炭酸カルシウム飽和度の調整に関しては、図(1)-7、表(1)-2の結果に示した。飼育実験開始時には急激な温度変化を避けて、水温を設定温度まで1日あたり1℃程度、段階的に変化させて馴化を行った。(図(2)-3)。

エンタクミドリイシの枝部分は小さく、基盤部分も含めて切断する必要があるため、テグスでサンゴ片をくくるようにしてラベルの取り付けを行った。サンゴ片は、約2週間畜養水槽にて養生した後、5つの温度区水槽にそれぞれ5~10個のサンゴ片を、初期重量に関してランダムに配置した。また、飼育実験開始時には急激な温度変化を避けて水温を設定温度まで段階的に変化させて馴化を行った。光源としてT5蛍光灯を設置し、12時間毎の明暗周期とした。光量はサンゴ片の水深において $260 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ に設定し、実験期間中は1週間に1回、光量子計(Biospherical Instruments社製, QAL-2100)を用いて測定を行い、水槽と光源の距離を調整することでほぼ一定に維持した。各温度区水槽の配置と水槽内のサンゴ片は、1週間に1回程度の配置換えを行い、水槽毎の環境要因に偏りが生じないように注意した。また、1週間程度で付着藻類が発生するため、1週間に1回、水槽やプラスチック格子型の台座、シャワーヘッド等を交換した。また、藻類の発生を防ぐために、サンゴに影響がなく、藻類を摂食するクボガイ等の藻食動物を各水槽内に入れ



図(2)-3 水温5段階環境試験に用いるサンゴ片の温度馴致。1日に1°Cずつゆっくりと変化させて、急激な水温変化によるストレスを回避した。



図(2)-4 環境試験に用いるサンゴ群体、サンゴ片の実験区への配置の概念図。ここでは6段階の二酸化炭素分圧実験の場合を示す。実験区の水槽はできるだけ複数用意することを目指した。

た。環境試験におけるサンゴ群体、サンゴ片の実験区への配置の概念を図(2)-4に示した。

サンゴ骨格の成長速度は、水中重量法により評価した。これは、床下秤量が可能な電子天秤（ザルトリウスED224S, 最小表示0.1 mg）にサンゴ片をつるし、海水中で重量を測定する方法である。サンゴの組織や粘液、付着藻類は概ね海水と密度が等しいが、サンゴ骨格（アラレ石）は密度が2.94と大きいため、海水中でサンゴの重量を測定すると、サンゴの組織、粘液、藻類の重量は無視することができる。この方法は操作が容易であり、非侵襲・非破壊的で、サンゴの成長経過を見るのに適している。水中重量測定値は、1試料につき3回繰り返し測定を行い、その平均値を用いた。骨格成長量に関する統計解析には、統計解析ソフトウェアJMP v.8.0.1 (SAS Institute Japan)の一元配置分析を用いた。

(3) 25℃および27℃における6段階二酸化炭素分圧飼育実験

温帯性サンゴの骨格成長速度の温度および海水のアラレ石飽和度への依存性を検討するために、長期飼育が容易と判断されたスギノキミドリイシを対象に、サンゴの成長期である夏期を想定した25℃と27℃の2段階の水温について、6段階の二酸化炭素分圧に調整されたかけ流し海水による飼育実験を実施した。枝状のスギノキミドリイシ3群体を切断して、長さ4-5 cmの小片を作成して、特殊接着剤でポリカーボネート製のボルトに接着し、識別のためのラベル取り付けを行った(図(2)-5および図2-6)。約2週間畜養水槽にて養生した後、6つのCO₂分圧区の水槽に、各群体から2片ずつ、初期重量に関してランダムに配置した。3群体のスギノキミドリイシからサンゴ片を作成していたので、合計6片のサンゴ片を一つのCO₂分圧区に配置した。また、産地による特性比較のために、同種に比定されるインドネシア産のサンゴについても同様の実験を行った。なお、畜養されているインドネシア産のサンゴについては、すべて同じ群体から派生したと考えられる。



図(2)-5 環境試験に用いるサンゴ片の作成。ヒメエダミドリイシの群体Nの例。採取された群体(A)を、ほぼ同じ大きさのサンゴ片に分割し(B)、特殊な水中瞬間接着剤（コーラルグルー）を用いて、ポリカーボネート製の白色ボルトに接着した(C)。

25℃の6段階二酸化炭素分圧飼育実験については、ヒメエダミドリイシとクシハダミドリイシについても、予察的な実験を実施した。枝状群体をもつヒメエダミドリイシのサンゴ片作成法は、スギノキミドリイシに準じた。一方、網目状の群体を持つクシハダミドリイシは、切断したサンゴ片にテグスを用いてラベルを結び付ける方法をとった。

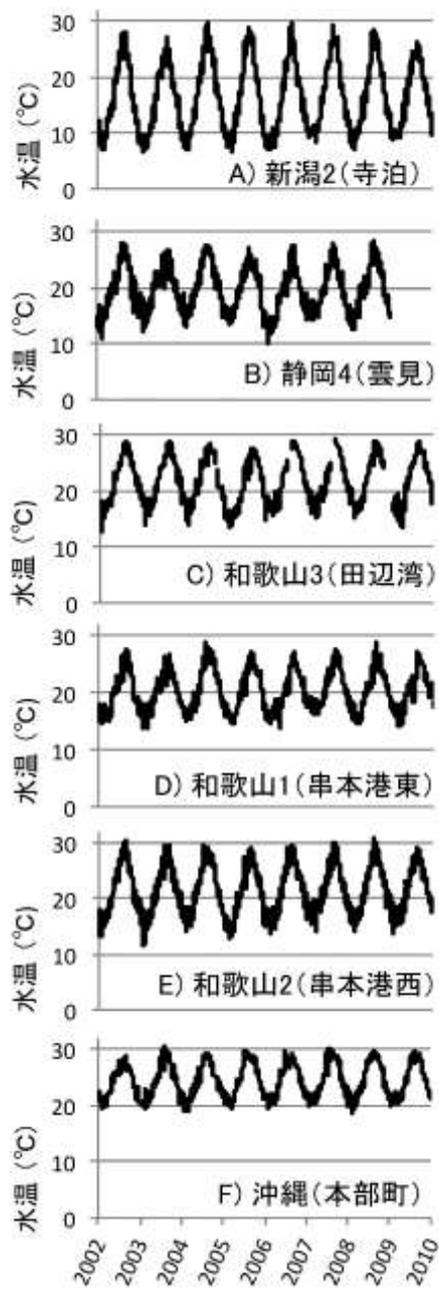


図(2)-6 環境試験に用いたサンゴ片の切断後の養生飼育の様子。

温帯性サンゴの水温影響試験に先立って、日本国内沿岸各地の水温観測記録を検討し、温度設定値を決める参考とした。日本海洋データセンター（JODC）の「全国の定地水温データ」ホームページから取得した静岡県雲見、和歌山県田辺湾、串本町、沖縄県本部町の2002年から2010年にわたる水温記録を図(2)-7に示す。参考に、温帯性サンゴの飼育実験を実施した新潟県柏崎市に近い新潟県長岡市寺泊の沿岸水温のグラフも図(2)-7Aに示した。田辺湾の年平均水温は約22℃であった。海洋生物環境研究所におけるサンゴ畜養水槽の水温は、この水温よりもやや高い23-24℃で長期畜養が行われた。

各実験区には、CO₂分圧をほぼ一定に調整した海水を、水槽あたり0.5 L/minの流量で掛け流し給水した（サンゴ飼育水槽：ニッソー社，3 L，226×151×148 mm）。光源としてT5蛍光灯を設置し、12時間毎の明暗周期とした。光量はサンゴ片の水深において260 μmol m⁻² s⁻¹に設定し、実験期間中は1週間に1回、光量子計（Biospherical Instruments社製，QAL-2100）を用いて測定を行い、水槽と光源の距離を調整することでほぼ一定に維持した。各温度区水槽の配置と水槽内のサンゴ片は、2週間に1回程度の配置換えを行い、水槽毎の環境要因に偏りが生じないように注意した。また、付着藻類の発生が顕著なため、2週間に1回、水槽やプラスチック格子製の台座、給水用ノズル等を交換した。

サンゴ骨格の成長速度は、水中重量法により評価した。これは、床下秤量が可能な電子天秤（ザルトリウスED224S，最小表示0.1 mg）にサンゴ片をつるし、海水中で重量を測定する方法である。サンゴの組織や粘液、付着藻類は概ね海水と密度が等しいが、サンゴ骨格（アラレ石）は密度が2.94と大きいため、海水中でサンゴの重量を測定すると、サンゴの組織、粘液、藻類の重量は無視することができる。この方法は操作が容易であり、非侵襲・非破壊的で、サンゴの成長経過を見るのに適している。水中重量測定値は、1試料につき3回繰り返し測定を行い、その平均値を用いた。骨格成長量に関する統計解析には、統計解析ソフトウェア JMP v. 8.0.1（SAS Institute Japan）の一元配置分散分析を用いた。

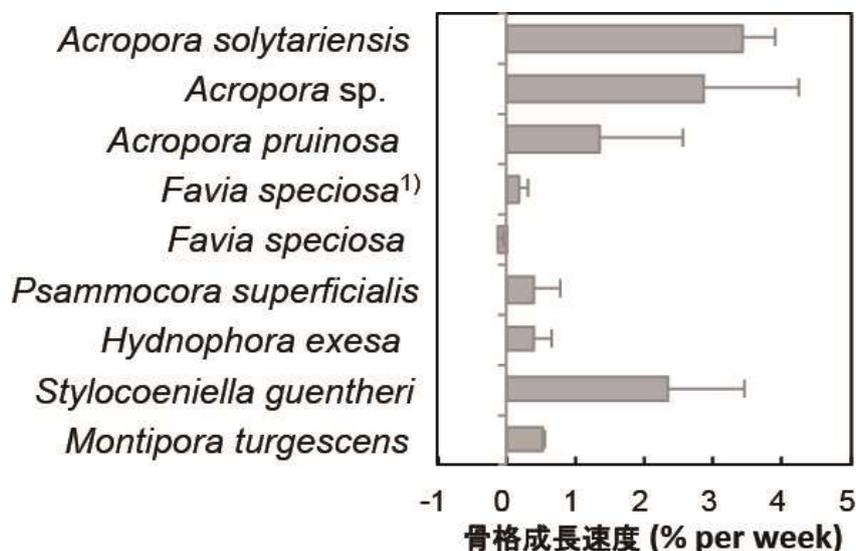


図(2)-7 日本各地の沿岸の水溫観測記録。日本海洋データセンター (JODC) の「全国の定地水溫データ」ホームページから取得 (http://www.jodc.go.jp/data/coastal/obs_data_index.html、2014年8月31日閲覧)。

4. 結果及び考察

(1) サンゴの長期畜養実験

静岡県西伊豆町から採取された温帯性サンゴ各種の群体の水中重量計測から評価した骨格成長速度を図(2)-8に示す。骨格成長速度は、1週間あたり、初期骨格重量からの増加分を百分率で示した。キクメイシ*Favia speciosa*は、海水の掛け流し飼育では水中重量の減少が認められたため、動物プランクトンを給餌したところ、水中重量が増加に転じた。和歌山県串本町から採取されたキクメイシモドキ*Oulastrea crispata*は、1ヶ月間を隔てた計測では、有意な重量の変化が見られなかった。総合的に評価して、エンタクミドリイシ*Acropora* sp.および*A. solitaryensis*が、海洋生物環境研究所の実験室環境での長期飼育が比較的容易な種と考えられる。この他、和歌山県串本町から採取されたスギノキミドリイシ*Acropora muricata*も長期飼育が比較的容易な種である。



図(2)-8 静岡県西伊豆町から採取された温帯性サンゴ各種の長期畜養水槽における水中重量変化。1)は、動物プランクトンを給餌した場合の水中重量変化を示す。誤差棒は標準偏差。

(2) 5段階水温飼育実験

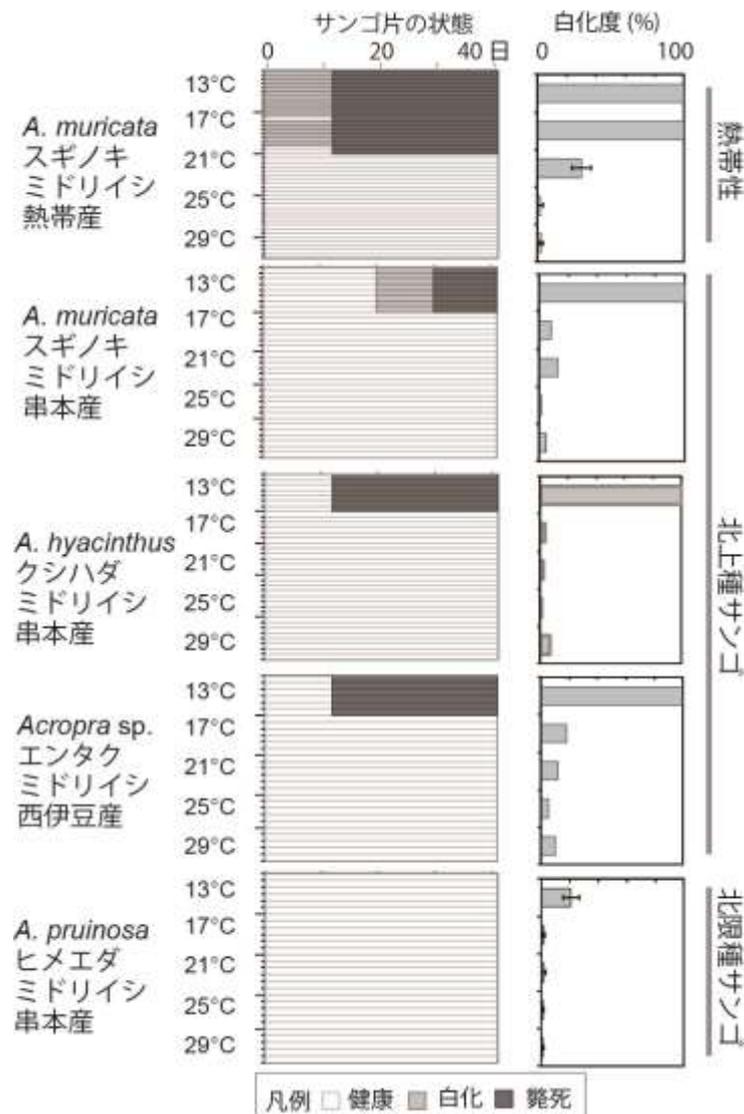
1) サンゴの生存に及ぼす水温の影響

西伊豆産サンゴについては、エンタクミドリイシおよび*A. solitaryensis*を、また、串本からのサンゴについては、スギエダミドリイシ、クシハダミドリイシ、ヒメエダミドリイシを実験に用いた。ヒメエダミドリイシは北限種として代表的な種であり、その他の種は、分布域の北方拡大が顕著な北上種として知られている。また、海生研では、インドネシアから商業的に輸入されたミドリイシ類サンゴの長期維持・増殖に成功しているため、熱帯産ミドリイシ類の例として実験に用いた。この種は骨格の特徴からスギエダミドリイシに同定されたことから、同一種で熱帯（インドネシア）と温帯（串本）に分布する個体群の違いを検討できる材料となった。

温帯性サンゴと熱帯産サンゴでは、生存可能水温の範囲に大きな違いが認められた。熱帯産スギノキミドリイシは、「 Ω 調整実験」と「 Ω 非調整実験」の両方において、13℃および17℃区で全サンゴ片が1週間以内に斃死し、「 Ω 調整実験」では21℃および25℃区でも6週間以内にすべ

て白化・斃死したのに対し、29℃区ではすべて生存していた（図(2)-9）。これに対し、温帯性サンゴは17℃、21℃区で白化・斃死したサンゴ片はない。温帯性サンゴは、熱帯産に比べて低水温側での生存可能範囲が著しく広いのが特徴である。

温帯性サンゴも13℃への耐性には種差が見られた。西伊豆産のエンタクミドリイシと *A. solitaryensis*、串本産のクシハダミドリイシおよびスギノキミドリイシは、「 Ω 調整実験」と「 Ω 非調整実験」の13℃区の両方で、1~4週間以内にはほぼすべてのサンゴ片が斃死した（図(2)-9）。冬の低水温が日本周辺の温帯性サンゴの分布域の決定要因の一つになっていることが示唆された。



図(2)-9 Ω 非調整の5段階水温飼育実験（ Ω 非調整実験）におけるサンゴ片の6週間の状態変化と飼育期間終了時の白化度（誤差棒は標準偏差）。各サンゴ種の各温度区には5~6片のサンゴ片が設置され、その状態は、設定温度に達した直後、および12日、20日、30日および実験終了の41日目に、健康、白化、斃死の3区分で観察した。

温帯性サンゴも13℃への耐性には種差が見られた。西伊豆産のエンタクミドリイシと*A. solitaryensis*、串本産のクシハダミドリイシおよびスギノキミドリイシは、「 Ω 調整実験」と「 Ω 非調整実験」の13℃区の両方で、1~4週間以内にほぼすべてのサンゴ片が斃死した（図(2)-9）。冬の低水温が日本周辺の温帯性サンゴの分布域の決定要因の一つになっていることが示唆された。一方、串本産ヒメエダミドリイシは6週間後もすべて生存し、白化も見られなかった。本研究で検討した中では、ヒメエダミドリイシの低温耐性が最も高い。

温帯性サンゴの低温耐性は、野外での観察から詳しく検討されている。熊本県天草では、*A. solitaryensis*は平均海水温が13℃を下回ると死滅するとされており、最近の水温上昇により分布の北上が熊本県天草でも報告されている（野島・岡本，2008）。また、従来は伊豆半島が北限とされてきたエンタクミドリイシが、近年の冬期水温の上昇により房総半島南部の館山にも生息し、また、その群体が2009年2~3月の2ヶ月にわたる13℃前後の低水温により斃死したことが報告されている（山野・浪崎，2009）。今回の実験結果は、このような野外における先行研究と総合的で、冬の低水温が日本周辺の温帯性サンゴ、特に北上種の分布域の決定要因の一つになっていることが初めて実験的に確認された。

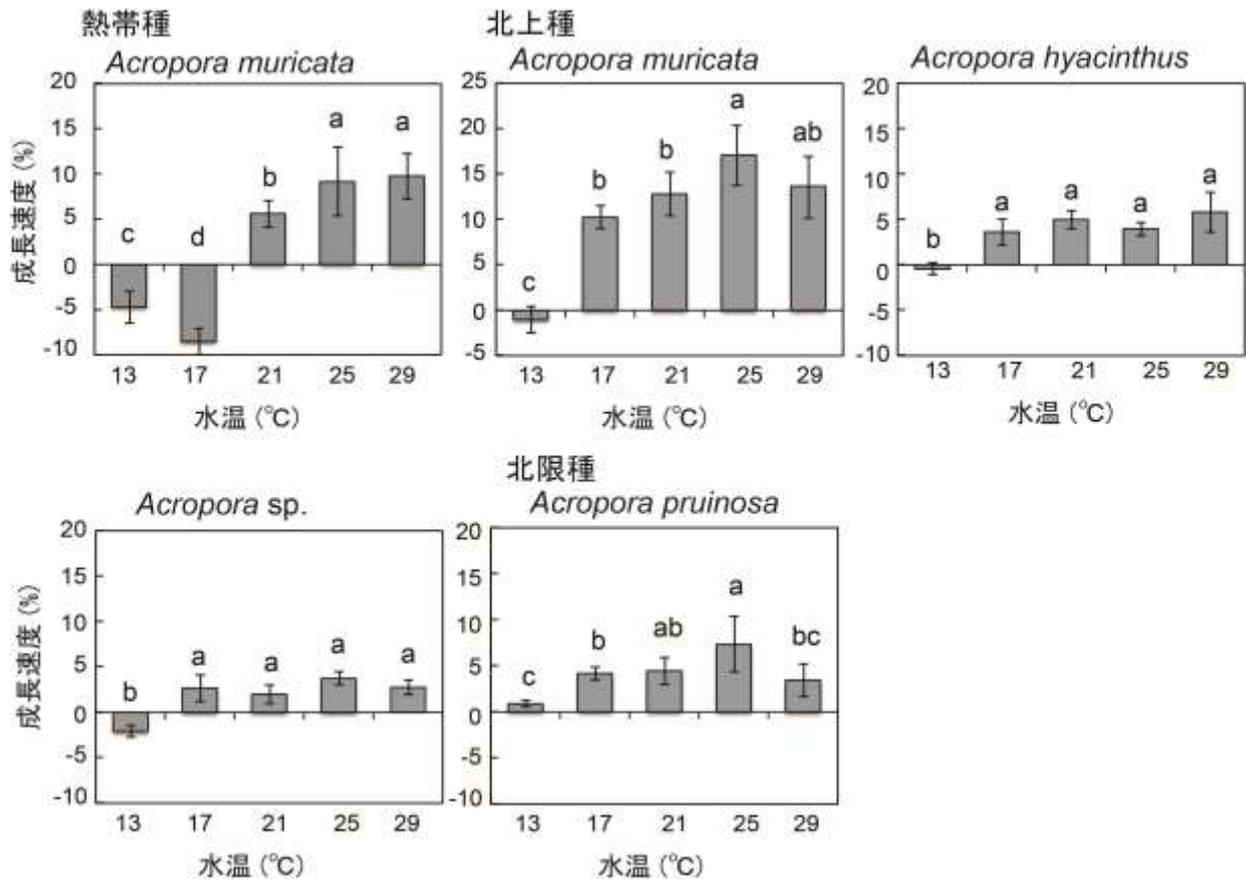
2) 水温がサンゴの骨格成長速度に与える影響

温帯性サンゴの骨格成長速度の温度依存性を「 Ω 非調整実験」の結果から評価した。炭酸系の調整を行わない「 Ω 非調整実験」では、アラレ石飽和度 Ω_{arag} は13℃区から29℃区にかけて約10%しか変化せず、骨格成長速度の温度依存性を検討するには適当である。6週間の水中重量の変化を図(2)-10に示す。温帯性サンゴは25℃区で最大骨格成長を示すものが多い。一方、白化度は25℃区で最低を示したので、温帯性サンゴの最適水温は25℃に近いと考えられる。温帯性サンゴの中で、ヒメエダミドリイシのみ13℃区でも骨格成長が確認された。他のサンゴ種では、斃死し骨格の溶解が進行していた。北限種のヒメエダミドリイシが他の温帯性サンゴと異なっている点は、骨格成長速度が25℃から29℃にかけて、統計的に有意に減少することである。これは、水温の上昇が継続すると、むしろ石灰化量が減少する可能性を示唆している。北上種3種はいずれも25℃から29℃の骨格成長速度に有意な差はなかった。

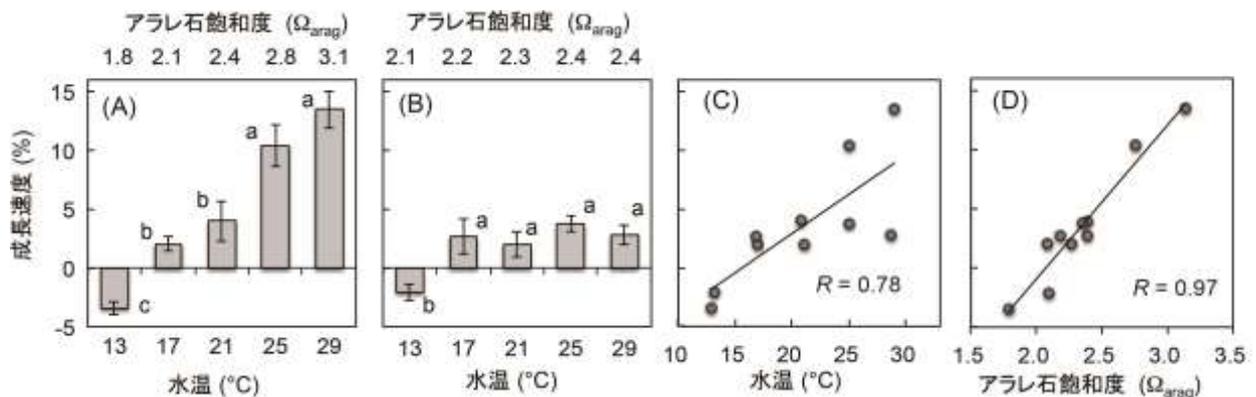
3) サンゴの石灰化と骨格形成に及ぼす炭酸塩飽和度の影響

各温度区の二酸化炭素分圧を一定に調整するために、低温区で高濃度二酸化炭素分圧海水を添加した「 Ω 調整実験」では、本州南岸で予想される Ω_{arag} 値の季節変化よりも、大きな変化幅が設定されており、各サンゴ種が、炭酸塩飽和度にどう応答するかを評価するのに適した実験とした。この実験では、温帯性サンゴ2種の骨格成長速度は、温度とよく相関していた（図(2)-11C）。これは、「 Ω 非調整実験」でみられた成長速度の温度依存性と大きく違っている。温帯性サンゴ2種の成長速度は、アラレ石の飽和度（ Ω_{arag} ）が13℃区の1.8から、29℃区の3.1に大きく増加することに対応すると思われる。

エンタクミドリイシについて、「 Ω 調整実験」と「 Ω 非調整実験」の2つの実験結果を比較したところ、同一温度区での骨格成長速度が、アラレ石の飽和度（ Ω_{arag} ）に対応していることがわかった（図(2)-11）。「 Ω 調整実験」の29℃区では6週間で14%の成長を示したエンタクミドリイシの骨格成長速度は、「 Ω 非調整実験」の29℃区では2.8%に大きく減退するが、同じ水温であ



図(2)-10 Ω 非調整の5段階水温飼育実験におけるサンゴ類の6週間の水中重量変化。インドネシア産スギノキミドリイシ(上左)、北上種である串本産のスギノキミドリイシ(上中)とクシハダミドリイシ(上右)、西伊豆産のエンタクミドリイシ(下左)、そして北限種であるヒメエダミドリイシ(下中)の骨格成長量を示した。負の成長量は、骨格の溶解が生じていることを示す。また、各サンゴ種について、同じ記号の温度区に有意差はない(一元配置ANOVA分析)。25°C区から29°C区にかけて成長量が有意に減少するのは北限種のヒメエダミドリイシだけである。



図(2)-11 2つの5段階水温飼育実験におけるエンタクミドリイシの骨格成長速度。(A) Ω 調整実験(pCO_2 一定実験)、(B) Ω 非調整実験、(C)骨格成長量の水温との相関($R=0.78$, $P=0.0075$) (D)骨格成長量のアラレ石飽和度との相関($R=0.96$, $P<0.0001$)。

ってもアラレ石の飽和度 (Ω_{arag}) が「 Ω 調整実験」の3.1から「 Ω 非調整実験」の2.4に低下することに対応すると思われる。すべての実験区のデータをプールして相関を検討すると、エンタクミドリイシの骨格成長速度は、アラレ石の飽和度と水温の両方に統計的に有意な正相関関係を示すが(図(2)-11D)、アラレ石の飽和度の方がより高い相関係数を示し、危険率は極めて小さい(アラレ石の飽和度との相関、 $R=0.96$, $P<0.0001$; 水温との相関、 $R=0.78$, $P<0.0075$)。この結果は、エンタクミドリイシの骨格成長速度が海水のアラレ石の飽和度の変動敏感に反応していることを示唆する。海洋酸性化による炭酸塩の飽和度(アラレ石の飽和度: Ω_{arag})の低下が、サンゴの成長量に負の影響を与えることが明らかになった。

4) サンゴの骨格組織観察

走査型顕微鏡によるエンタクミドリイシの骨格組織観察の結果を図(2)-12に示す。ポリプ全体像では、低温区ほど骨格形状は細く不規則になる傾向が認められた。この傾向は13°C区で特に顕著であり、他の温度区との違いが明瞭であった。隔膜板(胃腔や胃腔の中央に向かって放射状に突き出している薄い仕切板)に注目すると、高温区ほど骨格の微細構造に凹凸が見られる形状が顕著であった。一方、低温区では表面が溶解したような平坦な構造になっており、29°C区と13°C区と比較するとその違いは明瞭であった(図(2)-12)。

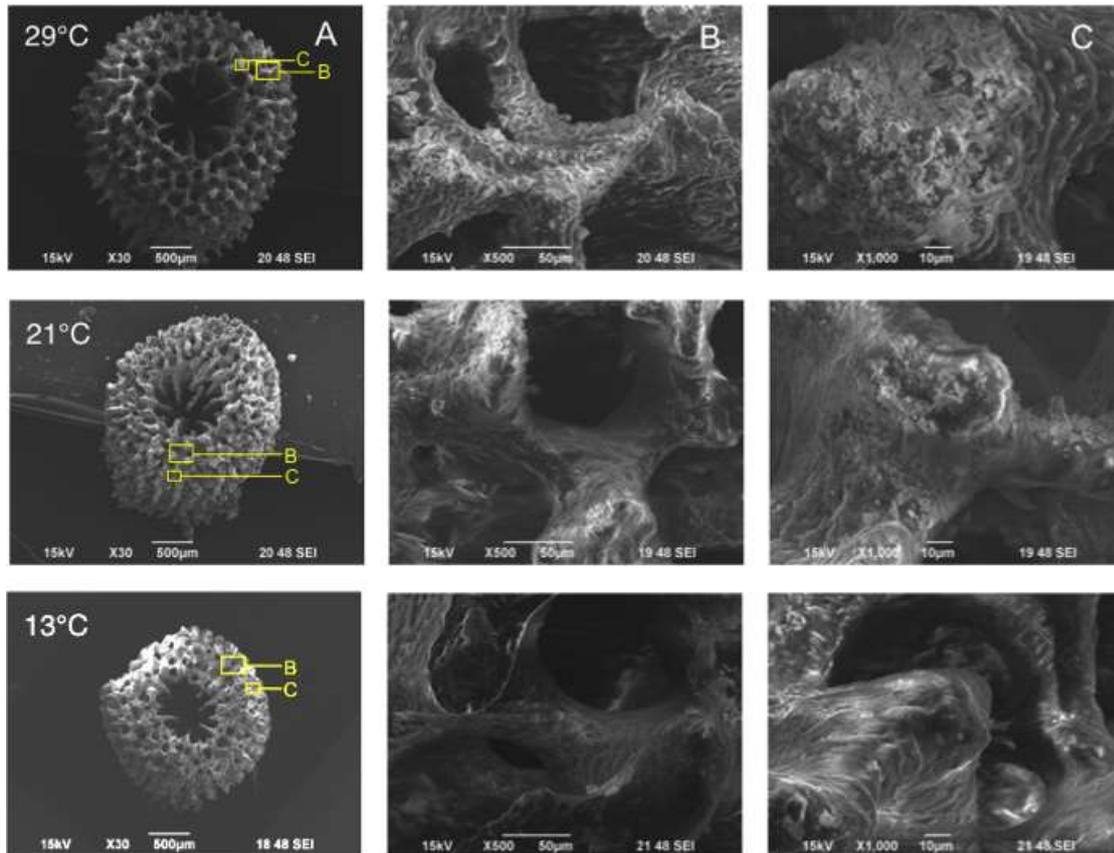
5) 北上種と北限種の違いに関する考察

本州周辺の温帯性サンゴ種に見出される北上種と北限種には、成長速度の水温依存性と炭酸塩飽和度依存性に違いが認められた(表(2)-1)。この傾向は、Yamano et al. (2011)により報告された20世紀に進行した海水温上昇に対する北上種と北限種の挙動の違いを説明しうる実験結果である。エンタクミドリイシなどの北上種に対して、温暖化による水温上昇は冬季も夏季も大きな成長促進の効果を与えたかもしれない。冬季の水温上昇により低水温による斃死を免れ、夏季は高温期の高い Ω_{arag} 値に対応して活発な石灰化を行なって群体を成長させ、北方への分布域拡大を進めてきた可能性がある。一方、北限種であるヒメエダミドリイシは、もともと低温耐性が高く、最低水温の上昇は分布域の拡大に寄与しない。むしろ、夏季の異常高水温は負の効果を与える可能性が示唆された。

表(2)-1 温帯性サンゴの北上種と北限種の骨格成長速度に関する傾向。

		北上種	北限種
代表種		エンタクミドリイシ	ヒメエダミドリイシ
成長速度依存性	水温	13°C付近で低温障害、 17~29°Cの広範囲でよく成長	13°Cでも生存可能、 29°C付近で高温障害
	炭酸塩飽和度	特に高温区で依存性高い	-

温暖化と海洋酸性化の両方が進行する状況下では、夏季の Ω_{arag} 値低下の方がサンゴの分布や北上に制約を与えるのか、それとも、冬季の最低水温上昇の方がサンゴの生存域拡大に有利に働くかが問題である。日本周辺は世界のサンゴ礁分布の北限域である。数値モデルによる水温上昇と



図(2)-12 5段階水温飼育実験におけるエンタクミドリイシの走査型電子顕微鏡写真。「 Ω 調整実験」の29°C、21°C、13°Cの実験区について示した。A列に示した軸中ポリプについて、低温度区では骨格構造が細く不規則になる傾向が認められる。C列に示した骨格の表面は、29°C区 ($\Omega=3.1$) では微細な起伏が顕著であるが、13°C区 ($\Omega=1.8$) では平滑な表面状態が特徴的である。

大気CO₂濃度から予測されるアラレ石の飽和度変化からは、人為起源CO₂排出によって日本周辺のサンゴ分布可能域は、水温上昇によって高緯度側へ北上する速度よりも、海洋酸性化により低緯度側へ縮小する速度の方が大きくなると予測されている (Yara et al., 2012)。今回のエンタクミドリイシの結果は、Yara et al. (2012) の予測と整合的である。しかし、2種類の5段階温度実験では、用いたサンゴ種の制約により、成長速度のアラレ石飽和度依存性を検討できたのは、エンタクミドリイシのみであった。スギノキミドリイシなどの他の北上種や北限種であるヒメエダミドリイシのアラレ石飽和度依存性の検討は、平成25年度以降の課題に残された。

今回実施した2回の5段階水温飼育実験では、低温区の17°Cについて、 Ω_{arag} 値が2.1~2.2の狭い範囲でしか検討できなかった。また、高温側についても、今回の25°C区における Ω_{arag} 値2.4~2.8であって、本州南岸の海水の夏の Ω_{arag} 値と比べると若干低く範囲も狭かった。そこで今後、低温区 (15~17°C付近) および高温区 (25°C付近) でのサンゴの成長速度のアラレ石飽和度依存性を、近未来に予想される水準を含めて、より大きな Ω_{arag} 範囲で検討する必要がある。本研究課題に向けて新たに開発された大容量二酸化炭素制御実験装置では、水槽6台の二酸化炭素分圧の制御と計

測が可能となったので、この目的のために活用する予定である。

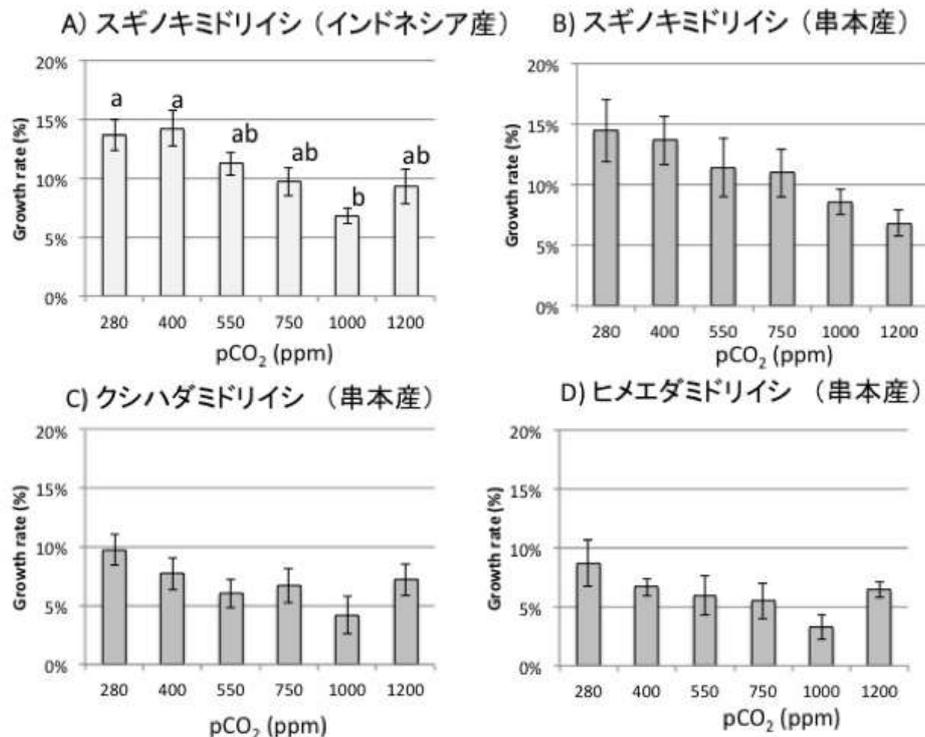
(3) 25℃および27℃における6段階二酸化炭素分圧飼育実験

1) 飼育条件の改善と対象種の拡大

平成24年度の各種サンゴの長期蓄養実験（5段階水温飼育実験）では、総合的に評価して、エンタキミドリイシおよび*A. solitaryensis*が、海生研柏崎の実験室環境での長期飼育が比較的容易な種と考えられた。平成25年度にはサンゴ蓄養水槽の水質改善に取り組み、蓄養水槽では、大部分の海水はろ過システムを通して循環供給するとともに、試験場の取水海水を十分な曝気して最小限の供給量で加えた。この結果、蓄養水槽の硝酸態窒素とリン酸態リンの濃度には著しい低下が見られ、サンゴの長期飼育環境が向上した。この改善により、スギノキミドリイシの成長速度が増進しポリプの進展も活発で、健康状態が良好に保たれ、さらに飼育難度の高いクシハダミドリイシについての取り扱いも可能になった。6段階の二酸化炭素分圧を同時にモニターできる新装置が運用されるようになり、平成25年度以降は、主としてスギノキミドリイシを対象として、ヒメエダミドリイシ、クシハダミドリイシも含めて、25℃と27℃における6段階のCO₂分圧による飼育実験を実施した。

2) 25℃の6段階二酸化炭素分圧飼育実験

25℃の6段階二酸化炭素分圧飼育実験について、その二酸化炭素分圧制御結果は図(1)-10、表(1)-2に示した。実験結果としてインドネシア産と串本産のスギノキミドリイシ、および、串本産

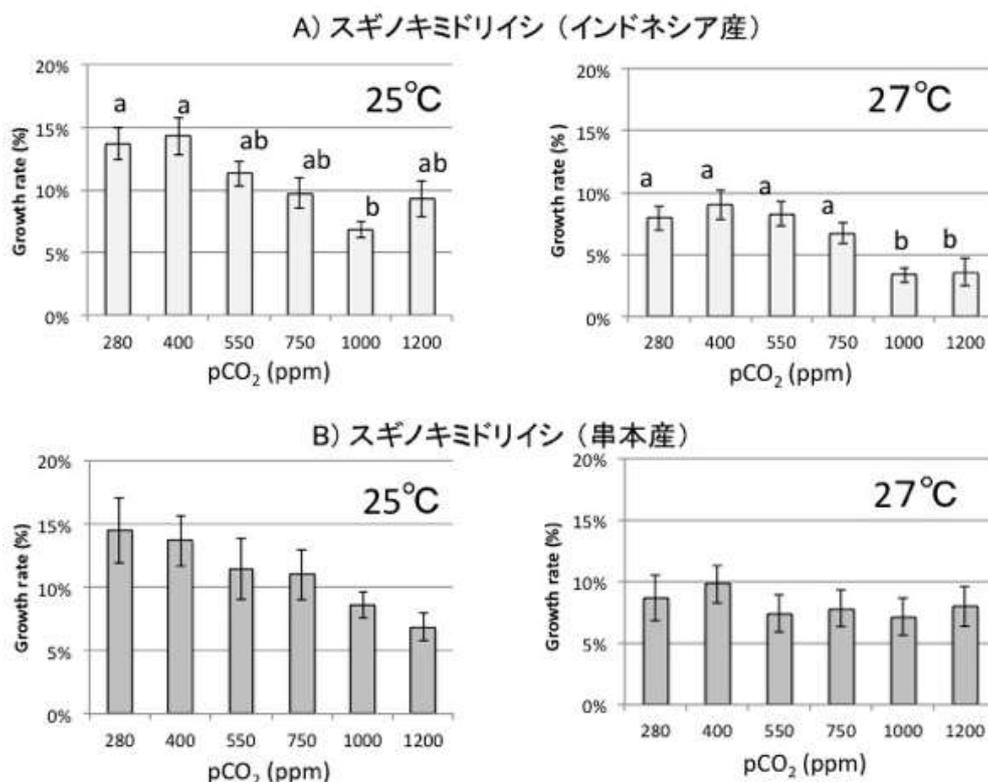


図(2)-13 水温25℃における6段階二酸化炭素分圧実験の各種サンゴ成長量。誤差棒は標準誤差(±1 SE)を示した。一元配置分散分析により、同じ記号が付与された実験区とは有意差がないことを示す。

のヒメエダミドリイシとクシハダミドリイシについての骨格成長量を図(2)-13に示した。25℃では、串本産スギノキミドリイシは、高二酸化炭素分圧（低アラレ石飽和度）区で、統計的な有意性は認められないものの、成長の低下傾向がみられた（図(2)-13B）。ただし、この傾向は、高二酸化炭素分圧区で統計的に有意な成長の低下が認められたインドネシア産のスギノキミドリイシと比較して軽微であった。ヒメエダミドリイシとクシハダミドリイシについては、条件区間で統計的に有意な差異は認められなかった。これらのサンゴ種が、25℃においては酸性化海水に対する反応が不明瞭で、すなわち海洋酸性化現象による骨格成長の低減影響は大きくはないことを示唆する。

3) 27℃の6段階二酸化炭素分圧飼育実験

27℃での6段階二酸化炭素分圧飼育実験を行ったインドネシア産と串本産のスギノキミドリイシの成長量の計測結果を図(2)-14に示した。インドネシア産のスギノキミドリイシは、27℃でも25℃と同様に高二酸化炭素分圧（低アラレ石飽和度）区で、統計的に有意な成長量の減少が認められた（図(2)-14）。串本産のスギノキミドリイシでは、25℃に加え、27℃でも統計的に有意な差異は認められなかった。これは、熱帯に分布するものは、海洋酸性化に敏感に反応する可能性があり、一方で、本州温帯域産のサンゴは、熱帯性のサンゴよりも海洋酸性化への感受性がやや低いものがあることを示唆する。

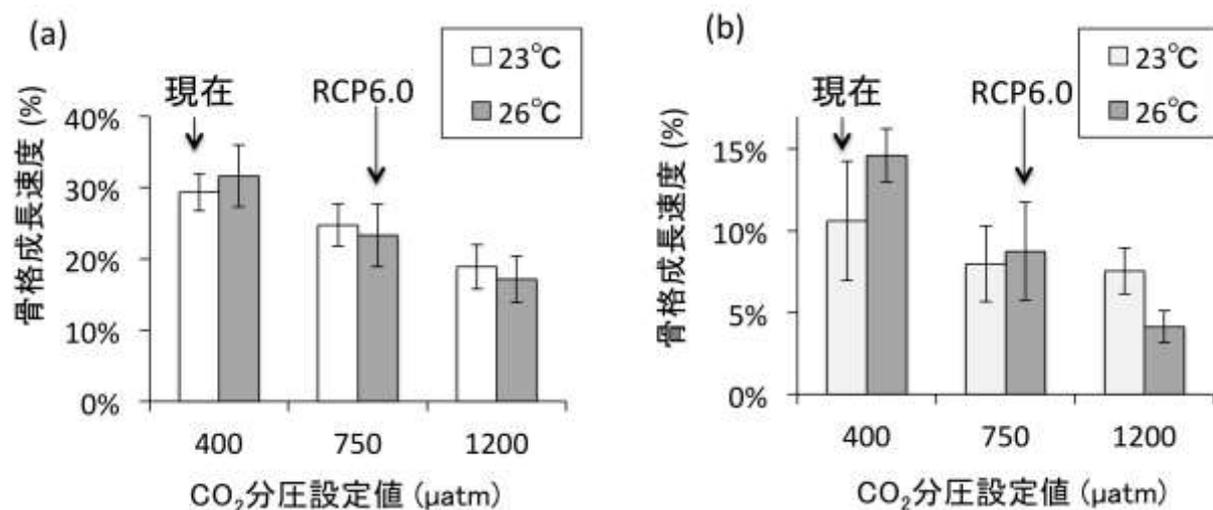


図(2)-14 インドネシア産と串本産のスギノキミドリイシの水温25℃と27℃における6段階CO₂分圧実験のサンゴ成長量。誤差棒は標準誤差(±1 SE)を示した。一元配置分散分析により、同じ記号が付与された実験区とは有意差がないことを示す。

日本周辺は世界のサンゴ礁分布の北限域となっており、近年、数値モデルとアラレ石の飽和度のデータから従来と同じ量の二酸化炭素の排出が継続した場合、日本周辺のサンゴの分布可能域は、水温上昇によって高緯度側へ北上する速度よりも、海洋酸性化により低緯度側へ縮小する速度の方が大きくなることが予測されている (Yara et al., 2012)。これまでに、アラレ石の飽和度がサンゴの骨格成長に与える影響についての飼育実験手法による検討例は、主に熱帯性のサンゴを対象として多いが、日本周辺の温帯性サンゴに着目した研究は本研究が初めてである。平成24年度には、北上種の一つ、エンタクミドリイシについて、その成長速度の炭酸塩飽和度への感受性が高いことを示唆する予察的な結果が得られたが、平成25年度には畜養中の状態が良好であったスギノキミドリイシの実験を優先したために、エンタクミドリイシについて十分な検討は行えなかった。二酸化炭素分圧増加および水温上昇に対する応答の違いがあるかどうかを検討する対象種として、北上種（分布域を北方に拡大している種）はスギノキミドリイシが、北限種（北限域に分布するが北上していない種）はヒメエダミドリイシが主たる対象となろう。

4) 水温2条件二酸化炭素分圧3段階の複合影響実験

平成26年度には海水温の上昇と海水の酸性化が、本州南岸に分布する温帯性サンゴに与える影響について、水温および二酸化炭素分圧を同時に調整した環境で飼育する実験から評価した。温帯性サンゴの代表的な生息地紀伊半島串本の年平均水温に近い約23℃と、今世紀末に予測される水温上昇約3℃を加えた26℃区の2つの温度区を設定し、また、二酸化炭素分圧は、対照区として現在の約400 μatm 、代表的炭素パス (RCP) 6.5相当の750 μatm 、>RCP8.5相当の1200 μatm の3段階を設定した。第1回目の長期飼育実験は、北上種のスギノキミドリイシとクシハダミドリイシを対象に、2014年7月29日から11月10日に至る約15週間実施した。この期間の実験水槽の二酸化炭素濃度の測定記録を図(1)-12に、平均値を表(1)-3に示した。第2回目の長期飼育実



図(2)-15 温帯性サンゴの北上種のスギノキミドリイシとクシハダミドリイシを対象にした水温2段階、二酸化炭素分圧3段階の長期飼育実験による骨格成長速度の変化。

験は、北上種のスギノキミドリイシと北限種のカシハダミドリイシ等を対象に、2014年11月27日から2015年1月21日に至る約8週間実施した。

北上種のスギノキミドリイシとカシハダミドリイシを対象にした飼育実験の結果を図(2)-15に示す。現在の海洋条件に相当する400 μatm 区では、3°Cの昇温は、北上種のスギノキミドリイシとカシハダミドリイシの骨格成長を促進させる効果が見られた。一方、二酸化炭素分圧の増加に伴い、26°C区ではこれらの北上種の骨格成長率が低下した。今後、水温の上昇によるサンゴの骨格成長促進と、海洋酸性化による抑制がちょうど釣り合うような状態を経由して、それ以上の海洋酸性化の進行はサンゴの骨格成長を現在よりも低下させてしまうことが示唆された。一方、北限種のカシハダミドリイシではこのような傾向は認められなかった。沖縄に分布する熱帯・亜熱帯性の造礁サンゴ類には、海水のpHの低下、あるいはCO₂分圧の上昇に伴って、骨格成長速度が低下する種があることが知られている。生息に好適な水温の上限に近い熱帯・亜熱帯性のサンゴの場合は、地球温暖化による高水温化は、大きなストレスとなると考えられている。しかし、温帯域にあたる日本周辺では今後、地球温暖化によってサンゴ分布域が北上し、また、海洋酸性化による成長抑制から南下が予想されており、今回の実験結果は、基本的にこの傾向を支持する。しかし、北上種と北限種ではその傾向に違いが見られることが示唆された。

(4) 将来の気候変動と温帯性サンゴへの影響についての考察

海洋酸性化現象は、最近10年程前から新しい地球環境問題として注目を集めてきた(Orr et al., 2005; 諏訪ほか, 2010)。海水のpHと炭酸塩の飽和度(Ω)の低下は、海洋生物の発生や石灰化に悪影響を与えると懸念されており、海洋酸性化問題は、IPCCの第5次評価報告書においても重要課題として取り上げられている(IPCC, 2014)。

海洋酸性化に関して、最初に影響を受けるのは、高緯度海域に棲息するあられ石(アラゴナイト)殻をもつ翼足類と考えられている(Orr et al., 2005)。それは、海水中の炭酸塩の飽和度(Ω)は炭酸イオン(CO₃²⁻)濃度と温度の関数であり、あられ石は方解石(カルサイト)よりも飽和度(Ω)が低く、高緯度海域は低水温でより小さい Ω 値を取るためである。一般的に有孔虫、円石藻、ホタテガイなどは方解石を、サンゴ、シャコガイ、真珠層を作るアコヤガイはアラレ石で形成されている。しかし、低緯度海域は水温が高いために、高緯度域に比較して Ω 値は高いものの、やはり産業革命以前の値からの減衰は急速で、サンゴ礁生物への影響も懸念され(Kleypas et al., 1999)。数多くの実験的研究が実施されてきた。

サンゴ礁に関しては、地球温暖化の影響も顕著である。熱帯地域では、エルニーニョ現象などに伴う異常高水温によって誘発されたサンゴ白化現象が頻発している。Yamano et al. (2011)は、日本の本州周辺で生息域を急速に北方に拡大するサンゴ種の存在を報告している。日本の温帯域の海水温は、過去80年間に統計的に有意な上昇を示してきた。そして、熱帯地域のサンゴ礁形成に重要なスギノキミドリイシ(*Acropora muricata*)とカシハダミドリイシ(*Acropora hyacinthus*)を含む4つの主要なサンゴ種のグループは、1930年以降、極方向へ範囲拡大を示し、その速度は14 km/年に達する。一方、分布域南限範囲の縮小または局所絶滅を示す種は認められなかった。この結果は、温帯沿岸生態系の基本的変化が急速に進行していることを示唆する。地球温暖化に起因する水温上昇は今後も進行すると考えられサンゴはこのまま北上を続けることが示唆されているが、日本の高緯度域に生息するサンゴがどのような適応を示すのか、あるいは適応することが可

能であるかも重要であるにも関わらず詳しいことは明らかになっていない。長期的には海洋酸性化の進行により Ω 値の低下が造礁サンゴの北上に制約をかける可能性もあるかもしれない。Yara et al. (2012) は、炭素循環を含む気候モデルによって出力された海水温とあられ石飽和度 (Ω) のデータを用いて、地球温暖化に伴う海水温上昇と海洋酸性化により、日本近海でサンゴが息できる領域が将来大幅に縮小することを予測している。

一方、海水温の上昇と海水の酸性化にサンゴやその他の海洋生物がどのように影響を受けるかについて、環境を精密に制御した水槽飼育実験手法を用いた研究が活発に行われている（総説として、Kleypas et al., 2006）。2011年1月に沖縄県名護市で開催されたIPCC主催による海洋酸性化ワークショップでは、海洋石灰化生物の海洋酸性化に対する応答の実験的研究についてレビューが行われた。その中で、ハプト藻類および浮遊性有孔虫については、ほぼすべての研究例が海洋酸性化の進行に伴う石灰化量の減少を示す結果であるのに対して、サンゴについては、石灰化量の低下と増加、あるいは無影響とする研究結果が混在する状況であることが指摘された（IPCC, 2014）。サンゴ礁棲の大型有孔虫については、海水の二酸化炭素分圧の上昇に伴って、石灰化量が減少する種と増大する種があることが報告されている（Hikami et al., 2011）。このような多様な結果が、種による違いであるのか、それぞれの石灰化機構の差異に起因するのかを解明することは、今後進行する海洋酸性化が海洋石灰化生物に与える影響を正確に予想するにつながると考えられる。日本列島周辺で生息域を急速に北方に拡大するサンゴ種の今後の推移を見極めるためにも、このような環境を精密に制御した水槽飼育実験手法は有効である。特に、水温の上昇と二酸化炭素分圧の上昇の複合影響を評価できる実験系は有効である。

サンゴの飼育実験、特に環境影響評価実験に際しては、種を厳密に同定した群体を用い、環境条件比較実験にはクローン群体を用いるなど、生物学的解析を大幅に取り入れる必要がある。また、サンゴの白化状態などの代謝生理学的特徴をモニターしつつ、その実験期間に形成された骨格の成長速度を計測する必要がある。サンゴの骨格成長については、流れ（Suzuki et al., 2008）や光量（Omata et al., 2008）、群体毎の成長速度（Hayashi et al., 2013）が、どのようにに影響するかについては、飼育実験的手法により既に検討が行なわれており、これらの知見を最大限に活用して、本研究課題の実施にあたった。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

先行研究で実施してきた海洋生物飼育において精密に二酸化炭素分圧を調整する技術を発展させることにより、従来行えなかったCO₂条件での実験を行った。具体的には、海水の水温と二酸化炭素分圧の両者を調整したうえでその二酸化炭素分圧を計測し、将来の高い二酸化炭素分圧と温暖化の両方が現れる条件で海洋生物の飼育を行う技術が確立した。研究課題2年度には、サンゴの影響評価においてよりよい飼育条件を設定でき、熱帯種と温帯種の間で、海洋酸性化影響に違いがあることを見出した。これは、温帯域への熱帯性サンゴの北上の今後を予測するために重要な情報となる。研究課題最終年度には、サンゴの影響評価について、温度、二酸化炭素分圧の複合影響の精密な評価を行うことができた。その結果、近未来の日本沿岸のサンゴについては、水温上昇が熱帯性サンゴの北上を進めるが、今世紀後半など二酸化炭素分圧がさらに高まる場合において海洋酸性化影響が北上を抑制する可能性が示唆された。このような実験的研究例は世界で初

めてであり、実際に北上サンゴが確認されているわが国でしかできない貴重な研究である。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない。

<行政が活用することが見込まれる成果>

平成27年2月21日には、本研究課題が主催し「海洋酸性化がわが国周辺の生物に与える影響を評価する」と題する一般向け研究成果報告会にて、研究分担者が講演を行った。また、平成27年3月16日には、那覇市で開催されたIPCC公開シンポジウム「地球温暖化問題について考えよう！最新の科学と温室効果ガス排出量監視の取りくみ」において、研究分担者が本課題の成果に関連する講演を行った。この講演の発表資料は、公益財団法人地球環境戦略研究機構ホームページにて公開されている（日本語版：<http://www.iges.or.jp/jp/alliges/20150316.html>、英語版：<http://www.iges.or.jp/en/alliges/20150316.html>）。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文（査読あり）>

1) A. Kato, M. Hikami, N. H. Kumagai, A. Suzuki, Y. Nojiri, and K. Sakai: Marine Environmental Research, 94, 1-6, 2013. doi:10.1016/j.marenvres.2013.10.010

“Negative effects of ocean acidification on two crustose coralline species using genetically homogenous samples”

2) S. Ohki, T. Irie, M. Inoue, K. Shinmen, H. Kawahata, T. Nakamura, A. Kato, Y. Nojiri, A. Suzuki, K. Sakai, and R. van Woesik: Biogeosciences, 10, 6807-6814, 2013. doi:10.5194/bg-10-1-2013

“Calcification responses of symbiotic and aposymbiotic corals to near-future levels of ocean acidification”

<その他誌上発表（査読なし）>

特に記載すべき事項はない。

(2) 口頭発表（学会等）

1) 氷上 愛、石村豊穂、藤田和彦、鈴木 淳、野尻幸宏、酒井一彦、川幡穂高：日本地球惑星科学連合大会、千葉（2013）

「海洋酸性化によるサンゴ礁棲有孔虫殻の安定同位体比の変化」

2) 森 千晴、鈴木 淳、磯野良介、渡邊裕介、林 正裕、山本雄三、野尻幸宏、山野博哉、野村恵一、井上 麻夕里、西田 梢、中島 礼、川幡穂高：日本地球惑星科学連合大会、千葉（2013）

「気候変動が温帯性サンゴの成長に及ぼす影響の飼育実験による検討」

- 3) M. Hikami, T. Ishimura, K. Fujita, A. Suzuki, Y. Nojiri, H. Kawahata: Fall Meeting, American Geophysical Union, San Francisco, USA, 2013.
“The carbon and oxygen isotope records of reef-dwelling foraminifers subjected to five varied pCO₂ seawater”
- 4) S. Kim、鈴木 淳、林 正裕、山本雄三、堀田公明、磯野良介、渡邊裕介、山野博哉、野村 恵一、西田梢、井上麻夕里、張勁、野尻幸宏：日本地球惑星科学連合大会、千葉（2014）
「海洋酸性化が温帯性サンゴの成長に与える影響について」
- 5) 鈴木 淳、林 正裕：第12回環境研究シンポジウム、東京（2014）
「海洋酸性化がサンゴの成長に与える影響についての飼育実験研究」
- 6) 鈴木 淳：環境研究総合推進費成果報告会、東京（2015）
「海洋酸性化がわが国周辺の生物に与える影響を評価する」
- 7) 鈴木 淳、山野博哉：気候変動に関する政府間パネル(IPCC) 公開シンポジウム、那覇（2015）
「日本周辺域で見られるサンゴの生息域変化と海洋酸性化」
- 8) 鈴木 淳：日本地球惑星科学連合大会スペシャルレクチャー、千葉（2015）
「サンゴ、サンゴ礁と地球環境ー生物学と地球科学の連携研究ー」

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない。

(4) 「国民との科学・技術対話」の実施

- 1) 環境省環境研究総合推進費一般向け研究成果報告会「海洋酸性化がわが国周辺の生物に与える影響を評価する」（平成27年2月21日、TKP市ヶ谷カンファレンスセンター・東京、聴講者約60名）

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

(6) その他

特に記載すべき事項はない。

8. 引用文献

- 1) 野島 哲・岡本峰雄 (2008) 造礁サンゴの北上と白化. 日本水産学会誌, 74, 884-888,
doi.org/10.2331/suisan.74.884
- 2) 山野博哉・浪崎直子 (2009) 最前線のサンゴ：千葉県館山のエンタクミドリイシ群体の変化. 日本サンゴ礁学会誌, 11, 71-72.
- 3) Yamano, H., Sugihara, K. and Nomura, K. (2011) Rapid poleward range expansion of tropical reef corals in response to rising sea surface temperatures. *Geophysical Research Letters*, 38: L04601.

- 4) Yara, Y., Vogt, M., Fujii, M., Yamano, H., Hauri, C., Steinacher, M., Gruber, N. and Yamanaka, Y. (2012) Ocean acidification limits temperature-induced poleward expansion of coral habitats around Japan. *Biogeosciences*, 9: 4955–4968.
- 5) Orr, J. C., Fabry, V. J., Aumont, O., Bopp, L., Doney, S. C., Feely, R. A., Gnanadesikan, A., Gruber, N., Ishida, A., Joos, F., Key, R. M., Lindsay, K., Maier-Reimer, E., Matear, R., Monfray, P., Mouchet, A., Najjar, R. G., Plattner, G.-K., Rodgers, K. B., Sabine, C. L., Sarmiento, J. L., Schlitzer, R., Slater, R. D., Totterdell, I. J., Weirig, M.-F., Yamanaka, Y., and Yool, A. (2005) Anthropogenic ocean acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms, *Nature*, 437, 681–686, doi:10.1038/nature04095.
- 6) 諏訪僚太・中村崇・井口亮・中村雅子・守田昌哉・加藤亜記・藤田和彦・井上麻夕里・酒井一彦・鈴木 淳・小池勲夫・白山義久・野尻幸宏 (2010) 海洋酸性化がサンゴ礁域の石灰化生物に及ぼす影響. *海の研究*, 19, 21-40.
- 7) IPCC (2014) Summary for policymakers. In: *Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Part A: Global and Sectoral Aspects. Contribution of Working Group II to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Field, C.B., V.R. Barros, D.J. Dokken, K.J. Mach, M.D. Mastrandrea, T.E. Bilir, M. Chatterjee, K.L. Ebi, Y.O. Estrada, R.C. Genova, B. Girma, E.S. Kissel, A.N. Levy, S. MacCracken, P.R. Mastrandrea, and L.L. White (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, pp. 1-32.
- 8) Kleypas, J. A., Buddemeier, R. W., Archer, D., Gattuso, J.-P., Langdon, C., and Opdyke, B. N. (1999), Geochemical consequences of increased atmospheric carbon dioxide on coral reefs, *Science*, 284, 118–120.
- 9) Kleypas, J. A., R. A. Feely, V. J. Fabry, C. Langdon, C. L. Sabine, and L. L. Robbins (2006) Impacts of Ocean Acidification on Coral Reefs and Other Marine Calcifiers: A Guide for Future Research. Report of a workshop held on 18-20 April 2005, St. Petersburg, FL, sponsored by NSF, NOAA, and the U.S. Geological Survey, 88pp.
- 10) Hikami, M., Ushie, H., Irie, T., Fujita, K., Kuroyanagi, A., Sakai, K., Nojiri, Y., Suzuki, A., Kawahata, H. (2011) Contrasting calcification responses to ocean acidification between two reef foraminifers harboring different algal symbionts. *Geophysical Research Letters*, 38, L19601, doi:10.1029/2011GL048501.
- 11) Suzuki, A., Nakamura, T., Yamasaki, H., Minoshima, K., Kawahata, H. (2008) Influence of waterflow on skeletal isotopic composition in the coral *Pocillopora damicornis*. *Coral Reefs* 27:209–218.
- 12) Omata, T., Suzuki, A., Sato, T., Minoshima, K., Nomaru, E., Murakami, A., Murayama, S., Kawahata, H., Maruyama, T. (2008) Effect of photosynthetic light dosage on carbon isotope composition in the coral skeleton: Long-term culture of *Porites* spp. *Journal of Geophysical Research-Biogeosciences*, 113, G02014, doi:10.1029/2007JG000431
- 13) Hayashi, E., Suzuki, A., Nakamura, T., Iwase, A., Ishimura, T., Iguchi, A., Sakai, K., Okai, T., Inoue, M., Araoka, D., Murayama, S., Kawahata, H. (2013) Growth-rate influences on coral climate

proxies tested by a multiple colony culture experiment. *Earth and Planetary Science Letters*,
362,198-206, doi:10.1016/j.epsl.2012.11.046

(3) 海洋生物の再生産過程における水温と海洋酸性化の影響

公益財団法人海洋生物環境研究所

実証試験場 応用生態グループ

林 正裕・吉川貴志

〈研究協力者〉 山本雄三・渡邊裕介・諏訪僚太

平成24(開始年度)～26年度累計予算額：36,265千円（うち、平成26年度予算額：11,440千円）
予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

人間活動で増加した大気中の二酸化炭素(CO₂)は地球温暖化と共に海洋酸性化を引き起こす。海洋酸性化の魚類への影響評価は、熱帯性小型魚類の行動を対象とした研究に偏っており、水産有用魚種についての情報は限られている。また、高水温と海洋酸性化の魚類への複合影響を調べた報告は殆ど無い。そこで、大型水槽を用いて水産有用魚種の再生産過程を対象とした影響評価実験を実施し、今後の水産資源における温暖化と海洋酸性化の影響を検討した。

初めに、サブテーマ(1)で確立した容量1t水槽におけるCO₂分圧の制御方法を用いてシロギス(*Sillago japonica*)親魚の産卵実験を行い、産卵・受精から仔魚の成長段階に対する酸性化の単純影響及び温暖化との複合影響をそれぞれ明らかにした。単純影響を調べた結果、シロギスの産卵回数、卵の正常発生率、孵化率、孵化仔魚の耳胞面積及び脊索長に5段階のCO₂分圧区(対照区(約500 μ atm)・850・1,400・2,400・4,000 μ atm区)間で有意な変化はみられなかった。しかし、複合影響を調べた結果、卵の正常発生率で有意な複合影響(+2 $^{\circ}$ C-2,000 μ atm区で正常発生率が低下)が認められた。次に、産卵実験中に産出した卵に対するCO₂耐性の有無を異常発生24時間半数影響分圧から調べた結果、卵の耐性に変化はなかった。最後に、より大型の魚類への影響評価を可能とするために、サブテーマ(1)において容量10t水槽でのCO₂分圧の制御方法を開発し、その方法の有効性をマダイ(*Pagrus major*)の産卵実験によって試みた。その結果、マダイの再生産過程への影響評価を問題なく実施できた。

以上の結果より、シロギスの再生産過程は、海洋酸性化に対して感受性が低いが、水温上昇と酸性化の複合影響を受ける可能性が示唆された。また、容量10t水槽レベルでの影響評価方法を確立した。今後は、より多くの魚種への影響評価を行うことで、将来の海洋酸性化が水産業や海洋生態系に及ぼす影響の予測に必要な情報を蓄積していく必要がある。

[キーワード]

二酸化炭素、海洋酸性化、地球温暖化、複合影響、水産有用魚種

1. はじめに

人間活動で増加した大気中のCO₂は地球温暖化を引き起こす。地球温暖化と並び、近年最も注目される地球環境問題の一つは、人為起源のCO₂によって引き起こされる海洋酸性化である(IPCC, 2006)。様々な海洋生物の分類群への影響評価が進められる中、魚類への影響評価の例数は未だ

少なく、熱帯性小型魚類の行動を対象とした研究に偏っており（Wittman and Pörtner, 2013）、水産有用魚種についての情報は限られている。また、海洋酸性化は地球温暖化による水温上昇を伴うものであり、例えばシロギスの再生産過程は高水温の影響を受けやすく（Hotta et al., 2001）、酸性化と高水温の複合条件下では何らかの影響を受けることが危惧される。魚類への高水温と海洋酸性化の複合影響評価には、適切な飼育環境、優れた生物飼育技術、そして水温及びCO₂の精密な同時制御技術が必要とされるため、研究報告例は殆ど無い。

2. 研究開発目的

このような現状を背景に、当研究分担機関がこれまでに培ってきた水産有用魚種の飼育技術と水温制御技術を活用し、未だ研究例の無い水産有用魚種を対象とした再生産過程への影響評価実験を実施し、今後の水産資源への海洋酸性化影響を検討することを本サブテーマの目的とする。また、世界に先駆けたCO₂分圧精密制御装置を用いて、水産有用種を対象とした影響評価実験を行うことで、世界的な影響評価の知見の充実に貢献する。

3. 研究開発方法

海洋酸性化の生物影響についての知見は、単一の生活史段階への影響や小型魚類について調べたものが多く、複数の生活史段階を含む魚類の再生産過程や水産有用魚種を対象とした研究例は殆ど無い。また、水産有用種への水温と高CO₂分圧の複合影響を調べた研究例も無い。そこで、これまでに研究例の無い水産有用種であるシロギス（*Sillago japonica*）とマダイ（*Pagrus major*）を用いて、魚類の再生産過程における水温と海洋酸性化の影響評価実験を行った。シロギスは、東アジアに広く分布し、北海道以南の日本各地の沿岸海域に広く分布しており（益田ら, 1975）、漁業及び遊漁の主要な対象種の一つとなっている。また、マダイは北海道以南から南シナ海北部までの北西太平洋に分布しており、高級魚として扱われる漁業の主要な対象種の一つとなっている（芹澤ら, 2003）。

具体的には、下記の5つの項目についての研究業務を行った。（1）シロギスの産卵適水温を調査した。（2）飼育海水のCO₂分圧を変化させた条件を設け、産卵適水温下において酸性化がシロギスの再生産過程に及ぼす単純影響を調査した。（3）飼育海水の水温とCO₂分圧を個別に変化させた条件及び同時に変化させた条件を設け、温暖化と酸性化がシロギスの再生産過程に及ぼす複合影響を調査した。（4）産卵時の水温とCO₂分圧の違いによるシロギス卵のCO₂に対する耐性変化を調査した。（5）サブテーマ（1）において開発した大型水槽（容量10t）におけるCO₂分圧の制御方法の有効性を、マダイの産卵実験によって検証した。

（1）シロギスの産卵適水温の調査

シロギスの再生産過程における水温と海洋酸性化の影響を調査するにあたって、予めシロギスの産卵適水温を調査した。

供試魚は、新潟県柏崎市地先にて釣獲後、海洋生物環境研究所実証試験場において1ヶ月以上予備飼育した天然魚を用い、容量5tの屋外実験水槽1基に雄10個体、雌10個体を収容した。予備飼育は、自然海水（ろ過海水）を注水量約42L/分でかけ流して行った（換水率約0.5回転/時間）。予備飼育期間及び実験期間中の光条件は、水槽内に60W白熱灯1基を設置し日長を15時間明期、9時

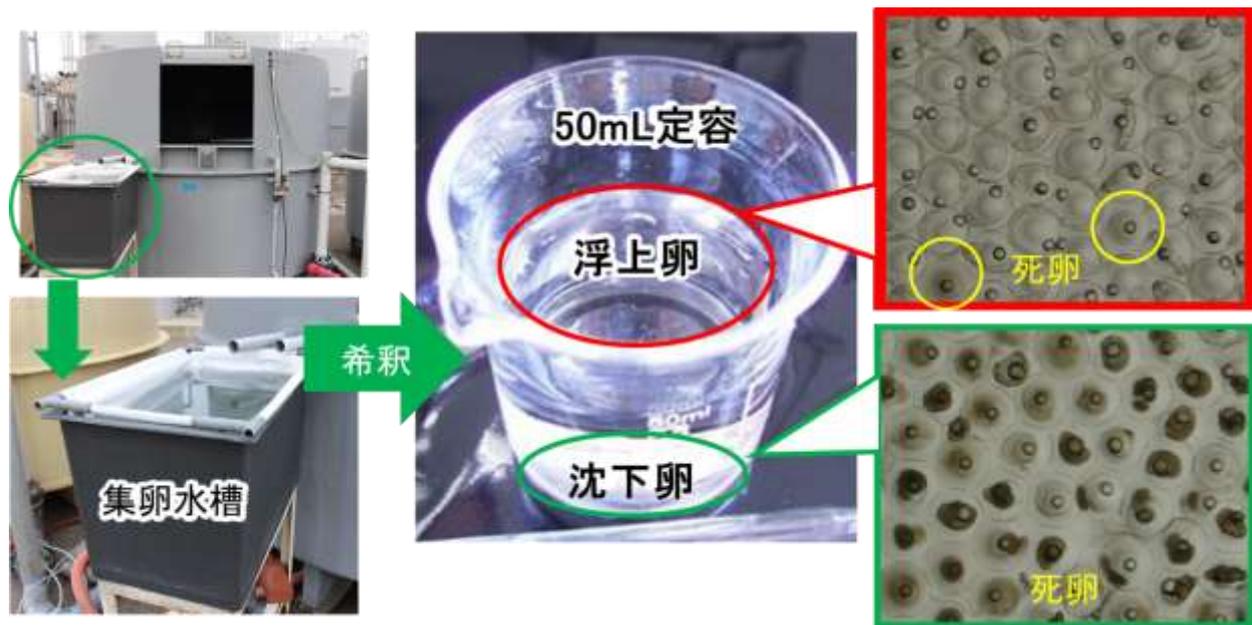
間暗期の長日条件に調整した。また、給餌は、午前9時に冷凍アミ、午前4時にモイストペレットを、それぞれ魚体重の1%に相当する量を与えた。雌雄の判別は麻酔した個体の下腹部を軽く押し、精液が体外へにじみ出たものを雄、出なかったものを雌とした。

実験水槽（5t、図(3)-1）に自然海水を注水量約8L/分でかけ流し（換水率約0.5回転/時間）、その水温は10分間隔で测温抵抗体センサー（R900-32、チノー）を用いて測定し、水温記録器（DX230、横河電機）によって記録した。

実験期間中、毎日、実験水槽直近に設置した集卵水槽（図(3)-1）において卵の有無を確認した。卵が認められた場合、集卵水槽から全卵を回収して20Lの海水中で均一に分散させた後、50mLのサブサンプルを分取し、その中の沈下卵数（死卵）、浮上卵数及び浮上卵の正常発生卵数を計測した（図(3)-2）。これらの計数値より、産卵数（沈下卵数+浮上卵数）、浮上卵率（浮上卵数/産卵数×100）及び浮上卵の正常発生率（浮上卵中の正常発生卵数/産卵数×100）を求めた。実験期間中のこれらの値と水温から産卵適水温を明らかにした。実験は約3ヵ月間実施した。



図(3)-1 シロギスの産卵適水温の調査に用いた実験水槽と集卵水槽。実験水槽には、FRP製の円形水槽（容量5t、直径約2.5m×高さ約2.5m）を用いた。集卵水槽には、FRP製の角形水槽（容量約200L、底面積約4,000cm²×高さ約50cm）を用いた。

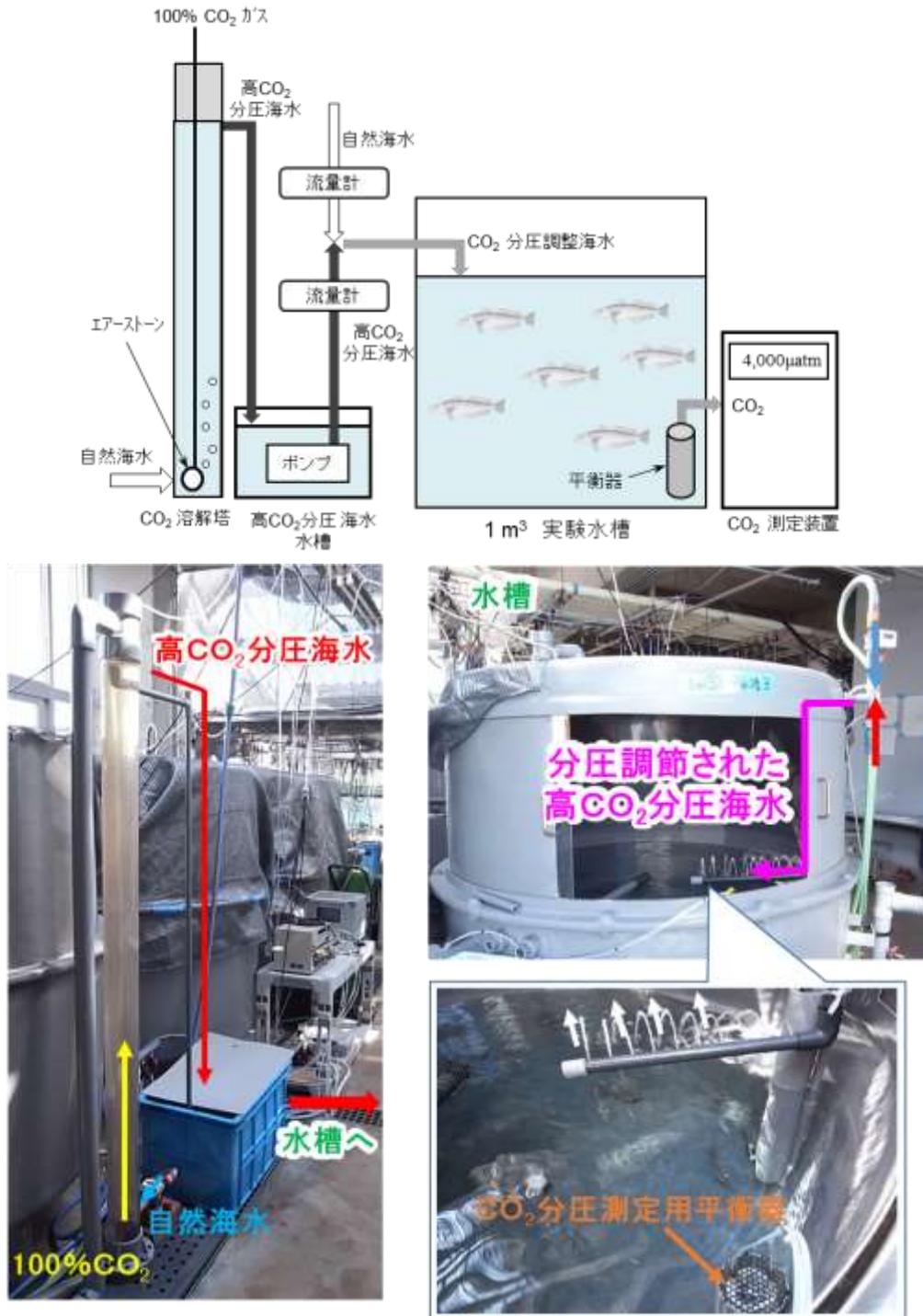


図(3)-2 卵の採取方法と希釈方法、浮上卵と沈下卵における正常発生卵と死卵。実験水槽と集卵水槽の写真（左側）。産出された卵は、実験海水を満たした集卵水槽内のネットに集められ、全ての卵を海水と共に回収し希釈した。

(2) シロギスの再生産に及ぼす高CO₂分圧の単純影響の調査

高CO₂分圧条件下におけるシロギスの産卵数、産出卵の正常発生率と正常孵化率、孵化仔魚の脊索長と耳胞の面積を調査した。

サブテーマ(1)と共同で、容量1tの屋内水槽において海水のCO₂分圧を安定的に制御する方法を新たに検討、開発した(図(3)-3)。この方法は、100%のCO₂ガスを自然海水へ吹き込んで調製した高CO₂分圧海水と自然海水を配管内で混合した後に、水槽内へシャワー状に注水するものである。両海水を合計した注水量は約8L/分(換水率約0.5回転/時間)とし、高CO₂分圧海水と自然海水の注水量比を変えることで、海水のCO₂分圧を調製した。海水のCO₂分圧は二酸化炭素測定装置(CO₂-09及びSDC-12、紀本電子)により、水槽内に設置した平衡器を介して導出したCO₂ガスを非分散型赤外線吸収法で連続的に測定した。



図(3)-3 新たに開発した大型水槽用のCO₂分圧の制御方法。上：CO₂分圧制御方法模式図、下：実際に制御した実験水槽の写真。実験に使用した自然海水には、予め調温を行ったろ過海水を使用した。CO₂溶解塔（容量約16L）に、自然海水を注水量約4.6L/分で供給すると同時に、マスフローコントローラ（FCST1005LC-4F2-F1L-CO₂、フジキン）を用いて100%CO₂ガスを毎分450mLで連続曝気し、高CO₂分圧海水を調製した。調整した高CO₂分圧海水は、高CO₂分圧海水水槽（ポリエチレン製角形水槽、容量約100L）に一時貯水した後、配管内で自然海水と混合してCO₂分圧調製海水を作製した。実験水槽内には、CO₂ガスを二酸化炭素測定装置に導出するための平衡器を設置した。

1) シロギス親魚の産卵実験

確立した容量1t水槽におけるCO₂分圧の制御方法を用いてシロギス親魚の産卵実験を行った。供試魚は、新潟県柏崎市地先にて釣獲後、海洋生物環境研究所実証試験場において1ヶ月以上予備飼育した天然魚を主に用いた。天然魚の他には、天然魚から種苗生産した1才魚を、1回目の産卵実験には全個体の半数、2回目の実験には各実験水槽に雌雄1個体、天然魚と混合して実験に用いた。予備飼育は、屋外大型水槽（容量5t）内に自然海水（ろ過海水、水温は自然水温）を注水量約42L/分でかけ流して行った（換水率約0.5回転/時間）。予備飼育期間中の光条件は、水槽内に60W白熱灯1基を設置し日長を15時間明期、9時間暗期の長日条件に調整した。また、給餌は、午前9時に冷凍アミ、午前4時にモイストペレットを、それぞれ魚体重の1%に相当する量を与えた。

実験に先立ち、各実験水槽には、供試魚を(1)と同様の方法で判別し、雌雄各3個体の合計6個体を収容した。実験前に飼育海水の水温を自然水温から26℃へ1日に約1℃の割合で上昇させた。全ての実験水槽で産卵を確認した後、高CO₂分圧区の実験水槽4基において、飼育海水のCO₂分圧を徐々に上昇させて設定CO₂分圧へ変更した。なお、設定CO₂分圧に達するまでの時間は、最大で75時間であった（4,000μatm区）。飼育海水のCO₂分圧は、自然海水のCO₂分圧（対照）と高CO₂分圧条件として850、1,400、2,400及び4,000μatmの5段階に設定した。これらの実験区は、アルカリ度2,258mmol/kgと塩分33.4、26℃の条件下において、供試魚の採集地のCO₂分圧を想定した対照区である550μatmと高CO₂分圧区である4,000μatmにおける全炭酸をコンピュータープログラムCO2SYS（Pierrot *et al.*, 2006）を用いて算出し、実験に用いる5つの実験区のCO₂分圧が、全炭酸換算値において等間隔になるように設定したものである（対照区：2,103mmol/kg、850μatm区：2,176mmol/kg、1,400μatm区：2,249mmol/kg、2,400μatm区：2,322mmol/kg、4,000μatm区：2,395mmol/kg）。実験期間中の光条件は、水槽内に40W白熱灯1基を設置し日長を15時間明期、9時間暗期の長日条件に調整した。また、給餌は、午前9時に冷凍アミ、午前4時にモイストペレットを、それぞれ魚体重の1%に相当する量を与えた。

1回の産卵実験の期間はCO₂分圧が設定分圧になった時から4週間とし、産卵実験は合計3回繰り返して実施し、それぞれ産卵実験①～③とする。実験中は毎日、実験水槽のそばに設置した集卵水槽（図(3)-4）において卵の有無を確認した。卵が認められた場合、集卵水槽から全卵を回収して5Lの海水中で均一に分散させた後、50mLサブサンプルを分取して計測を行い、産卵数、浮上卵率及び浮上卵の正常発生率を求めた（図(3)-2）。

各実験区のCO₂分圧は、6連CO₂分圧計測装置（SDC-12型、紀本電子工業製）を用いて、実験期間中1分間隔で記録した。また、各実験区の水温は10分間隔で測温抵抗体センサー（R900-32、チノー）を用いて、また塩分について誘導型塩分計（MODEL 601Mk1V、YEO-KAL）により補正した電磁誘導率検出器（ISC40GJ、横河電機）を用いて測定し、水温記録器（DX230、横河電機）によって記録した。さらに、対照区において、実験海水の全アルカリ度を全アルカリ度滴定装置（ATT-05、紀本電子）にて測定した。

2) シロギス卵の孵化実験

産卵実験②及び③において、卵の孵化実験を行った。供試材料は、各実験水槽で回収された産出後およそ14時間経過した受精卵とした。この受精卵10個を、各実験区の実験海水を満たした容量100mLのスクリー管瓶にパスツールピペットで移し替えた後、26℃の恒温水槽へ約24時間静置

した。静置後はスクリー管瓶内の供試材料について、正常孵化個体、奇形孵化個体、孵化後死亡個体、未孵化卵及び死卵を計数し、正常孵化率（正常孵化個体数/供試卵数×100）を求めた。孵化実験は、1つの実験区について5個のスクリー管瓶を用意し、それぞれの産卵実験で5回繰り返した。

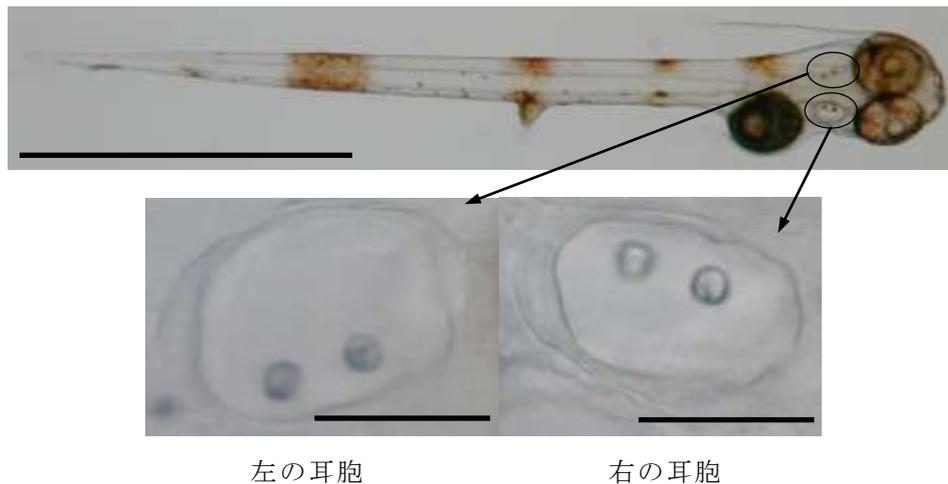
実験海水の水質測定のため、孵化率測定とは別のスクリー管瓶を用意し、卵収容直後の測定用に実験海水のみを、孵化率の計測終了後の測定用に実験海水と供試卵を収容した。水質測定用スクリー管瓶内の海水のpHをpHメーター（セブンゴープロSG8、メトラー・トレド）で、酸素飽和度（DO）をDOメーター（HQ30d、HACH）で、卵収容直後と孵化率の計測終了後に測定した。

3) シロギス仔魚の成長実験

シロギス卵の孵化実験で孵化した仔魚を用いて、仔魚の成長実験を行った。供試材料は、スクリー管瓶内で孵化した正常孵化個体とした。これらの個体は、孵化後約2日齢の仔魚であり、孵化が行われた実験海水を満たしたスクリー管瓶に観察時まで収容し、26℃の恒温水槽へ静置した。仔魚はMS222で麻酔を施した後に、体の右側が上向きになるようにパスツールピペットを使ってスライドグラスへ移し、実体顕微鏡（SMZ1500、Nikon）を用いて観察した。そして、仔魚全体と左右の耳胞像をデジタルカメラ（HC-2500、FUJIFILM）で撮影した（図(3)-5）。デジタル画像は、画像解析ソフトウェア（ImageJ 1.2、NIH）に取り込んで解析し、仔魚の脊索長と左右それぞれの耳胞の面積を計測した。成長実験は、1つの実験区について約20個体の仔魚の観察を行い、各実験区について5回繰り返した。



図(3)-4 実験水槽（FRP製円形水槽、容量1t）の脇に設置した集卵水槽（容量約50L、底面積約1,500cm²×高さ約40cm）。



図(3)-5 シロギス仔魚の全体像と耳胞像。上:右体側方向から観察した全体像(スケールは1mm)、下:左右の耳胞像(スケールは50 μ m)。

(3) シロギスの再生産に及ぼす高水温と高CO₂分圧の複合影響の調査

高水温と高CO₂分圧の複合条件下におけるシロギスの産卵数、産出卵の正常発生率と正常孵化率、孵化仔魚の脊索長と耳胞の面積を調査した。

1) シロギス親魚の産卵実験

前述の(2)と同様に、確立した容量1t水槽におけるCO₂分圧の制御方法を用いてシロギス親魚の産卵実験を行った。供試魚は、海洋生物環境研究所実証試験場において種苗生産した1才魚を用いた。供試魚の予備飼育は、屋外大型水槽(容量5t)内に自然海水(ろ過海水、水温は自然水温)を注水量約2.5t/時間でかけ流して行った(換水率約0.5回転/時間)。予備飼育期間中の光条件は、水槽内に60W白熱灯1基を設置し日長を15時間明期、9時間暗期の長日条件に調整した。また、給餌は、午前9時に冷凍アミ、午前4時にモイストペレットを、それぞれ魚体重の1%に相当する量を与えた。

実験に先立ち、流水式の屋内水槽(容量1t、注水量約8L/分、換水率約0.5回転/時間)6基にシロギス雌雄各3個体を収容し、水温を26℃(産卵適水温)で飼育した。全ての実験水槽で産卵を確認した後、高水温区の実験水槽3基において、飼育海水の水温を1日に約1℃の割合で徐々に上昇させて設定水温へ変更した。続いて、高CO₂分圧区の実験水槽4基において、CO₂分圧を徐々に上昇させて設定CO₂分圧へ変更した。実験条件は、水温が26℃と高水温条件として28℃の2段階、CO₂分圧が自然海水のCO₂分圧(対照)と高CO₂分圧条件として1,000 μ atm区及び2,200 μ atm区の3実験区とし、それらの条件を組み合わせた計6実験区を設定した。これらの実験区は、産卵実験①～③におけるアルカリ度、塩分及び水温の平均値を基に、CO₂分圧を全炭酸に換算して等間隔になるように設定した(26℃-対照区:1959mmol/kg、26℃-1,000 μ atm区:2,066mmol/kg、26℃-2,200 μ atm区:2,173mmol/kg、28℃-対照区:1959mmol/kg、28℃-1,000 μ atm区:2,066mmol/kg、28℃-2,200 μ atm区:2,173mmol/kg)。全炭酸値とCO₂分圧はコンピュータープログラムCO2SYS(Pierrot *et al.*, 2006)

を用いて算出した。各実験区には実験水槽1基を割り当てた（図(3)-6）。実験期間中の光条件は、水槽内に40W白熱灯1基を設置し日長を15時間明期、9時間暗期の長日条件に調整した。また、給餌は、午前9時に冷凍アミ、午前4時にモイストペレットを、それぞれ魚体重の1%に相当する量を与えた。

1回の産卵実験の期間はCO₂分圧が設定分圧になった時から4週間とし、産卵実験は合計4回繰り返して実施し、それぞれ産卵実験④～⑦とする。実験期間中、毎日、集卵水槽（図(3)-4）から全卵を回収してビーカーに入れ海水容量を5Lとし均一に分散させた後、50 mLを分取して全卵数を計数しその数値の100倍を総産卵数とした。また、併せて浮上正常卵、浮上死卵、沈下卵（全て死卵）の計測を行い、正常発生率（正常発生卵数/産卵数×100）を求めた（図(3)-2）。

各実験区のCO₂分圧は、6連CO₂分圧計測装置（SDC-12型、紀本電子工業製）を用いて、実験期間中1分間隔で記録した。また、各実験区の水温は10分間隔で測温抵抗体センサー（R900-32、チノー）を用いて測定し、水温記録器（DX230、横河電機）によって記録した。さらに、対照区において、実験海水の全アルカリ度を全アルカリ度滴定装置（ATT-05、紀本電子）で、塩分を誘導型塩分計（MODEL 601Mk1V、YEO-KAL）で、定期的に週2回測定した。



図(3)-6 実験装置の写真。左：1t水槽の脇に設置されたCO₂溶解塔、右：1t水槽。実験に使用した自然海水には、予め26℃と28℃に調温を行ったろ過海水を使用した。各々のCO₂溶解塔（容量約16L）に、各水温の自然海水を注水量約2.4L/分で供給すると同時に、マスフローコントローラ（FCST1005LC-4F2-F1L-CO₂、フジキン）を用いて100%CO₂ガスを毎分60~180mLで連続曝気し、高CO₂分圧海水を調製した。調整した高CO₂分圧海水は、各高CO₂分圧海水水槽（ポリエチレン製角形水槽、容量約100L）に一時貯水した後、配管内で自然海水と混合してCO₂分圧調製海水を作製した。実験水槽内には、CO₂ガスを二酸化炭素測定装置に導出するための平衡器を設置した。産出された卵は、実験海水を満たした集卵水槽内のネットに集めた。

2) シロギス卵の孵化実験

産卵実験④～⑦において、卵の孵化実験を行った。供試材料は、各実験水槽で回収された産出後およそ14時間経過した受精卵とした。この受精卵50個を、各実験区の実験海水を満たした容量100mLのスクリー管瓶にパスツールピペットで移し替えた後、採取した実験区と同じ水温の恒温水槽へ約24時間静置した。静置後はスクリー管瓶内の供試材料について、正常孵化個体、奇形孵化個体、孵化後死亡個体、未孵化卵及び死卵を計数し、正常孵化率（正常孵化個体数/供試卵数×100）を求めた。孵化実験は、1つの実験区について5個のスクリー管瓶を用意し、それぞれの産卵実験で5回繰り返した。

3) シロギス仔魚の成長実験

シロギス卵の孵化実験で孵化した仔魚を用いて、仔魚の成長実験を行った。供試材料は、スクリー管瓶内で孵化した正常孵化個体とした。これらの個体は、孵化後約2日齢の仔魚であり、孵化が行われた実験海水を満たしたスクリー管瓶に観察時まで収容し、採取した実験区と同じ水温の恒温水槽へ静置した。仔魚はMS222で麻酔を施した後に、体の右側が上向きになるようにパスツールピペットを使ってスライドグラスへ移し、実体顕微鏡（SMZ1500、Nikon）を用いて観察した。そして、仔魚全体と耳胞像をデジタルカメラ（HC-2500、FUJIFILM）で撮影した（図(3)-5）。デジタル画像は、画像解析ソフトウェア（ImageJ 1.44p、NIH）に取り込んで解析し、仔魚の脊索長と耳胞の面積を計測した。耳胞については左右の区別無く、側面から観察して大きく写った方の耳胞に焦点を合わせてデジタル画像を記録し面積を計測した。成長実験は、1つの実験区について約15個体の仔魚の観察を行い、各実験区について4回繰り返した。

（4）産卵時の水温とCO₂分圧によるシロギス卵のCO₂に対する耐性変化

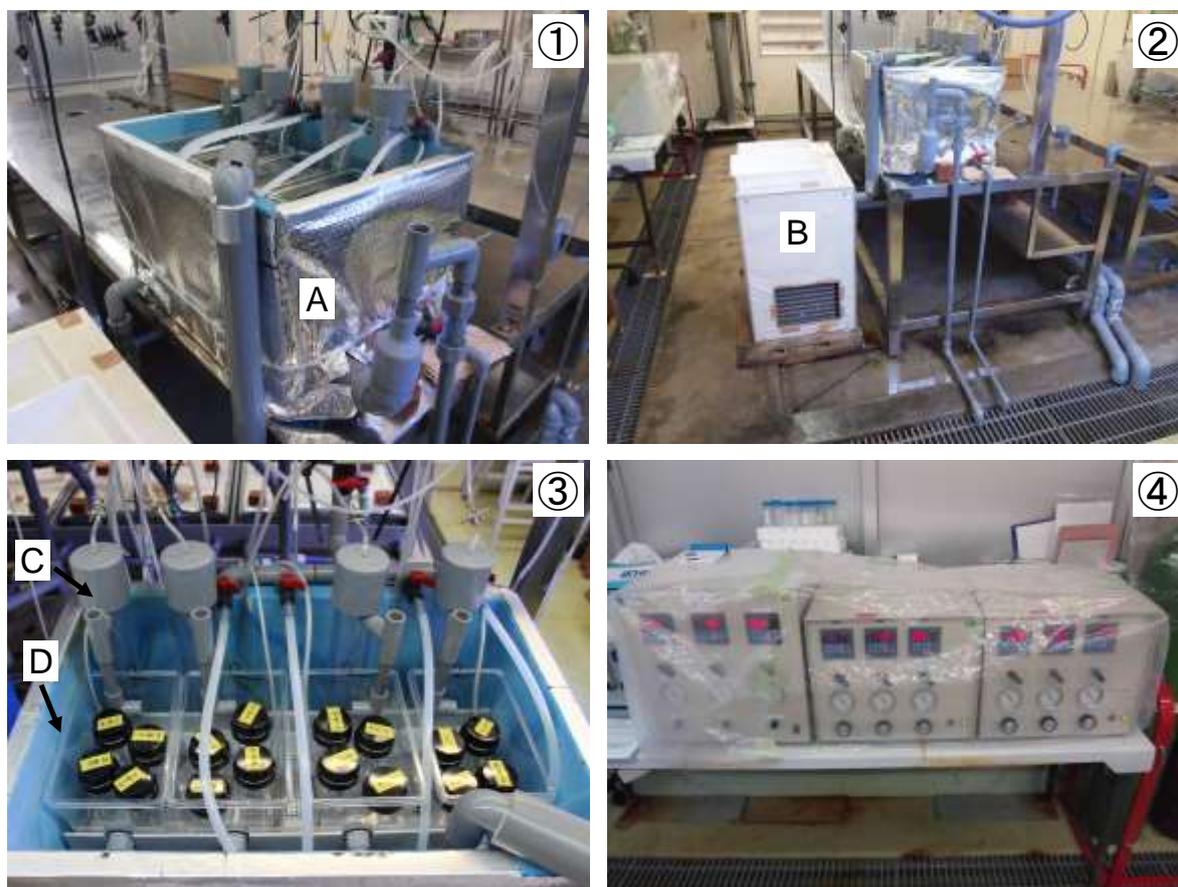
高水温と高CO₂分圧の条件下で産出し発生したシロギス卵におけるCO₂に対する耐性変化を調べた。

自然海水のCO₂分圧（対照）と2,200 μ atm区のCO₂分圧条件下にて生産された卵について、26℃と28℃の各水温別にCO₂に対する耐性実験を行い、異常発生24時間半数影響分圧（EP50）を求めた。耐性実験は、自然海水のCO₂分圧（対照区）と高CO₂分圧条件として30,000、50,000及び100,000 μ atm区の計4条件で行った。

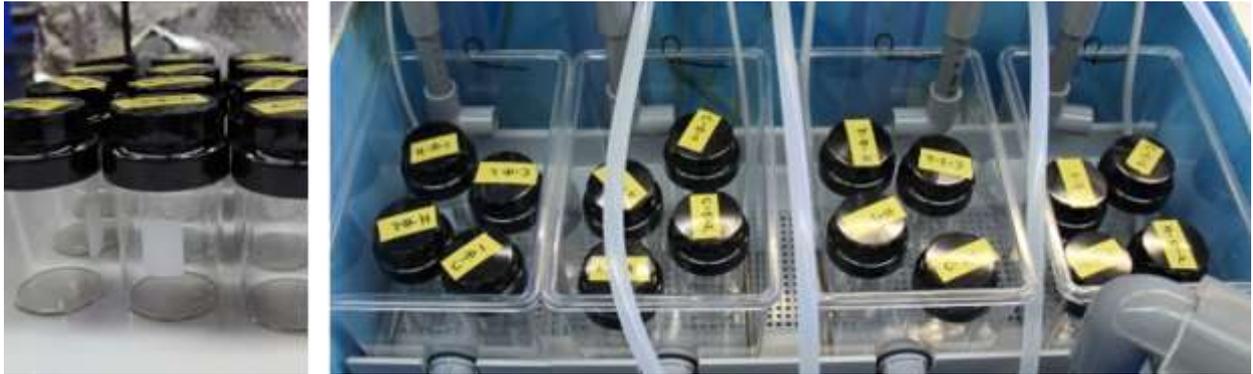
実験には図(3)-7に示した装置を使用した。この装置は、CO₂溶解筒（容量1L、ポリ塩化ビニル製）、内側恒温水槽（容量4L、ポリプロピレン製）、加温冷却ユニット（WTCA-401H-10、アース）が接続した外側恒温水槽（容量100L、ポリエチレン製）及びガス混合装置（GB-3CS、コフロック）から構成される。実験に使用する自然海水（ろ過海水）は、CO₂溶解筒を通過した後に内側恒温水槽に供給される仕組みになっている。CO₂溶解筒には、ガス混合装置を用いてCO₂（各試験区所定の%）、O₂（21%）及びN₂（不活性ガスとして残余%）からなる混合ガス（対照区は空気）を毎分300mLで連続通気し、CO₂分圧を調製した実験海水を作製した。実験前夜に対照区と2,200 μ atm区の各条件下にて産出されたシロギス卵を、翌朝11時に、実験海水と共に各10個を110mLスクリー管瓶（実験海水量100mL、各2本/条件）に入れ、各水温に設定した恒温槽内にて1日ばく露した（図(3)-8）。ばく露後、回収した供試個体を実体顕微鏡（SMZ1500、Nikon）にて観察し、正常発生個体と異常発生個体（死卵や奇形、死亡孵化個体）を計数した（図(3)-9）。計数した値から異常発生個体率

を算出し、プロビット法によりEP50を求めた。EP50を求めるためのCO₂分圧には、実験前後に計測したpH値をアルカリ度と塩分からCO₂分圧値に換算した後に幾何平均した値を用いた。実験は3回繰り返して実施した。

各実験において、実験海水の水温及びpHをばく露前後に測定した。水温はデジタル水温計（SK-1250MCIII α、佐藤計量器製作所）を、pHはpHメーター（セブンゴープロSG8、メトラー・トレド）をそれぞれ用いて測定した。また、ばく露後の実験海水の酸素飽和度をDOメーター（HQ30d、HACH）にて測定した。さらに、予め実験に使用する自然海水の全アルカリ度を全アルカリ度滴定装置（ATT-05、紀本電子）で、塩分を誘導型塩分計（DIGI-AUTO MODEL. 5、鶴見精機）で測定した。



図(3)-7 実験装置の写真。①外側恒温水槽（A）、②全体像（Bは加温冷却ユニット）、③外側恒温水槽内部（CはCO₂溶解筒（4本）、Dは内側恒温水槽（4基））、④ガス混合装置（3基）。



図(3)-8 シロギス卵の耐性実験の様子。左：実験に用いたパッキン付き110mLスクリー管瓶、右：内側恒温水槽内に配置したシロギス卵及び実験海水入りのガラス瓶の様子。



図(3)-9 シロギス卵CO₂耐性実験後に観察されたシロギスの正常発生個体と異常発生個体。左：正常孵化仔魚、中：死卵、右：奇形孵化仔魚。

(5) 大型水槽（10t）におけるCO₂分圧を制御方法の有効性の検証

サブテーマ(1)において開発した大型水槽（容量10t）におけるCO₂分圧を制御方法の有効性を、マダイを用いた産卵実験により検討した。

供試魚は、新潟県柏崎市地先にて漁獲後、海洋生物環境研究所実証試験場において5年以上飼育した天然魚の雄と、同試験場において種苗生産した3才魚の雌を混合して用いた。供試魚の予備飼育は、屋外大型水槽（容量5t又は容量10t）内に自然海水（ろ過海水、水温は自然水温）を、注水量約2.5t/時間（5t水槽）又は約5t/時間（10t水槽）でかけ流して行った（換水率約0.5回転/時間）。予備飼育期間及び実験期間中の光条件は、自然日長とした。また、給餌は、午前9時に冷凍アミ、午前4時にモイストペレットを、それぞれ魚体重の2%に相当する量を与えた。

実験に先立ち、流水式の屋外大型水槽（容量10t、注水量約80L/分、換水率約0.5回転/時間）3基にマダイ雌雄各3個体を収容した。実験条件は、CO₂分圧が自然海水のCO₂分圧（対照）と高CO₂分圧条件として1,000及び2,000 μ atmの3段階とし、その条件下で15日間にわたり飼育を試みた（図(3)-10）。実験期間中の水温は、自然水温とした。そして、産卵の有無を観察することで、この

実験環境においてマダいの再生産過程のうち産卵に関する高CO₂分圧実験が可能であるかを検証した。

各実験区のCO₂分圧は、二酸化炭素測定装置（CO₂-09、紀本電子）を用いて、実験期間中1分間隔で記録した。また、各実験区の水温は10分間隔で測温抵抗体センサー（R900-32、チノー）を用いて測定し、水温記録器（DX230、横河電機）によって記録した。



図(3)-10 実験装置の写真。左：実験水槽（容量10t）の脇に設置されたCO₂溶解塔、右：実験水槽（容量10t）。実験には、ろ過した自然海水を、予め調温して使用した。CO₂溶解塔（容量約50L）に、自然海水を注水量約13~17L/分で供給すると同時に、マスフローコントローラ（FCST1030LC-4F2-F5L-CO₂、フジキン）を用いて100%CO₂ガスを毎分1.5Lで連続曝気し、高CO₂分圧海水を調製した。調整した高CO₂分圧海水は、高CO₂分圧海水水槽（ポリエチレン製角形水槽、容量約100L）に一時貯水した後、配管内で自然海水と混合してCO₂分圧調製海水を作製した。実験水槽内には、CO₂ガスを二酸化炭素測定装置に導出するための平衡器を設置した。産出された卵は、実験海水を満たした集卵水槽内のネットに集めた。

4. 結果及び考察

(1) シロギスの産卵適水温の調査

実験期間中毎日測定した、実験に用いた自然海水の塩分は32.1~33.8、pHは8.0~8.2及びDOは77.9~103.2%であった。

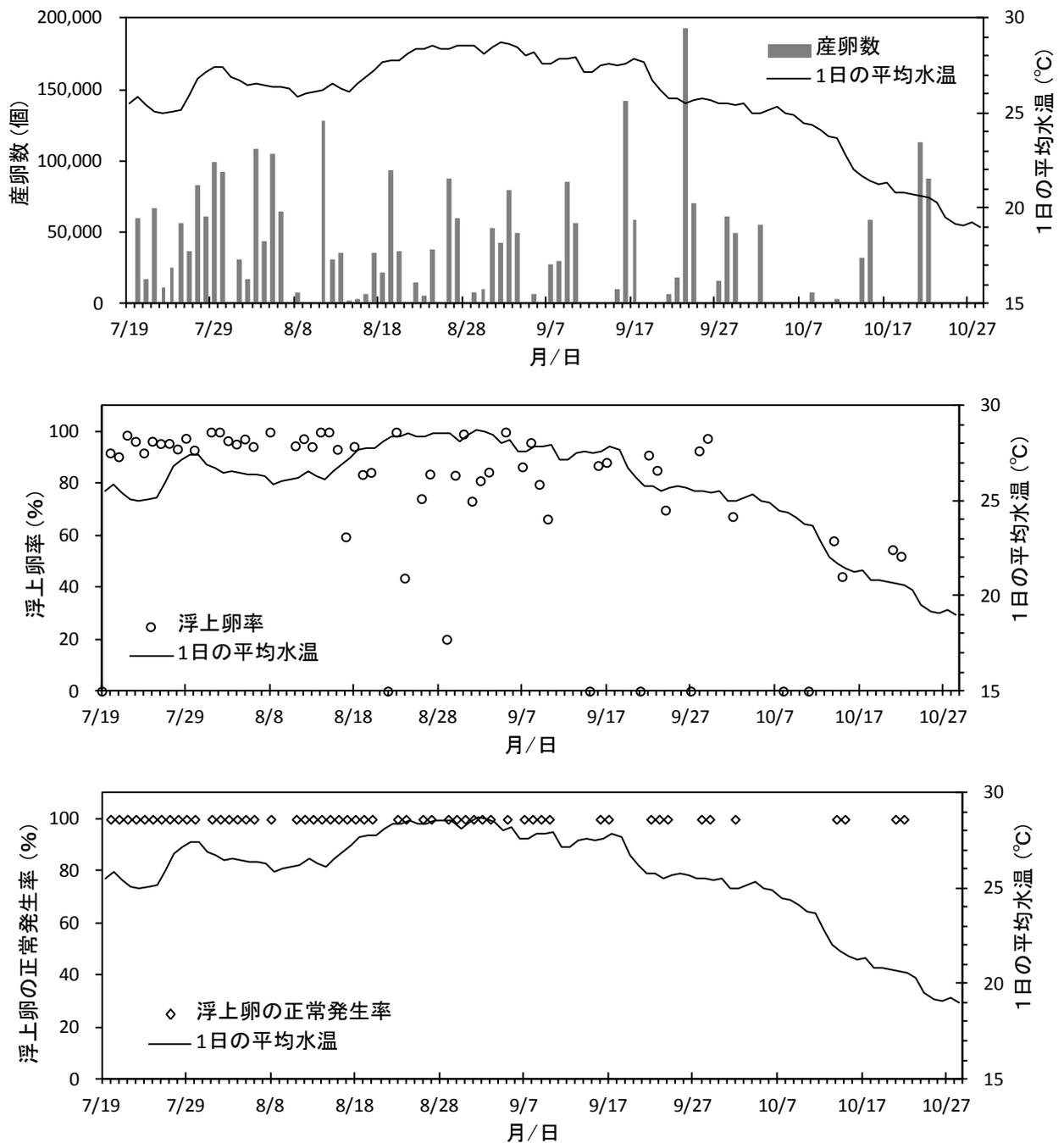
実験に用いたシロギスの実験開始時における大きさを表(3)-1に示した。実験開始時における平均体長は154.1±14.8mm（平均値±標準偏差、以下同様）、平均体重は41.8±11.8gであった。

シロギスの飼育水温は1日の平均水温で17.7～28.7℃の範囲にあり、このうち産卵は20.5～28.7℃で確認された。産卵が認められた日の水温の平均値は26.4℃であった。産卵は水温が25℃を下回るとその間隔が長くなりはじめ、また、浮上卵率も60%以下になる傾向が認められた。また、28℃より高くなると浮上卵率が80%以下になる傾向が認められた。浮上卵の正常発生率は、ほとんどの卵で100%であった（図(3)-11）。

飼育水槽において、シロギスの産卵は21.6℃の6月中旬から25℃前後の10月上旬まで続き、特に26℃以上では毎日産卵することが知られている（熊井・中村，1977）。また、産卵適水温の上限は28～29℃付近にあり、それを超えると産卵数と孵化率が低下するようになる（Hotta *et al.*, 2001）。今回の実験及びこれらの既往知見から、シロギスの産卵に適する水温を26℃付近と推定した。

表(3)-1 3回の産卵実験におけるシロギスの大きさ。

	全長 (mm)			体長 (mm)			体重 (g)		
	Mean	±	S. D.	Mean	±	S. D.	Mean	±	S. D.
産卵実験①	196.8	±	24.5	170.8	±	21.5	59.1	±	19.6
産卵実験②	172.5	±	17.6	149.7	±	15.6	38.5	±	11.3
産卵実験③	158.4	±	7.4	137.3	±	6.8	30.8	±	4.2



図(3)-11 自然水温条件下におけるシロギスの産卵状況と産出された卵の卵質。上：産卵数と水温の推移。中：浮上卵率と水温の推移、下：浮上卵の正常発生率と水温の推移。各日付の水温は10分毎に測定し、1日の平均水温として示した。

(2) シロギスの再生産に及ぼす高CO₂分圧の単純影響の調査

1) シロギス親魚の産卵実験

CO₂分圧を850、1,400、2,400及び4,000 μ atmに設定した各実験区の実測値は、目的のCO₂分圧に

おおむね維持されていた（表(3)-2）。3回の実験において各実験区の実測値が異なったのは、主に原水とした自然海水が480～600 μatm の間で変動したことによった。実験に用いた自然海水のアルカリ度は、2,200 $\mu\text{mol/kg}$ の付近で比較的安定しており、その値は塩分が低下すると小さくなる傾向が認められた（表(3)-3）。

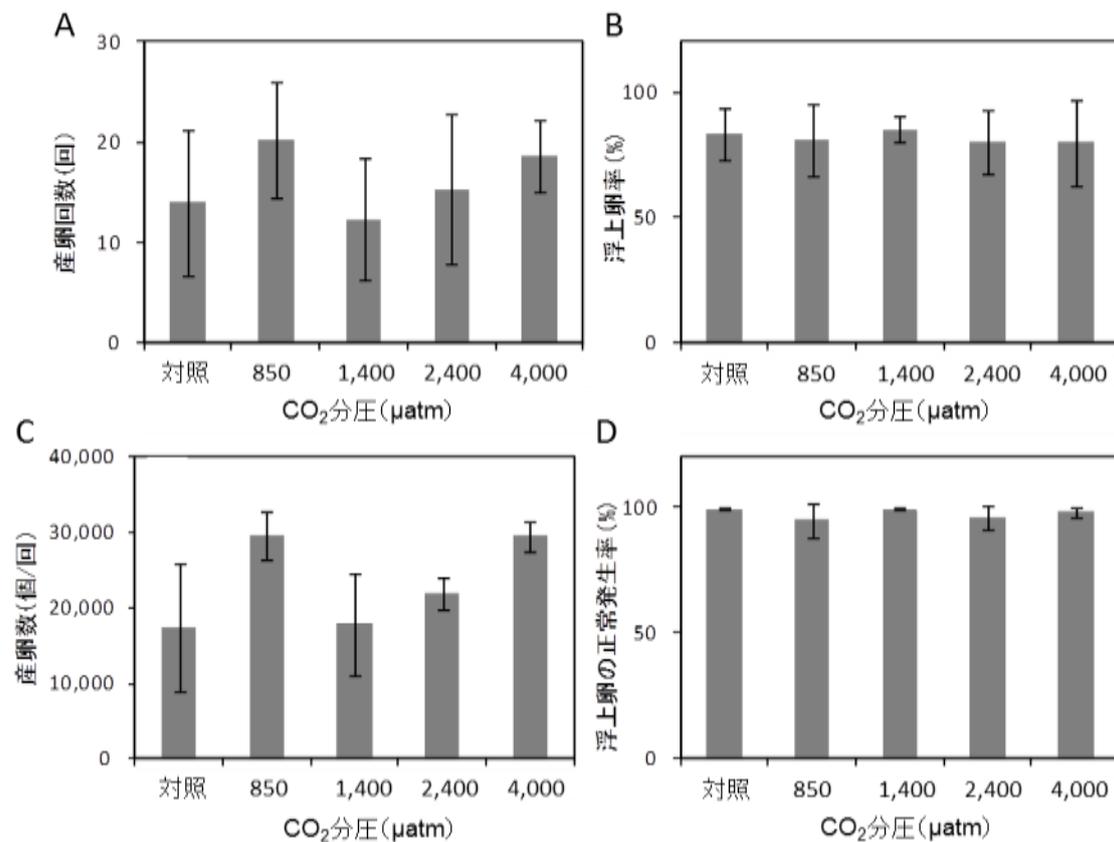
3回の産卵実験において、シロギスは対照区、850、1,400、2,400及び4,000 μatm のいずれの実験区でも産卵した。各実験区における卵の浮上卵率は60%以上であり、それらの正常発生率は90%以上と高かった。それぞれの実験区間の有意差を検定したところ産卵回数、産卵数、浮上卵率及び浮上卵の正常発生率のいずれについても有意差は確認されなかった（ANOVA、 $p>0.05$ 、図(3)-12）。

表(3)-2 シロギスを用いた3回の産卵実験における各実験区の CO_2 分圧。

設定分圧	CO_2 分圧 (μatm)														
	対照			850			1,400			2,400			4,000		
	Mean	\pm	S. D.	Mean	\pm	S. D.	Mean	\pm	S. D.	Mean	\pm	S. D.	Mean	\pm	S. D.
産卵実験①	598	\pm	59	922	\pm	109	1,488	\pm	176	2,512	\pm	332	4,114	\pm	466
産卵実験②	495	\pm	23	810	\pm	42	1,427	\pm	58	2,402	\pm	193	4,032	\pm	198
産卵実験③	479	\pm	27	838	\pm	28	1,399	\pm	82	2,435	\pm	151	4,181	\pm	337
(産卵実験①～③の平均と標準偏差)	(524 \pm 65)			(857 \pm 58)			(1,438 \pm 45)			(2,450 \pm 56)			(4,109 \pm 75)		

表(3)-3 シロギスを用いた3回の産卵実験における対照区的全アルカリ度と塩分。

	全アルカリ度 ($\mu\text{mol/kg}$)			塩分 (psu)		
	Mean	\pm	S. D.	Mean	\pm	S. D.
産卵実験①	2,184	\pm	42.5	33.255	\pm	0.780
産卵実験②	2,182	\pm	12.8	32.906	\pm	0.245
産卵実験③	2,150	\pm	6.9	32.256	\pm	0.106



図(3)-12 高CO₂分圧下に28日間おかれたシロギスの産卵回数。A：産卵回数 B：産出された卵の浮上卵率 C：1回当たりの産卵回数 D：浮上卵の正常発生率。棒グラフは3回の産卵実験の平均値、誤差棒はその標準偏差を示す。

2) シロギス卵の孵化実験

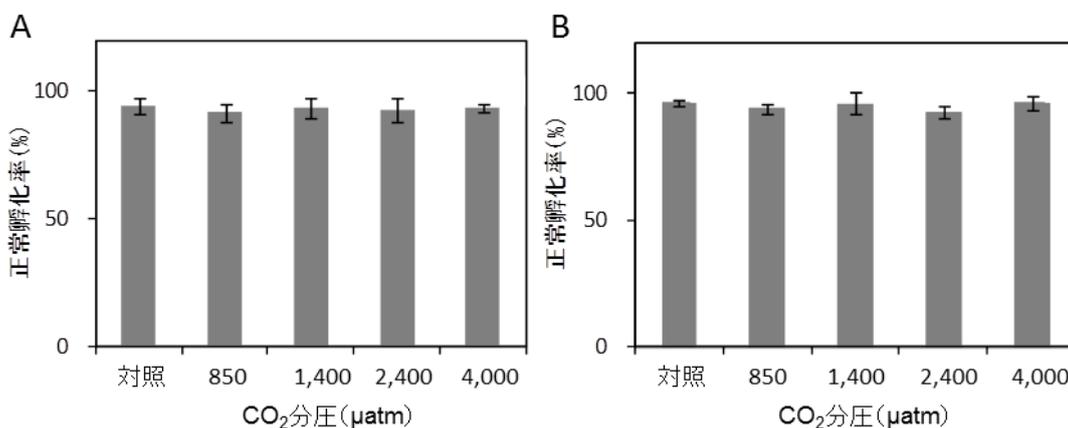
受精卵を収容した海水のpHは卵収容から24時間後まで、ほぼ一定に維持されていた(表(3)-4)。これらpHの実測値はCO₂分圧(表(3)-2)、全アルカリ度と塩分(表(3)-3)及び水温(26℃)から導かれる理論値とほぼ一致した。収容海水の酸素飽和度は、いずれの実験区でも卵収容時の102%から24時間後の98%まで同様に低下した。

卵の孵化実験において、シロギス受精卵は、いずれの実験区でも孵化し、それらの正常孵化率は92%以上であった(図(3)-13)。各実験区の正常孵化率について各実験区間で有意な変化は検出されなかった(ANOVA、 $p > 0.05$)。

表(3)-4 シロギス受精卵を収容した海水のpH。

実験区	対照		850 μ atm		1,400 μ atm		2,400 μ atm		4,000 μ atm	
	Mean	± S. D.	Mean	± S. D.	Mean	± S. D.	Mean	± S. D.	Mean	± S. D.
産卵実験②	開始時 ^{*1}	8.088 ± 0.032	7.901 ± 0.019	7.671 ± 0.006	7.456 ± 0.031	7.244 ± 0.035				
	終了時 ^{*2}	8.089 ± 0.020	7.882 ± 0.027	7.661 ± 0.009	7.448 ± 0.038	7.251 ± 0.031				
	計算値 ^{*3}	8.09	7.91	7.69	7.48	7.26				
産卵実験③	開始時 ^{*1}	8.085 ± 0.002	7.890 ± 0.004	7.672 ± 0.037	7.481 ± 0.017	7.275 ± 0.021				
	終了時 ^{*2}	8.064 ± 0.012	7.878 ± 0.013	7.667 ± 0.032	7.494 ± 0.014	7.285 ± 0.029				
	計算値 ^{*3}	8.10	7.89	7.68	7.46	7.24				

*1: スクリュー管瓶に受精卵を収容した直後のpH、*2: 収容後約24時間経過時のpH、*3: CO₂分圧(表(3)-2)、全アルカリ度と塩分(表(3)-3)及び水温(26℃)から、計算ソフトウェアCO2SYSを用いて算出したpH。各産卵実験における各実験区において、開始時と終了時のpHには有意差が確認されなかった(ANOVA、 $p > 0.05$)。pHはNBSスケールで示す。



図(3)-13 各産卵実験で得られたシロギス受精卵の高CO₂分圧下における正常孵化率。A: 産卵実験②における正常孵化率の結果 B: 産卵実験③における正常孵化率の結果。棒グラフは5回の繰り返しの平均値、誤差棒はその標準偏差を示す。

3) シロギス仔魚の成長実験

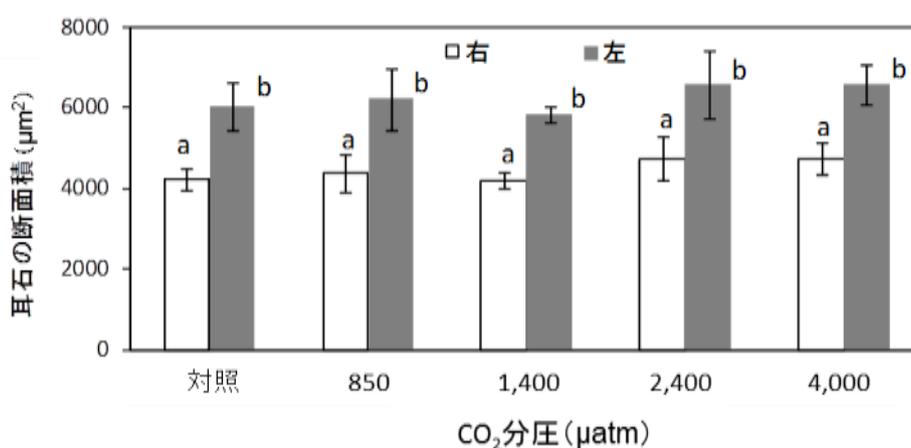
仔魚の成長実験において、各実験区のシロギス仔魚の脊索長は2.84±0.057mm(対照区)、2.87±0.074mm(850 μ atm区)、2.80±0.089mm(1,400 μ atm区)、2.84±0.125mm(2,400 μ atm区)及び2.80±0.099mm(4,000 μ atm区)であり、各実験区間の脊索長に有意な変化は認められなかった(ANOVA、 $p > 0.05$)。各実験条件下で産出された後に発育したシロギス孵化仔魚の耳胞面積は、左右いずれも各実験区間において有意な差は検出されなかった(ANOVA、 $p > 0.05$ 、図(3)-14)。

上述の産卵適水温の調査結果より、シロギスの産卵が安定する条件として、水温を26℃、日長を15時間明期に設定した。この条件でCO₂分圧を850、1,400、2,400及び4,000 μ atmまで高めた海水にシロギスをばく露すると、いずれの分圧でも対照区と同等に産卵した。また、各分圧で産出さ

れた受精卵は対照区と同等に正常孵化し、それら孵化仔魚の耳胞の面積は対照区と比較して有意な変化は認められなかった。

これまでの研究報告では、現在の通常のCO₂分圧のもとで産まれた受精卵や孵化仔魚を、直ちに高CO₂分圧に移す方法を用いて海水魚の初期生活段階に対する高CO₂分圧の影響を調査している。それによると、卵期におけるCO₂耐性は高くシロギス卵、マダイ卵、ヒラメ (*Paralichthys olivaceus*) 卵の致死濃度は10,000 μ atmを大きく超える (Kikkawa *et al.*, 2003; 2004)。一方、仔魚期ではCO₂感受性が高くなり、約1,000 μ atmでトウゴロウイワシ科の1種 *Menidia beryllina* 仔魚の生残や成長が低下 (Baumann *et al.*, 2012)、1,800 μ atm前後で大西洋マダラ (*Godus morhua*) 仔魚において各器官の発育に悪影響が認められている (Frommel *et al.*, 2012)。高CO₂海水で成長した仔魚の耳胞の面積は、スズメダイ科の1種 (*Acanthochromis polyacanthus*) では850 μ atmまで変化が認められず (Munday *et al.*, 2011a)、クマノミ類 (*Amphiprion percula*) においては1,078 μ atmで変化は無いが1,721 μ atmでは対照より大型化し (Munday *et al.*, 2011b)、ヨーロッパシーバス (*Atractoscion nobilis*) では993、2,558 μ atmにおいて濃度の上昇とともに大型化している (Checkley *et al.*, 2009)。

卵に対する海洋酸性化の影響は、海洋へ産み出された段階で突然生じるわけではなく、親魚の体内における卵成熟過程から継続することが予想され、卵への影響実験は産卵前にある親魚の段階から検討する必要がある。しかしながら、海水魚については、その多くの種類で決まった時季にしか産卵しないことや、繁殖行動を可能とする大型水槽が必要なことなどの制約から、産卵を制御する技術がほとんど確立されておらず、親世代から子世代を一貫して扱った実験がほとんど成立していない。今回、水産資源を担う多数の海水魚と同様に分離浮性卵を大量に生産するシロギスについて、親子の世代間で海洋酸性化影響実験が成立し成果が得られたことは、この技術を他魚種へ展開させることはもとより、海水魚に対する酸性化影響を予測評価する上で極めて意義深い。



図(3)-14 各実験条件下において産出された後に発育したシロギス仔魚の耳胞の面積。棒グラフ (白抜き：右側の耳胞、グレー：左側の耳胞) は5回の繰り返しの平均値、誤差棒はその標準偏差を示す。

(3) シロギスの再生産に及ぼす高水温と高CO₂分圧の複合影響の調査

1) シロギス親魚の産卵実験

各実験区におけるCO₂分圧の実測値を表(3)-5に示す。4回の産卵実験におけるCO₂分圧の平均値は26°C-対照区では584±70 μatm、26°C-1,000 μatm区では1,071±63 μatm、26°C-2,200 μatm区では2,294±126 μatm、28°C-対照区では627±68 μatm、28°C-1,000 μatm区では1,157±59 μatm、28°C-2,200 μatm区では2,431±105 μatmとなった。表(3)-6に実験期間中の水温を示す。4回の産卵実験における水温の平均値は26°C区の3条件は25.7~26.1°C、28°C区の3条件は27.8~28.0°Cの範囲にあった。実験期間中の全アルカリ度と塩分を表(3)-7にまとめた。また、実験に用いたシロギス親魚の全長、体長及び体重を実験終了後に計測値を表(3)-8に示す。シロギス親魚の平均体長は169.6±8.3mm(平均値±標準偏差、以下同様)、平均体重は68.1±10.7gであった。

シロギスは6実験区の全ての水温及びCO₂分圧条件下において産卵した。また、産卵1回あたりの産卵数は6実験区全てにおいて有意な変化は認められなかった(2-way ANOVA、 $p>0.05$ 、図(3)-15A)。正常発生率は28°C-2,200 μatm区において26°C-対照区に比べ13%、26°C-2,200 μatm区に比べ12%有意に低下した(2-way ANOVA *post hoc* Bonferroni、 $p<0.05$ 、図(3)-15B)。なお、供試魚の性別を実験終了時に開腹して確認したところ、2回目の実験の28°C-対照区において雄1個体、4回目の実験の26°C-1,000 μatm区において雌1個体が未成熟であったためこれらの条件から得られた産卵数及び正常孵化率は平均値に含めなかった。また、4回目の実験の28°C-対照区についても、個体間の相性が悪かったことに起因した雄の繁殖への不参加によって産卵日数と受精率の低下が生じたため、この条件の産卵数及び正常孵化率の値は平均値に含めなかった。

表(3)-5 シロギスを用いた産卵実験④~⑦における各実験区のCO₂分圧。

実験区	CO ₂ 分圧 (μatm)											
	26°C, 対照		26°C, 1,000μatm		26°C, 2,200μatm		28°C, 対照		28°C, 1,000μatm		28°C, 2,200μatm	
	Mean	± S. D.	Mean	± S. D.	Mean	± S. D.	Mean	± S. D.	Mean	± S. D.	Mean	± S. D.
産卵実験④	501	± 34	1,021	± 46	2,205	± 143	553	± 24	1,130	± 97	2,467	± 286
産卵実験⑤	608	± 41	1,161	± 145	2,479	± 329	631	± 35	1,225	± 115	2,542	± 272
産卵実験⑥	561	± 32	1,036	± 87	2,229	± 294	606	± 32	1,091	± 66	2,292	± 164
産卵実験⑦	666	± 45	1,064	± 69	2,263	± 187	716	± 58	1,182	± 65	2,423	± 205
(産卵実験④~⑦の平均と標準偏差)	(584	± 70)	(1,071	± 63)	(2,294	± 126)	(627	± 68)	(1,157	± 59)	(2,431	± 105)

表(3)-6 シロギスを用いた産卵実験④~⑦における各実験区の水温。

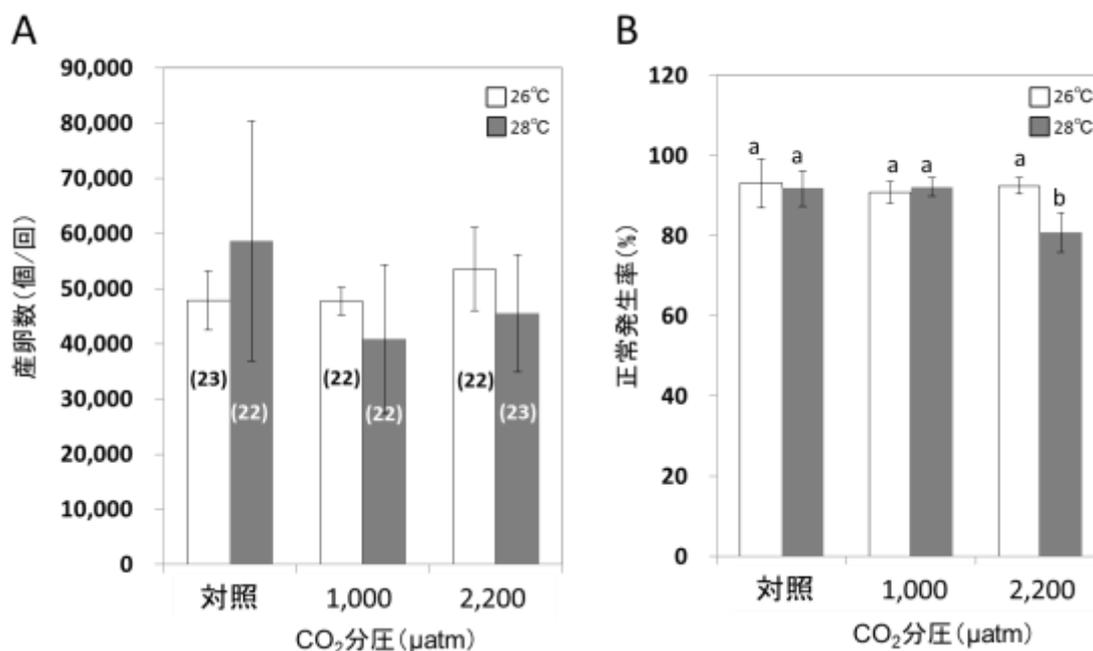
実験区	水温 (°C)											
	26°C, 対照		26°C, 1,000μatm		26°C, 2,200μatm		28°C, 対照		28°C, 1,000μatm		28°C, 2,200μatm	
	Mean	± S. D.	Mean	± S. D.	Mean	± S. D.	Mean	± S. D.	Mean	± S. D.	Mean	± S. D.
産卵試験④	26.1	± 0.2	26.0	± 0.2	25.9	± 0.2	27.9	± 0.2	28.0	± 0.2	27.8	± 0.2
産卵試験⑤	25.8	± 0.2	26.0	± 0.1	25.7	± 0.1	28.1	± 0.1	27.8	± 0.1	27.8	± 0.1
産卵試験⑥	25.9	± 0.1	26.0	± 0.1	25.7	± 0.1	28.0	± 0.1	27.9	± 0.1	28.0	± 0.2
産卵試験⑦	26.0	± 0.2	26.0	± 0.2	25.9	± 0.2	27.9	± 0.2	28.1	± 0.1	27.9	± 0.2

表(3)-7 シロギスを用いた産卵実験④～⑦における各実験区の全アルカリ度と塩分。

	全アルカリ度 ($\mu\text{mol/kg}$)			塩分 (psu)		
	Mean	\pm	S. D.	Mean	\pm	S. D.
産卵実験④	2,152	\pm	20.6	32.205	\pm	0.088
産卵実験⑤	2,151	\pm	25.4	31.999	\pm	0.452
産卵実験⑥	2,160	\pm	15.1	32.812	\pm	0.245
産卵実験⑦	2,116	\pm	15.3	31.769	\pm	0.304

表(3)-8 産卵実験④～⑦に用いたシロギス親魚の大きさ。

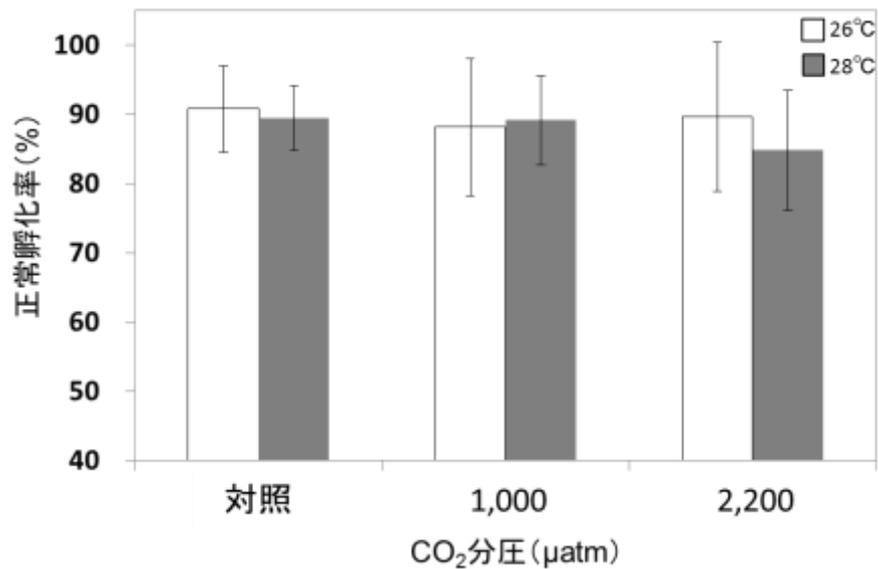
	全長 (mm)			体長 (mm)			体重 (g)		
	Mean	\pm	S. D.	Mean	\pm	S. D.	Mean	\pm	S. D.
産卵実験④	177.2	\pm	8.8	156.3	\pm	8.4	48.0	\pm	8.5
産卵実験⑤	183.4	\pm	8.5	160.5	\pm	8.5	51.0	\pm	8.4
産卵実験⑥	190.5	\pm	8.8	169.6	\pm	8.3	68.1	\pm	10.7
産卵実験⑦	195.5	\pm	8.7	182.1	\pm	11.5	70.8	\pm	12.4



図(3)-15 高水温及び高CO₂分圧の複合条件下においたシロギスの1日当りの産卵数と産出された卵の正常発生率。A: シロギスの1日当りの産卵数 B: 産出された卵の正常発生率。実験は28日間にわたり行った。棒グラフ(白: 26°C、グレー: 28°C)は4回(26°C-対照区、28°C-対照区、28°C-1,000 μatm 区については3回)の繰り返し実験の平均値、括弧内は28日間の実験期間中の産卵回数、誤差棒はその標準偏差を示す。異なるアルファベット間では有意差が認められた(2-way ANOVA *post hoc* Bonferroni, $p < 0.05$)。

2) シロギス卵の孵化実験

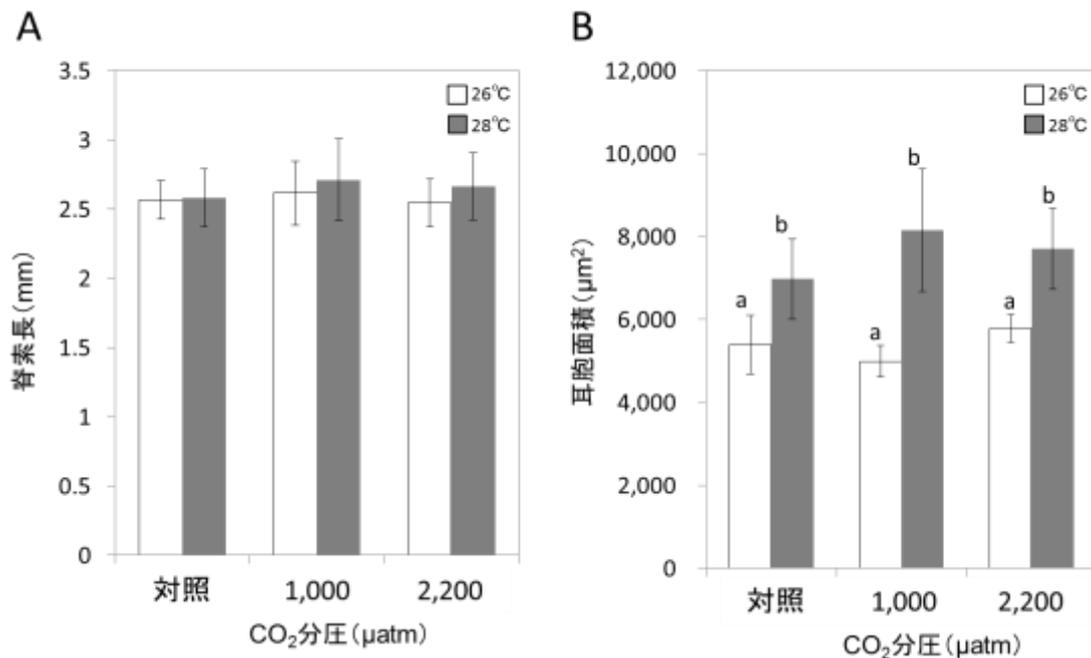
浮上卵の正常孵化率は6実験区全てにおいて有意な変化は認められなかった（2-way ANOVA、 $p>0.05$ 、図(3)-16）。



図(3)-16 各産卵実験で得られたシロギス浮上卵の高CO₂分圧下における浮上卵の正常孵化率。棒グラフ（白：26°C、グレー：28°C）は4回の繰り返し実験の平均値、誤差棒はその標準偏差を示す。

3) シロギス仔魚の成長実験

孵化仔魚の脊索長は6実験区全てにおいて有意な変化は認められなかった（2-way ANOVA、 $p>0.05$ 、図(3)-17A）また、孵化仔魚の耳胞の面積は、CO₂分圧に関わらず26°C区の値よりも28°C区の値が有意に大きくなった（2-way ANOVA、 $p>0.05$ 、図(3)-17B）。



図(3)-17 各実験区において産出された後に発育したシロギス1日齢仔魚の脊索長と耳胞面積。
 A：シロギス1日齢仔魚の脊索長 B：シロギス1日齢仔魚の耳胞面積。棒グラフ（白：26°C、グレー：28°C）は4回の繰り返し実験の平均値、誤差棒は標準偏差を示す。異なるアルファベット間では有意差が認められた（2-way ANOVA *post hoc* Bonferroni、 $p < 0.05$ ）。

4回の実験の結果、産卵好適水温（26°C）における高CO₂分圧条件下では同水温の対照区と比較して、産卵数、正常卵率、正常発生率、浮上卵の正常孵化率、孵化仔魚の脊索長及び耳胞の面積には有意な変化はみられず、好適水温下でのシロギスの再生産過程は海洋酸性化に対して強い耐性を持つことが示唆された。これは海洋酸性化の単純影響のみを調査した上述の実験結果と同様であり、実験結果の再現性が確認されたといえる。高水温（28°C）においては産卵数、孵化率、孵化仔魚の脊索長及び耳胞の面積について好適水温の場合と同様の傾向が認められ、高水温下においても酸性化に対して耐性を持つことが推察された。しかしながら、正常発生率は、28°C-2,200 μatm区において26°C-2,200 μatm区と比較すると有意な低下がみられた。これらの結果より、2,200 μatmという西暦2300年に到達すると予測されている海洋酸性化環境下では、シロギスの再生産において、さらに+2°Cの高水温の影響が加わるとシロギス卵の正常発生率が低下する複合影響が生じる可能性が示唆された。

また、高水温区の全てのCO₂分圧において好適水温区と比較して、孵化仔魚の耳胞の大型化が認められた。高CO₂分圧条件下で飼育された仔稚魚の耳石の大型化は数多く報告されており、例えばヨーロッパシーバス (*Atractoscion nobilis*) 仔魚、カクレクマノミ (*A. percula*) 稚魚、ゴウシュウマダイ (*Sparus aurata*) 稚魚の耳石が大型化することが報告されている (Checkley *et al.*, 2009, Munday *et al.*, 2011b, Reveillac *et al.*, 2015)。本実験では、両水温区ともに正常卵

を実験海水に1日間ばく露した。一般的に高水温条件下では卵は短時間で孵化するため、28℃区の方が孵化後の経過時間が長い。従って、26℃と28℃区における孵化後の経過時間の違いが28℃区における仔魚の耳胞の大型化の主な要因である可能性が考えられる。

以上より、シロギスの再生産過程において、高水温と高CO₂分圧の複合条件下では正常発生率への負の影響が生じること、及び水温上昇はシロギス仔魚の耳胞の大型化を引き起こすことが示唆された。

(4) 産卵時の水温とCO₂分圧によるシロギス卵のCO₂に対する耐性変化

実験終了時のDOはいずれの実験区においても98%以上であった。また、26℃区の実験における全アルカリ度は2,124±18.2 μmol/kg、塩分は32.116±0.667、28℃区の実験における全アルカリ度は2,252±132 μmol/kg、塩分は32.578±2.09であった。各実験区の実験開始時と実験終了時のpHを表(3)-9に、計算ソフトウェアCO2SYSを用いて算出したCO₂分圧を表(3)-10に示す。図(3)-18に、対照区と2,200 μatm区のCO₂分圧条件区にて生産された卵の正常孵化について、26℃と28℃の各水温別に調べた結果を示す。そして、正常孵化数と実験期間中のCO₂分圧の平均値より異常発生24時間半数影響分圧 (EP50) を前述の手法により算出した。いずれの条件においてもEP50は約50,000 μatmとなり、シロギス卵の耐性に有意な変化は認められなかった (2-way ANOVA, $p < 0.05$ 、図(3)-19)。クマノミの1種 (*A. melanopus*) においては親個体から次世代の仔魚への、産卵後から稚魚期までの期間を除く、連続した高CO₂分圧環境へのばく露が、1ヶ月齢の仔魚の成長や生残率におけるCO₂耐性を高める (Miller *et al.*, 2012) との報告がある。シロギスにおいても今後、より長期のばく露によるCO₂に対する耐性変化を調べる必要があると考えられる。

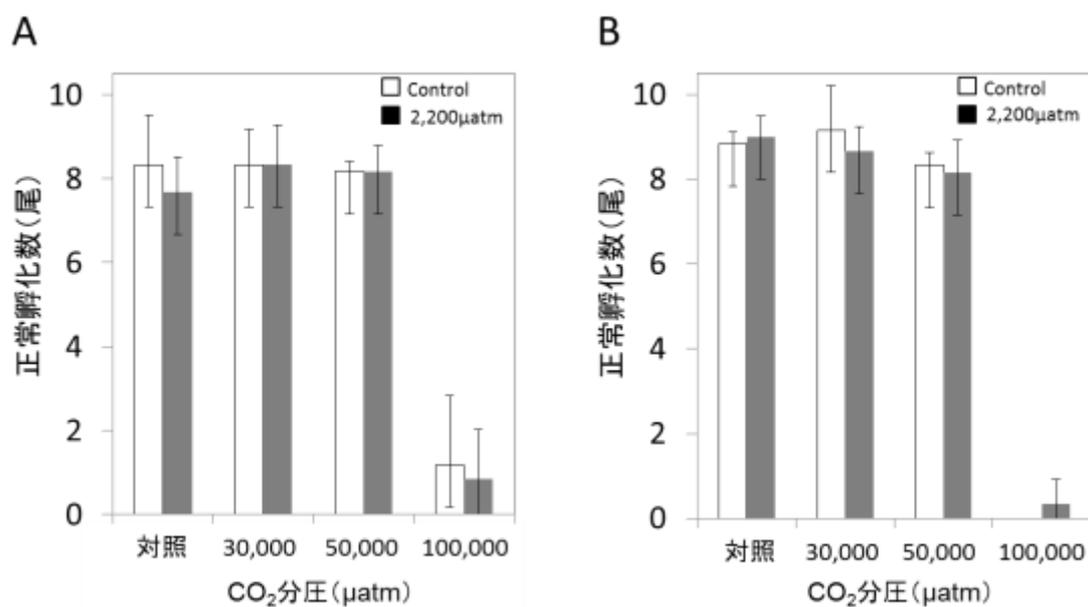
表(3)-9 産卵時の水温とCO₂分圧によるシロギス卵のCO₂に対する耐性変化査定実験における各実験区の実験開始時と実験終了時のpH。

	実験開始時pH		実験終了時pH	
	Mean	± S. D.	Mean	± S. D.
26℃, 対照区	8.2	± 0.05	8.1	± 0.04
26℃, 3%区	6.5	± 0.03	6.6	± 0.07
26℃, 5%区	6.2	± 0.03	6.4	± 0.06
26℃, 10%区	5.9	± 0.04	6.1	± 0.08
28℃, 対照区	8.2	± 0.04	8.2	± 0.05
28℃, 3%区	6.4	± 0.14	6.7	± 0.82
28℃, 5%区	6.3	± 0.12	6.5	± 0.02
28℃, 10%区	5.9	± 0.12	6.1	± 0.07

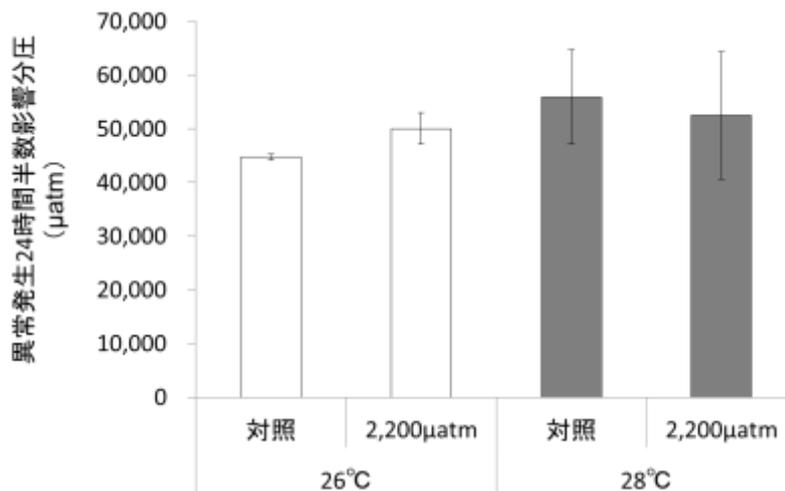
表(3)-10 産卵時の水温とCO₂分圧によるシロギス卵のCO₂に対する耐性変化査定実験における各実験区の全アルカリ度と塩分、pH及び水温から計算ソフトウェアCO2SYSを用いて算出した実験開始時と実験終了時のCO₂分圧及びその平均値。

	実験開始時CO ₂ 分圧		実験終了時CO ₂ 分圧		平均値	
	Mean	± S. D.	Mean	± S. D.	Mean	± S. D.
26°C, 対照区	376	± 56	498	± 61	437	± 85
26°C, 3%区	24583	± 2430	17424	± 3205	21003	± 4674
26°C, 5%区	42074	± 3657	27450	± 4202	34762	± 8750
26°C, 10%区	83560	± 8931	58683	± 10598	71122	± 16202
28°C, 対照区	397	± 10	442	± 35	420	± 34
28°C, 3%区	28865	± 1535	16056	± 2558	22461	± 7265
28°C, 5%区	45403	± 2269	27070	± 3134	36236	± 10335
28°C, 10%区	94585	± 4215	57220	± 8639	75903	± 21349

単位: μatm



図(3)-18 対照区と2,200 μatm 区のCO₂分圧条件下にて生産されたシロギス卵10個について、26°Cと28°Cの各水温別に対照区と高CO₂分圧条件30,000、50,000、100,000 μatm に24時間ばく露した際の正常孵化数。A: 26°Cの正常孵化数 B: 28°Cの正常孵化数。棒グラフ(白: 対照区産生卵、グレー: 2,200 μatm 区産生卵)は3回の繰り返し実験の平均値、誤差棒は標準偏差を示す。



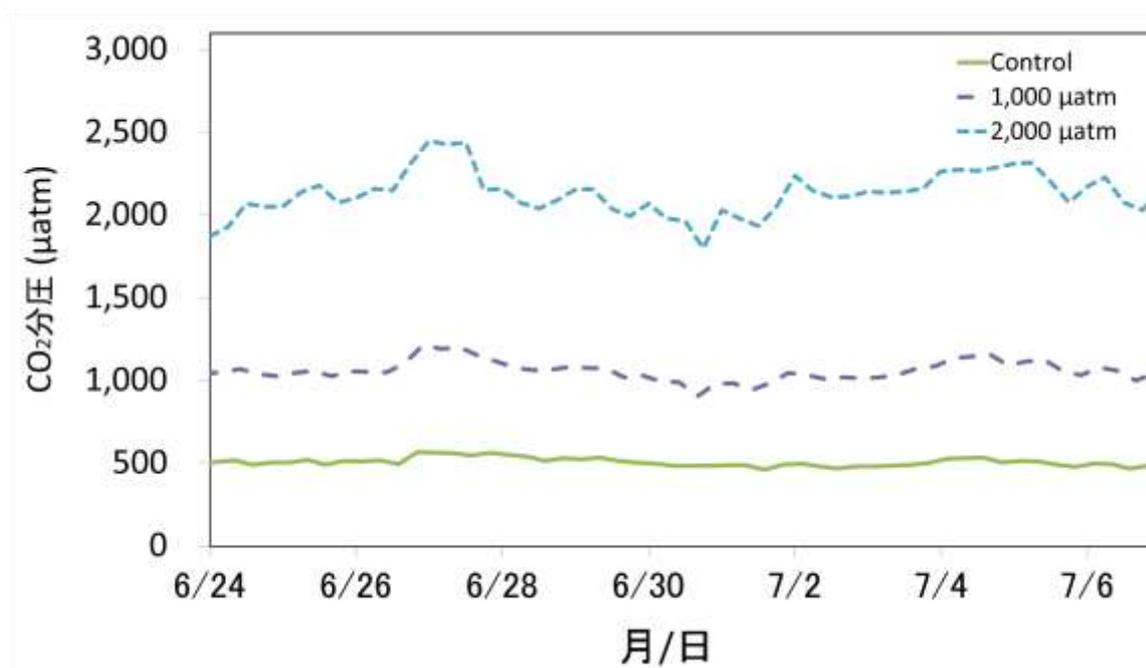
図(3)-19 各実験区（対照区及び2,200 μatm区）において産出されたシロギス受精卵の26°Cと28°C下における異常発生24時間半数影響分圧（μatm）。棒グラフは各実験区3回の繰り返し実験の平均値、誤差棒は標準偏差を示す。

（5）大型水槽（10t）におけるCO₂分圧を制御方法の有効性の検証

実験に用いたマダイの実験後の平均体長は35.6±6.1cm、平均全長は46.1±8.4cm、平均体重は1.46±0.67kgであった。

15日間にわたる実験水槽の制御の結果、実験海水のCO₂分圧はそれぞれ508±27.4（対照区、n = 54）、1,060±60.7 μatm（1,000 μatm区、n = 53）、2,140±129 μatm（n = 53）という高精度かつ安定的なCO₂分圧制御を行なうことができた（図(3)-20）。また、全ての実験区で産卵が観察され、マダイの再生産過程のうち産卵に関する高CO₂分圧実験が可能であることが実証された。

今後は、これらの結果を基に、マダイへの海洋酸性化影響の定量化実験を前述のシロギスの再生産への影響評価実験と同様に行なう必要がある。



図(3)-20 各実験区における実験海水のCO₂分圧の経時変化。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

本研究の結果、シロギスの再生産過程は海洋酸性化の単純影響に対しては耐性があるが、高水温との複合影響下では正常孵化率の低下に伴うシロギス個体数の低下が引き起こされる可能性が明らかとなった。水産有用魚種を用いて、魚類の再生産過程への高水温と海洋酸性化の複合影響評価を行った研究例はこれまでに無い。また、容量1t及び10tの大型水槽において流水式でCO₂分圧制御が可能となったことで、従来よりも多様な魚種についての影響評価が可能になったことは意義深い。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない。

<行政が活用することが見込まれる成果>

本研究から得られた多くの新しい知見は、今後の地球温暖化に伴う海洋酸性化の進行が魚類及び海洋生態系に及ぼす影響を予測する上で必要性が高いものであり、今後この結果を論文等で広く公表するとともに、IPCC第6次評価報告書のための議論においても、このような結果が反映されるよう努力したい。本研究に用いられた方法は飼育に大型水槽を必要とする魚種への海洋酸性化の影響評価に適したものであり、水産技術への応用が期待できる。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

7. 研究成果の発表状況 ※【別添】H26年度研究等成果報告書作成要領 参照

(1) 誌上発表

<論文(査読あり)>

特に記載すべき事項はない。

<査読付論文に準ずる成果発表>

特に記載すべき事項はない。

<その他誌上発表(査読なし)>

- 1) 「海洋酸性化と魚類の産卵」電気評論(平成26年10月号、52-53頁)

(2) 口頭発表(学会等)

- 1) 山本雄三、林 正裕、磯野良介、堀田公明、渡邊裕介、野尻幸宏：
日本海洋学会2014年度春季大会シンポジウム、東京(2014)
「海洋酸性化がシロギス再生産に与える影響」
- 2) 山本雄三、林 正裕、磯野良介、堀田公明、渡邊裕介、野尻幸宏：
平成26年度日本水産学会春季大会、北海道(2014)
「海洋酸性化がシロギス再生産に与える影響」
- 3) 林 正裕、山本雄三、諏訪僚太、吉川貴志、渡邊裕介、西田 梢、鈴木 淳、野尻幸広：
第9回バイオミネラルイノベーションワークショップ、千葉(2014)
「水産有用種への海洋酸性化影響」
- 4) Ryota Suwa, "Effects of ocean acidification on marine organisms",
2nd International JAMBIO Symposium, "Aquatic Ecosystems: Past, Present and Future", Japan,
2014.
- 5) 林 正裕：環境省環境研究総合推進費一般向け研究成果報告会「海洋酸性化がわが国周辺の
生物に与える影響を評価する」、東京(2015)
「魚類への海洋酸性化影響評価のこれまでと将来展開」
- 6) 山本雄三：環境省環境研究総合推進費一般向け研究成果報告会「海洋酸性化がわが国周辺の
生物に与える影響を評価する」、東京(2015)
「魚類の再生産への海洋酸性化影響評価実験」
- 7) 諏訪僚太：環境省環境研究総合推進費一般向け研究成果報告会「海洋酸性化がわが国周辺の
生物に与える影響を評価する」、東京(2015)
「海産無脊椎動物への海洋酸性化影響」
- 8) 林 正裕、岸田智穂、箕輪 康、渡邊裕介、西田 梢、鈴木 淳：平成27年度日本水産学会

春季大会、東京（2015）

「海洋酸性化の生物影響－1：ウバガイ稚貝の成長に与える影響」

- 9) 諏訪僚太、山本雄三、林 正裕、吉川貴志、箕輪 康、渡邊裕介、野尻幸宏：平成27年度日本水産学会春季大会、東京（2015）

「海洋酸性化の生物影響－2：シロギスの再生産に与える高水温との複合影響」

（3）出願特許

特に記載すべき事項はない。

（4）「国民との科学・技術対話」の実施

- 1) 海洋生物環境研究所実証試験場 研究所特別公開（2014年10月18日、参加者約330名）にて成果紹介（パネル展示）
- 2) 海洋生物環境研究所実証試験場 設立30周年記念 海の市民講座「柏崎の海と生きもの」（主催：海洋生物環境研究所実証試験場、2014年10月19日、柏崎市市民プラザ波のホール、観客約90名）にて成果紹介（パネル展示）
- 3) 研究成果報告会「海洋酸性化がわが国周辺の生物に与える影響を評価する」（主催：環境研究総合推進費2A-1203課題、2015年2月21日、TKP市ヶ谷カンファレンスセンター6Aルーム、観客約40名）にて講演

（5）マスコミ等への公表・報道等

- 1) 「海洋酸性化魚類への影響」日刊水産経済新聞（平成26年7月18日、6頁）

（6）その他

特に記載すべき事項はない。

8. 引用文献

- 1) Baumann, H., Talmage, S. C. and Gobler, C. J. (2012). Reduced early life growth and survival in a fish in direct response to increased carbon dioxide. *Nature climate change*, 2:38-41.
- 2) Checkley, D. M., Dickson, A. G., Takahashi, M., Radich, J. A., Eisenkolb, N. and Asch, R. (2009). Elevated CO₂ enhances otolith growth in young fish. *Science*, 324:1683.
- 3) Frommel, A. Y., Maneja, R., Lowe, D., Malzahn, A. M., Geffen, A. J., Folkvord, A., Piatkowski, U., Reusch, T. B. H. and Clemmesen, C. (2012). Severe tissue damage in Atlantic cod larvae under increasing ocean acidification. *Nature Climate Change*, 2:42-46.
- 4) Hotta, K., Tamura, M., Watanabe, T., Nakamura, Y., Adachi, S. and Yamauchi, K. (2001). Changes in spawning characteristics of Japanese whiting *Sillago japonica* under control of temperature. *Fish. Sci.*, 67: 1111-1118.
- 5) IPCC (2006). Special Technical Report, Carbon Capture and Storage. IPCC, Geneva.
- 6) Kikkawa, T., Ishimatsu, A. and Kita, J. (2003). Acute CO₂ tolerance during the early developmental stages of four marine teleosts. *Environmental Toxicology*, 18, 375-382.

- 7) Kikkawa, T., Kita, J. and Ishimatsu, A. (2004). Comparison of the lethal effect of CO₂ and acidification on red sea bream (*Pagrus major*). *Marine Pollution Bulletin*, 48:108-110.
- 8) 熊井英水・中村元水 (1977). キスの自然産卵について. *近大農紀要*, 10: 39-43.
- 9) 益田一・荒賀忠一・吉野哲夫 (1975). 魚類図鑑南日本の沿岸魚. 東海大学出版会, 379pp
- 10) Miller, G. M., Watson, S. A., Donelson, J. M., McCormick, M. I. and Munday, P. L. (2012). Parental environment mediates impacts of increased carbon dioxide on a coral reef fish. *Nature Clim. Change*, 2:858-861.
- 11) Munday, P. L., Gagliano, M., Donelson J. M., Dixon, D. L. and Thorrold, S. R. (2011a). Ocean acidification does not affect the early life history development of a tropical marine fish. *Marine Ecology Progress Series*, 423:211-221.
- 12) Munday, P. L., Hernaman, V., Dixon, D. L. and Thorrold, S. R. (2011b). Effect of ocean acidification on otolith development in larvae of a tropical marine fish. *Biogeosciences*, 8:1631-1641.
- 13) Pierrot, D., Lewis, E., Wallace, D.W.R. (2006). MS Excel Program Developed for CO₂ System Calculations. ORNL/CDIAC-105a. Carbon Dioxide Information Analysis Center, Oak Ridge National Laboratory, U.S. Department of Energy, Oak Ridge, Tennessee.
- 14) Réveillac, E., Lacoue-Labarthe, T., Oberhänsli, F., Teyslié, J.-L., Jeffree, R., Gattuso, J.-P. and Martin, S. (2015). Ocean acidification reshapes the otolith-body allometry of growth in juvenile sea bream. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 463:87-94.
- 15) 芹澤正和・飯塚宗雄・武田正倫・成瀬宇平編著 (2003). 日本の食材図鑑 生鮮食材篇. 小学館, 38pp
- 16) Wittmann, A. C. and Pörtner H. O. (2013) Sensitivities of extant animal taxa to ocean acidification. *Nature Clim. Change*, 3:995-1001.

(4) 植物プランクトンの増殖における水温と海洋酸性化の影響

一般財団法人電力中央研究所

環境科学研究所 大気・海洋環境領域 芳村 毅

平成24～26年度累計予算額：28,438千円

(うち、平成26年度予算額：9,419千円)

予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

水温とCO₂分圧 (pH) は植物プランクトンの増殖と密接に関連する環境因子であり、これらの変化は植物プランクトンの動態を変化させる可能性がある。海洋生態系の将来変化を予測するうえでは、生態系の基盤を支える植物プランクトンの増殖に対するこれらの因子の影響を評価する必要がある。ただし、培養実験による影響評価の研究は限られており、特に有機物生産に対する影響を評価した研究例は乏しい。そこで、本サブテーマでは、単離株を用いた室内実験と沿岸海水中の現場プランクトン群集を用いた現場実験により、植物プランクトンの増殖と有機物生産に対する水温とCO₂分圧増加の影響を調査した。珪藻および円石藻単離株の培養実験では、水温増加により増殖速度は直線的に増加し、有機物生産は直線的に減少した。また、有機物生産に占める溶存態画分の割合も水温増加に伴って減少することがわかった。一方、CO₂分圧増加の影響は水温増加と比較して小さかった。沿岸海水を用いた培養実験では、水温増加は植物プランクトン群集の増殖速度を促進する傾向があったが、生物量のピーク値を変化させることはなかった。一方、CO₂分圧増加の有意な影響は見られなかった。プランクトン群集による有機物生産は粒子態と溶存態画分で異なる応答を示すものの、影響は主に水温増加によりもたらされ、CO₂分圧増加の有意な影響はほとんど見られなかった。ただし、秋季の実験ではどの水温実験区においてもCO₂分圧増加が粒子態有機物の生産を増加させることから、時期によっては酸性化の影響を十分考慮する必要があることがわかった。以上の単離株と現場プランクトン群集を用いた複数の実験結果から、近未来の植物プランクトンの動態は主に水温増加の影響を受け、CO₂分圧増加の影響は比較的小さいことが示唆された。

[キーワード]

二酸化炭素、海洋酸性化、地球温暖化、植物プランクトン、有機炭素生産

1. はじめに

植物プランクトンは海洋の物質循環を支配する生物群であり、海洋生態系において重要な役割を果たしている。植物プランクトンが光合成により生産する有機物は食物網への餌 (エネルギー) 供給源となっている。また、有機物生産は炭素、窒素、リンなどの生元素の循環を駆動し、海洋へのCO₂吸収および物質循環の中心的な役割を果たしている。植物プランクトンは粒子態有機物 (POM) を生産し、その一部は細胞外排出や捕食過程により溶存態有機物 (DOM) に変換される。POMとDOMは食物網および物質循環において異なる役割を果たしており、海洋生態系を理解するうえでは両者の有機物の動態を定量的に把握する必要がある (Passow and Carlson, 2012)。植物プランクトンの有機物生産の変化

は海洋の生物生産だけでなく海洋炭素循環の変化をもたらす可能性があることから (Falkowski, 2012)、植物プランクトンが海洋環境の変化にどのように応答するかは地球環境の将来を予測するうえで不可欠な知見である。

植物プランクトンの生息する海洋表層の環境は大きく変化しつつある。人為活動に伴う大気CO₂濃度の増加は、地球温暖化をもたらし、海表面水温を増加させている。さらに、海水へのCO₂溶解量の増加に伴い、表層海水のCO₂分圧の増加とpHの低下が進行しており、海洋酸性化として認識されている。水温とCO₂分圧 (pH) は植物プランクトンの光合成、呼吸、石灰化などの生理過程と密接に関連する因子であり、これらの変化は植物プランクトンの動態を変化させる可能性がある。ただし、将来の水温とCO₂分圧の増加が植物プランクトンの有機物生産過程に与える影響に関する知見は限られているのが現状である。植物プランクトンの有機物生産の量的な変化あるいはPOMとDOMの生産割合の変化など質的变化は海洋生態系に変化をもたらし得ることから、気候フィードバック解明のカギとなる。現実海洋の将来的な応答を評価するためには、種レベル実験から現場プランクトン群集実験までが必要とされている。

海洋酸性化問題が強く認識されるようになった最近約10年に海洋酸性化の影響評価研究は飛躍的に増加した。研究対象の中心は海水のpHの低下に脆弱であると考えられているサンゴやウニ、貝類などの石灰化する底生動物である (諏訪ら、2010)。植物プランクトンに関しても、細胞の表面に炭酸カルシウムの鱗片である円石を有する円石藻類はpHの低下に脆弱であることが報告されて以降 (Riebesell et al., 2000)、円石藻を用いた影響評価実験が多く行われてきた (杉江・芳村、2011)。また、細胞サイズが比較的に大型である珪藻類は細胞が珪酸質の被殻に覆われた単細胞生物であり石灰化生物ではないが、海洋の基礎生産量の約40%を担っており (Sarhou et al., 2005)、海洋生態系で非常に重要な役割を果たしていることから、海洋酸性化影響評価の対象生物として用いられてきた (杉江・芳村、2011)。海洋酸性化は光合成の基質であるCO₂の濃度を増加させるため、植物プランクトンの増殖を促進する可能性がある一方 (Riebesell et al., 1993)、阻害するケースも報告されている (Gao et al., 2012)。また、珪藻や円石藻などの単離株を用いた室内実験だけでなく、現場海水のプランクトン群集をボトル内で培養するマイクロコスム実験や数千リットル程度の大型バッグ内で培養するメソコスム実験も実施されてきた (杉江・芳村、2011)。

世界中で実施されている海洋酸性化の影響評価実験によりデータは蓄積されつつあるが、近年はCO₂分圧増加およびpH低下だけへの応答ではなく、水温増加も合わせて考慮した複合影響を評価する必要性が認識されている (Boyd and Hutchins, 2012)。しかし、水温増加とCO₂分圧増加を組み合わせた培養実験による植物プランクトンの増殖への影響評価、特に有機物生産量の変化に着目した研究はいくつかの単離株実験 (Borchard and Engel, 2012) および現場海水実験 (Kim et al., 2011) に限られているのが現状である。将来の海洋生態系の変化を予測するためには、水温とCO₂分圧の複合影響に関するより多くの実験データを取得して、変化をもたらすメカニズムを解明する必要がある。

2. 研究開発目的

植物プランクトンの増殖速度と生産する有機物の量および質が水温とCO₂分圧が増加した環境下においてどのように変化するのかを培養実験により明らかにする。ここでは、珪藻と円石藻という石灰化をしない群とする群を対照して、これまでほとんど実験例のない水温増加とCO₂分圧増加の複合影響を、単離株による実験室レベル実験と沿岸海水 (現場プランクトン群集) による現場型培養実験の両

者から評価する。過去の研究 (Gao et al., 2012) では、植物プランクトンの増殖に対してCO₂分圧増加は光量が低い場合は促進効果を、光量が高い場合 (200 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ 以上) は阻害効果を示すことが報告されていることから、単離株実験では高光量と低光量において影響評価実験を行って結果を比較する。植物プランクトンが生産した有機物はPOMとDOMに分画し、両者の炭素量を測定する。これにより、粒子態有機炭素 (POC) および溶存態有機炭素 (DOC) を測定するとともに、粒子態と溶存態の生産比率を明らかにする。また、円石藻および現場プランクトン群集の実験では炭酸カルシウム殻の生産量の変化を明らかにするため粒子態無機炭素 (PIC) を測定する。得られた実験的事実に基づき、有機物生産量および炭酸カルシウム生産量が将来の環境下で量的および質的にどのように変化する可能性があるのかを予測・検討する。

3. 研究開発方法

(1) 単離株を用いた影響評価実験

1) 藻類種と保存株

海洋生態系における重要性が高い二大藻類グループである珪藻類と円石藻類を実験対象とした。珪藻類は細胞が珪酸質の被殻に覆われ、円石藻類は細胞の表面に炭酸カルシウムの鱗片である円石を有していることを特徴としている。沿岸から外洋に分布する種をモデル藻類として選定した (表(4)-1)。珪藻株はProvasoli-Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton (NCMA) から、円石藻株は萩野恭子氏 (現岡山大学) から分譲され、f/2培地 (Guillard, 1975) を用いて17 °Cおよび100 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ (14時間: 10時間の明暗周期) の光合成有効放射 (photosynthetically active radiation, PAR) の環境条件で継代培養しているものを実験に用いた。

表(4)-1 実験に使用した植物プランクトン種の情報。

藻類グループ	種	株	株採取時の水温	特徴
珪藻	<i>Thalassiosira oceanica</i>	CCMP1005	22.7 °C	外洋性種。
	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	CCMP1335	不明	沿岸性でブルームを形成しない種。
	<i>Thalassiosira weissflogii</i>	CCMP1336	不明	沿岸性でブルームを形成する種 (赤潮種)。
円石藻	<i>Gephyrocapsa oceanica</i>	MM4-6	17.0 °C	沿岸から外洋まで分布する種。日本沿岸において大発生が見られる場合がある。
	<i>Emiliana huxleyi</i>	MT0610A	17.7 °C	沿岸から外洋まで分布する種。

2) 水温および光量に関する増殖特性の把握

水温およびCO₂分圧の増加に対する応答を把握するための影響評価実験を行ううえでの培養条件を決定するため、7段階の水温 (4、8、12、16、20、24、28 °C) において6-7段階のPAR (約25-600 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ の範囲) 条件で比増殖速度の変化を測定した。実験は白色蛍光灯を光源とする植物インキュベータ内で行った。明暗周期は14 h : 10 hに設定した。培地は、あらかじめ実験室内の空気を5 mL/minの流量でバブリングすることにより、水温の違いにかかわらず一定のCO₂分圧の条件に調節した後、容量45 mLガラス試験管の30 mLのf/2培地に保存株を接種した。珪藻は培養期間中もバブリングを継続す

る一方、円石藻はバブリング自体により増殖が阻害されることが先行研究により明らかになっているため、円石藻の培養中はバブリングを停止した。各株を実験条件下で5世代以上培養して馴致させた後、指数増殖を維持しながら新たな培地に植え継ぎ、連続して3回以上の培養でデータを取得した。

毎日の植物プランクトンの生物量の測定結果をもとに、培養時間（日）に対する生物量の自然対数の回帰直線の傾きとして比増殖速度を計算した。倍加時間1日（1日1分裂）の場合、比増殖速度は 0.69 day^{-1} となる。生物量は蛍光光度計（ターナーデザイン社製、10-AU）で測定した生体内クロロフィル蛍光（in vivo蛍光）により把握した（Wood et al., 2005）。10-AUのランプおよび波長調整フィルターはオプティカルキット10-096Rを用いた。In vivo蛍光値は測定直前に受けた光の履歴により変化することが知られているため（Suzuki et al., 2002）、インキュベータの光源が点灯する1時間前の暗期にin vivo蛍光を測定した。

3) 水温およびCO₂分圧の増加に対する応答の把握

2)の実験で明らかにした各株の増殖特性をもとに、水温は各株の比増殖速度が直線的に増加する水温帯である12、16、20 °Cの3段階で実施した。PARは、珪藻では高光量として各株の比増殖速度がほぼ飽和する $300 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ および低光量として $25 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ を、円石藻では高光量として各株の比増殖速度がほぼ飽和する $200 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ および低光量として $50 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ で実施した。実験は白色蛍光灯を光源として恒温実験室で行った。明暗周期は14 h : 10 hに設定した。将来のCO₂排出シナリオによる大気CO₂濃度範囲を考慮し、xCO₂調整済みの空気（400、550、750、1000 ppm）を培地に直接バブリングすることによりCO₂分圧を4段階に調節した。xCO₂調整済み空気はゼロガス精製装置（紀本電子社製、ZGG-07C）およびCO₂ガス調整装置（紀本電子社製、CGM-10C）により生成した。すなわち、本実験では高光量と低光量のPAR条件下において水温3段階とCO₂分圧4段階を組み合わせた実験区で珪藻および円石藻を培養して応答を把握した。

IPCC第5次報告書を参考にすると、本実験で設定したCO₂分圧の400 ppm から1000 ppmへの増加は、水温に関して4 °Cの増加と大まかに一致すると考えられる。水温4 °C分の増加とCO₂分圧600 ppm分の増加に対する植物プランクトンの応答を比較することによって、水温とCO₂分圧の相対的な重要性を比較することができる。

a 珪藻

先行研究で構築したCO₂分圧調節培養実験システムを発展させ、恒温実験室での水温制御を組み合わせた培養システムを構築した（図(4)-1）。培養にはf/2培地を用いたが、培地中のDOCのバックグラウンド濃度が高く、培養中の珪藻が生産したDOCを測定するうえで支障となるため、EDTAを含む微量金属保存溶液の添加量を1/10にした。培養期間中に培地の微量金属栄養塩が不足しないことはあらかじめ確認した。保存株は容量45 mLガラス試験管の実験培地30 mLに接種後、実験条件下で5世代以上培養して馴致させた。その後、実験培地55 mLを含む容量80 mLガラス試験管8本に株を接種し、培養実験を開始した。試験管2本は実験開始時試料としてクロロフィル*a*（Chl-*a*）、細胞数、細胞体積、POC、DOC、pHを測定した。また、培養終了後、Chl-*a*、細胞数、細胞体積、POC、DOC、栄養塩、全アルカリ度（TA）、全炭酸（DIC）、pHを測定した。比増殖速度は毎日測定したin vivo蛍光をもとに算出した。



図(4)-1 恒温培養室におけるガラス試験管を用いた珪藻単離株の培養の様子。

b 円石藻

先行研究により、円石藻は珪藻とは異なり、バブリングにより増殖が阻害されることが明らかとなっているため、実験培地をバブリングせずにCO₂分圧を調節する実験を行うための半連続培養システムを構築した(図(4)-2)。珪藻実験と同様に、培養に用いる培地中のDOC濃度を低減させるため、f/2培地を1/10に希釈したf/20培地を用いた。培養期間中に培地の栄養塩が不足しないことはあらかじめ確認した。保存株を容量45 mLガラス試験管の実験培地30 mLに接種し、実験条件下で5世代以上培養して馴致させた後、培養実験を開始した。培養は2 Lガラス瓶の培地1600 mLで実施した。並行して、4 Lのポリカーボネート容器内の培地にxCO₂調整済みの空気をバブリングして4段階のCO₂分圧の希釈用培地を調整した。円石藻の増殖は毎日のin vivo蛍光の測定により把握し、細胞が一定量以上に増殖した際、実験培地の一部を採取した後に希釈用培地を加えて実験培地を希釈し、培養を継続した。希釈および培養を3回継続することにより、連続した3回の試料を採取した。培地を希釈する前後に試料を採取し、Chl-a、細胞数、細胞体積、POC、DOC、PIC、栄養塩、TA、DIC、pHを測定した。比増殖速度は培地希釈直後から次の希釈時までの細胞数の増加量から算出した。



図(4)-2 恒温培養室における2 Lガラス瓶を用いた円石藻単離株の培養の様子。攪拌子により緩やかに(50 r/min)培地を攪拌しながら培養し、細胞の増殖に応じて適宜、CO₂分圧調節済みの培地で希釈しながら培養を継続した。

(2) 現場プランクトン群集を用いた影響評価実験

1) 2013年秋季実験

2013年10月28日から11月6日にかけて、海洋生物環境研究所柏崎実証試験場に実験システムを設置し、種々の動植物プランクトンを含む柏崎沿岸の現場海水を用いた現場型培養実験を実施した(図(4)-3)。本実験では、水温を3段階(現場水温、+2℃、+4℃)、CO₂分圧を2段階(400 ppm(現場濃度)、1000 ppm)の実験区を設定し、現場プランクトン群集の応答を把握することを目指した。

最初に、試験場の自然海水ラインの海水を250 Lタンクに採取して均一化した。水温、塩分、CO₂分圧、pHを測定するとともに、day -1の分析試料を採取した。次に、この海水は20 Lポリカーボネートタンク6個に分注し、2個ずつを現場水温(19.3℃)に設定した3つの恒温水槽に配置した。また、CO₂分圧の調節に用いる高CO₂海水を作成するため、同じ海水を孔径0.2 μmフィルターでろ過して1 Lポリカーボネートボトル2個に分注して現場水温の水槽に配置し、液化CO₂ボンベから純CO₂ガスを24時間、50 mL/minでバブリングした。

培養海水の採取にあたっては、大型動物プランクトンが培養ボトル間で不均一に分布することで植物プランクトンへの捕食圧が変化しないよう、海水を目合い200 μmのプランクトンネットでろ過することで大型動物プランクトンを除去した。このため本培養実験では、特に大型植物プランクトンに対する動物プランクトンの捕食圧の低下と、ボトルの効果で細胞が沈降除去されないことにより、植物プランクトンの増殖が促進される可能性がある。一方、200 μm以下の動物プランクトンは除去されていないため、このサイズの植物プランクトンと動物プランクトン間の被食-捕食関係は維持されていたと考えられる。

3つの恒温水槽のうち、1つの水槽は現場水温を維持する一方、2つの水槽の水温は徐々に2℃もしくは4℃を徐々に昇温させることにより培養中のプランクトンを水温変化に馴致させた。その際、水温増加自体によるCO₂分圧増加を抑制するため、+2℃および+4℃水槽に配置したタンク海水にはあらかじめ水酸化ナトリウム溶液(200 mmol/L)を添加した。24時間後、すべてのタンク海水に硝酸塩5 μmol/L、リン酸塩0.3 μmol/L、ケイ酸5 μmol/Lを添加するとともに、各水槽の1つのタンクに高CO₂海水を添加してCO₂分圧を調節した。調節後のCO₂分圧はpCO₂計により実測した。高CO₂海水および水酸化ナトリウム溶液の添加量はフリーソフトウェアRのseacarbパッケージにより計算した。最後に、各タンクの海水は5 Lのポリエチレンバック(ロンテナー)に分注して各水槽に配置し(図(4)-3)、6日間培養した。培養は3連で実施した。水槽に照射される太陽光は遮光フィルターにより50%に減光した。培養期間中、植物プランクトン群集の動態を調査するための試料を採取し、Chl-*a*、POC、DOC、PIC、栄養塩、TA、DIC、pHを測定した。Chl-*a*は孔径10 μmフィルターにより大型および小型にサイズ分画した。

2) 2014年夏季実験

2014年8月26日から9月10日にかけて、海生研柏崎実証試験場において実験を実施した(図(4)-3)。本実験は柏崎沿岸の水温が年間の最高値に達する時期のプランクトン群集の応答を2回の実験で把握することを目指した。昨年度の経験をもとに実験区を拡張し、水温を3段階(現場水温、+2℃、+4℃)、CO₂分圧を3段階(400 ppm(現場濃度)、700 ppm、1000 ppm)で実施した。実験は8月28日~9月2日(実験①、5日間、水温27.0℃)および9月4日~9月8日(実験②、4日間、水温27.0℃)にかけて連続で2回実施した。実験方法は2013年の実験と同様である。本実験では、目標のCO₂分圧を達成するため、高CO₂海水を添加しながらCO₂分圧を実測して添加量を調節した。



図(4)-3 柏崎実証試験場における5Lポリエチレンバックを用いた沿岸海水培養実験の様子(2014年)。3段階の水温および3段階のCO₂分圧の実験区を設定し、各実験区について3連で培養した。

(3) 試料分析およびデータ解析

室内実験および現場実験で得られた試料は表(4)-2の方法により各項目を測定した。実験海水中のCO₂分圧およびpHは、DICおよびTAの分析結果から、炭酸系計算プログラム (Pierrot et al., 2006) を用いて計算した。水温およびCO₂分圧の単独および複合影響を評価するうえでは、水温およびCO₂分圧を2つの要因として二元配置分散分析 (two-way ANOVA) を行い、Tukey-Kramer法により実験区間の平均値の差を危険率5 %で検定した。

表(4)-2 分析項目と方法。

分析項目	省略表記	試料作成/分析方法	計測機器
pH		ガラス複合電極	Mettler Toledo, InLab Routine JP
全炭酸	DIC	GF/Fフィルターろ過海水 密閉セル塩酸滴定法	Kimoto, ATT-05
全アルカリ度	TA	GF/Fフィルターろ過海水 密閉セル塩酸滴定法	Kimoto, ATT-05
栄養塩 (NH ₄ 、NO ₃ 、NO ₂ 、PO ₄ 、Si(OH) ₄)		0.2 μmフィルターろ過海水 空気分節連続流れ分析	Bran+Luebbe, AACSHI
クロロフィル _a	Chl- <i>a</i>	GF/Fもしくは10 μmフィルターろ過、DMF*抽出 蛍光光度法	Turner, 10-AU
細胞数密度		電氣的検知帯法 (コールター原理)	Beckman Coulter, Multisizer 4
細胞体積		電氣的検知帯法 (コールター原理)	Beckman Coulter, Multisizer 4
粒子態有機炭素	POC	GF/Fフィルターろ過、塩酸蒸気によるPIC除去 高温燃焼、熱伝導度検出法	Perkin Elmer, 2400 II
粒子態窒素	PN	GF/Fフィルターろ過 高温燃焼、熱伝導度検出法	Perkin Elmer, 2400
粒子態無機炭素	PIC	GF/Fフィルターろ過 (全炭素とPOCの差) 高温燃焼、熱伝導度検出法	Perkin Elmer, 2400
溶存態有機炭素	DOC	GF/Fフィルターろ過海水 高温燃焼、非分散型赤外線分析法	Shimadzu, TOC-V

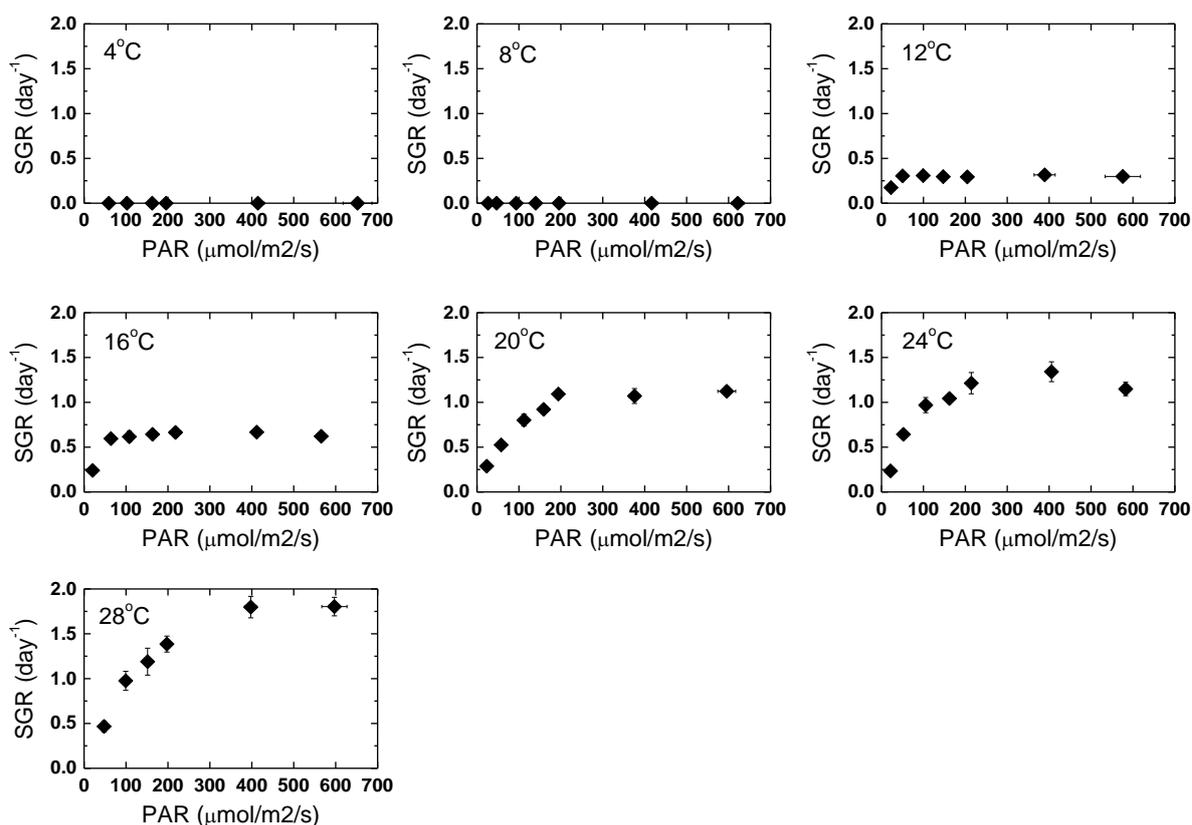
* DMF : *N,N*-ジメチルホルムアミド

4. 結果及び考察

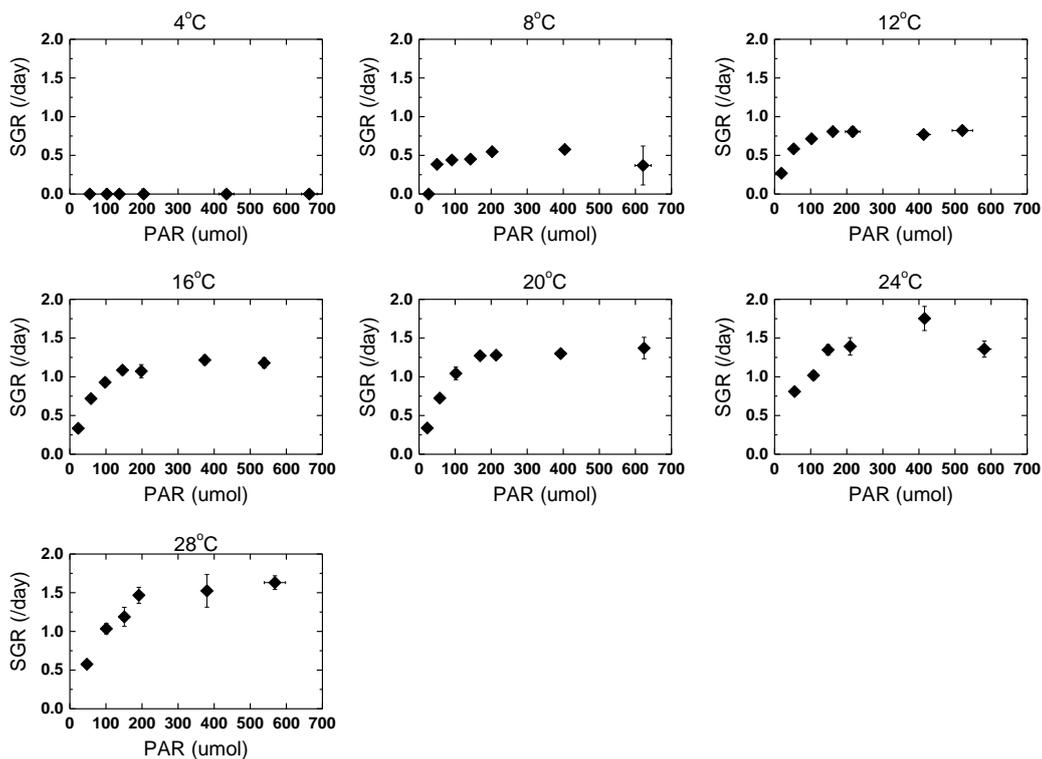
(1) 単離株を用いた影響評価実験

1) 水温および光量に関する増殖特性の把握

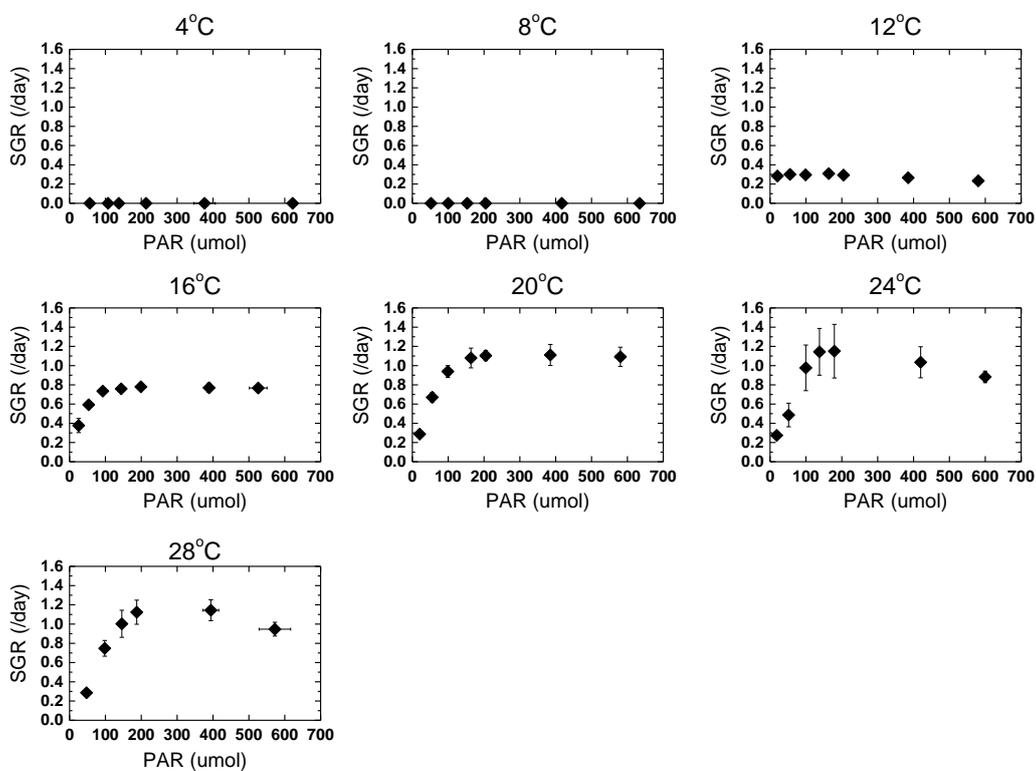
得られた比増殖速度データをもとに、各水温について珪藻3種および円石藻2種のPAR—比増殖速度曲線を作成することができた。比増殖速度が飽和するPARは水温上昇に伴って増加し、珪藻は300 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ 、円石藻は200 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ ではどの水温でも比増殖速度が光飽和し、かつ光阻害を受けていないことを明らかにした。珪藻の結果を図(4)-4~6に、円石藻の結果を図(4)-7~8に示した。各水温で得られた比増殖速度の最大値を水温に対してプロットすると、5種ともに12 $^{\circ}\text{C}$ から20 $^{\circ}\text{C}$ の範囲では水温毎の最大比増殖速度が直線的に増加することがわかった(図(4)-9)。本データセットをもとに、水温および CO_2 分圧増加の影響評価実験は水温12~20 $^{\circ}\text{C}$ で実施することとした。また、比増殖速度に対して光量が飽和の条件と未飽和の条件で影響を比較するため、珪藻は300 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ (高光量) および25 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ (低光量)、円石藻は200 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ (高光量) および50 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ (低光量) で実験することが適していると判断した。



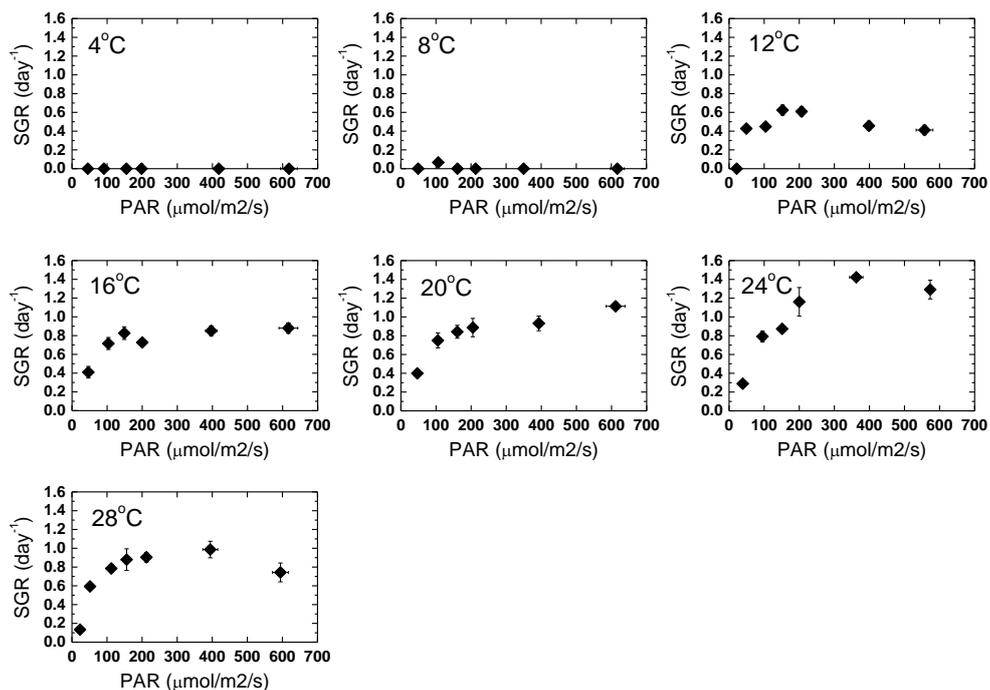
図(4)-4 珪藻 *Thalassiosira weissflogii*。水温毎の光合成有効放射 (PAR) に対する比増殖速度 (SGR) の変化。SGRはどの水温でも300 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ ではほぼ飽和し、25 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ では低減すると判断した。



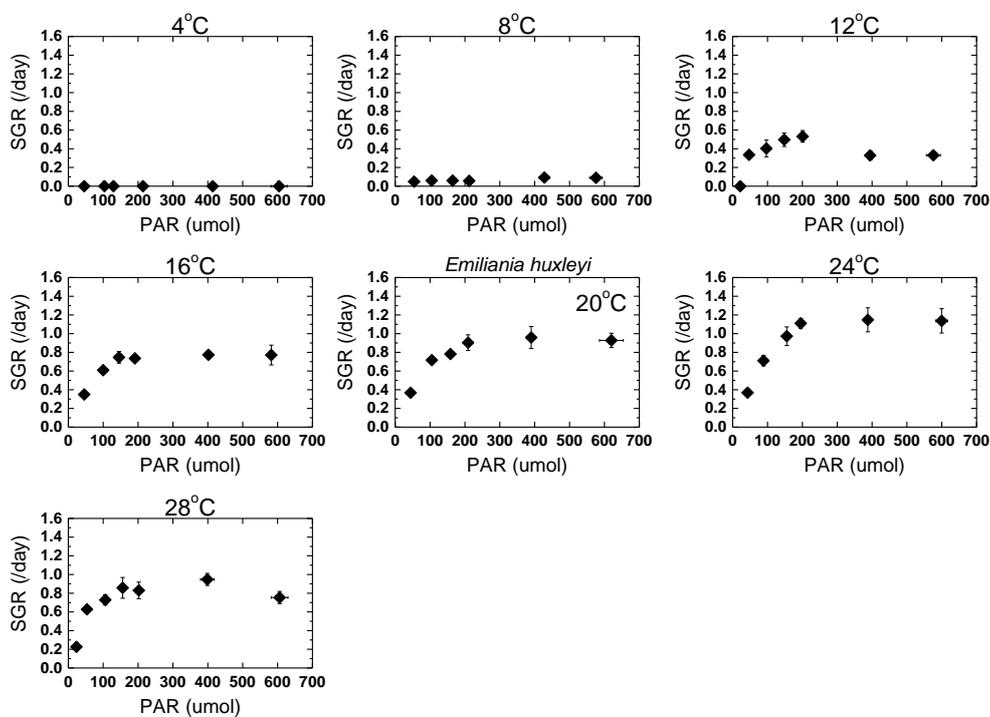
図(4)-5 珪藻 *Thalassiosira pseudonana*。水温毎の光合成有効放射 (PAR) に対する比増殖速度 (SGR) の変化。



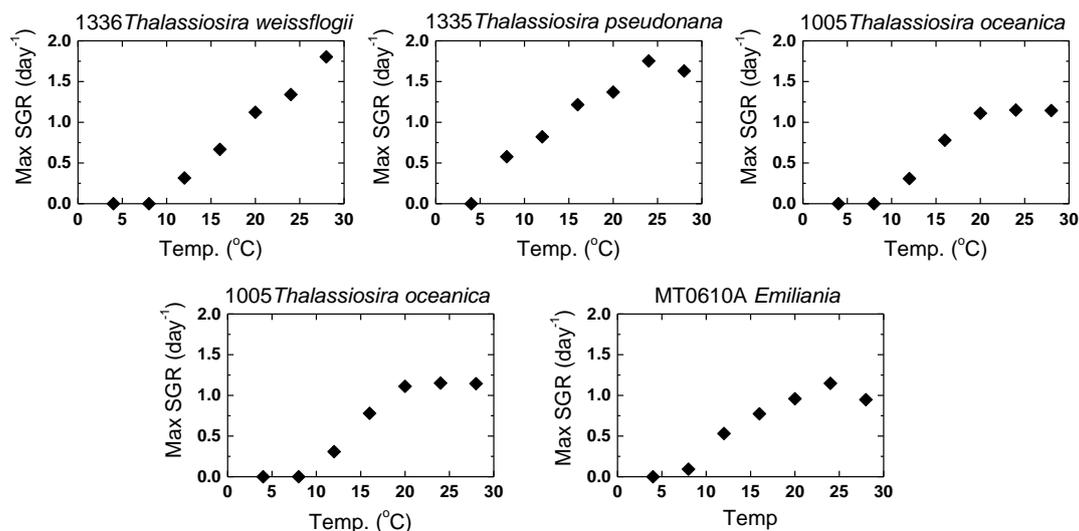
図(4)-6 珪藻 *Thalassiosira oceanica*。水温毎の光合成有効放射 (PAR) に対する比増殖速度 (SGR) の変化。



図(4)-7 円石藻*Gephyrocapsa oceanica*。水温毎の光合成有効放射 (PAR) に対する比増殖速度 (SGR) の変化。SGRはどの水温でも200 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ でほぼ飽和し、50 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ では低減すると判断した。



図(4)-8 円石藻*Gephyrocapsa oceanica*。水温毎の光合成有効放射 (PAR) に対する比増殖速度 (SGR) の変化。



図(4)-9 珪藻3種（上段）および円石藻2種（下段）における水温毎の最大比増殖速度（Max SGR）のプロット。

本データセットは水温増加に対する植物プランクトンの比増殖速度の応答に関して新たな知見を提供した。これまで、植物プランクトンの比増殖速度は水温増加に対して指数関数的に増加する（Q10値を適用できる）と考えられてきた。一般的に、植物プランクトンの比増殖速度の水温応答のQ10値は1.88になると考えられてきた（Eppley, 1972）。しかし本実験で得られた結果は、*Thalassiosira*属珪藻3種および円石藻2種の比増殖速度が水温増加に対して線形応答することを示した。海洋生態系モデルでは植物プランクトンの比増殖速度は一般にQ10値を与えて計算しているが、計算方法を再検討する必要性を示唆している。Boyd et al. (2013) は環境変化に対する植物プランクトンの応答を予測する研究を推進するうえで、植物プランクトンの増殖特性に関するデータを世界中の研究者が共有できる形でより多く蓄積する必要性を強調しており、本研究で得られたデータセットはデータベースの構築に貢献するものである。さらに多くの種について同様のデータを取得し、植物プランクトンの温度応答に関して検討を進める必要がある。

2) 水温およびCO₂分圧の増加に対する応答の把握

a 珪藻

本実験は珪藻を培養している海水にxCO₂調整済みの空気をバブリングすることによってCO₂分圧を調節した。TAおよびDICの測定結果からの理論計算により、水温の違いにかかわらず、*Thalassiosira weissflogii*を高光量で培養した際の4つのCO₂分圧実験区間で大きく異なるpHおよびpCO₂環境を確立できていたことがわかる（表(4)-3）。低光量での実験でも、また他の珪藻2種についても同様の結果が得られた。このような実験条件のもとで、水温3段階とCO₂分圧4段階を組み合わせた培養実験により、珪藻*Thalassiosira weissflogii*（図(4)-10）、*Thalassiosira pseudonana*（図(4)-11）、*Thalassiosira oceanica*（図(4)-12）の比増殖速度と有機炭素生産に与える水温とCO₂分圧の複合影響のデータセットを得た。

3種ともに比増殖速度は水温増加に伴って増加する一方で、CO₂分圧増加の影響は小さかった。光量の違いにかかわらず同様の結果が得られた。全ての種について、CO₂分圧は比増殖速度を有意に変化さ

表(4)-3 珪藻 *Thalassiosira weissflogii* を高光量で培養した際の実験終了時の炭酸系の測定および計算結果。

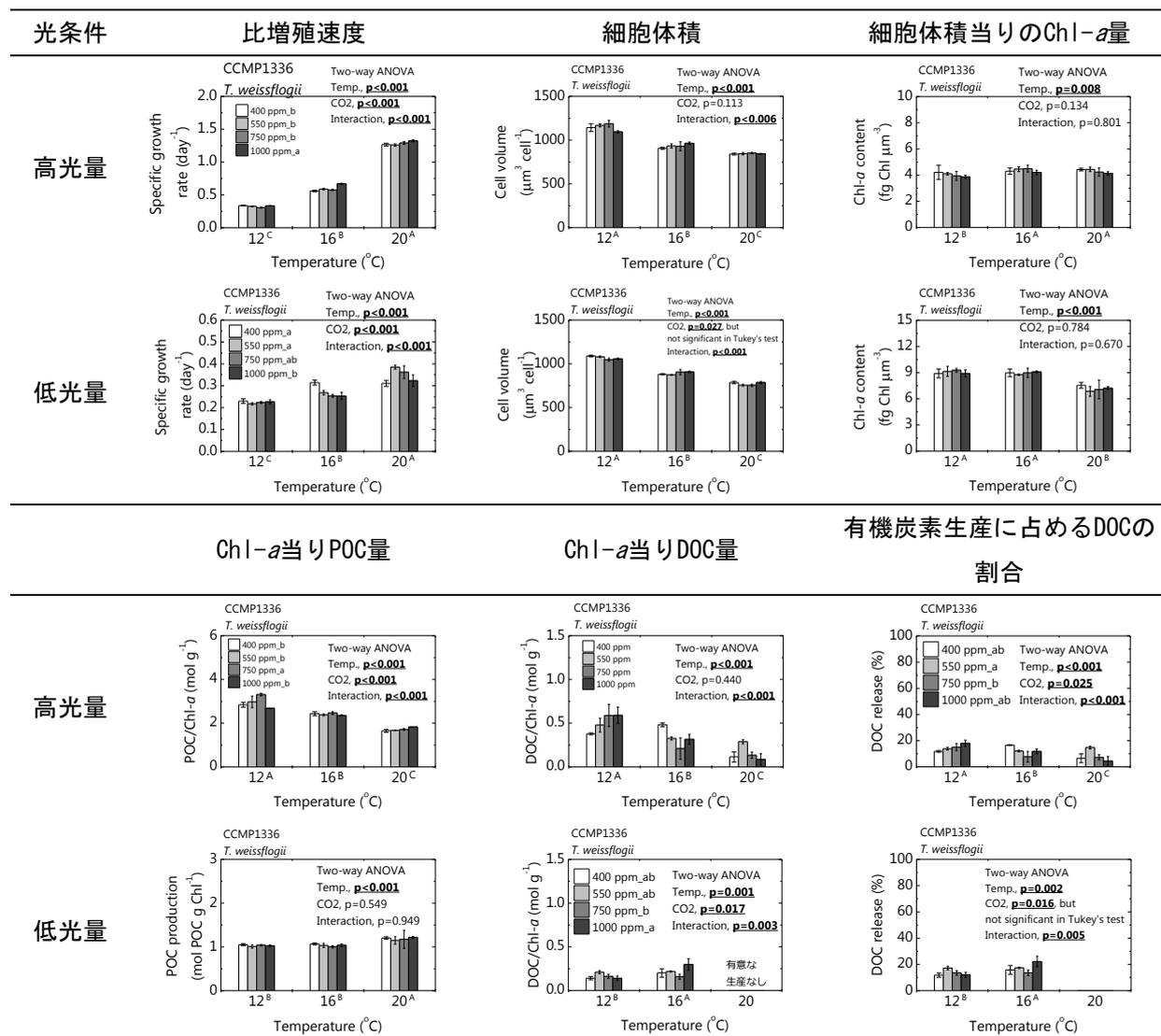
水温	CO ₂ 分圧 実験区	TA μmol/kg	DIC μmol/kg	pH total scale	pCO ₂ ppm
12 °C	400 ppm	1885	1743	7.89	480
	550 ppm	1858	1765	7.73	705
	750 ppm	1859	1805	7.59	1004
	1000 ppm	1873	1841	7.50	1247
16 °C	400 ppm	1770	1642	7.81	558
	550 ppm	1783	1694	7.67	785
	750 ppm	1777	1722	7.55	1067
	1000 ppm	データなし	データなし	データなし	データなし
20 °C	400 ppm	2465	2179	8.03	435
	550 ppm	2465	2251	7.90	624
	750 ppm	2466	2314	7.76	892
	1000 ppm	2475	2372	7.64	1217

せたが、その影響は水温毎に異なり（有意な交互作用があり）、水温とCO₂分圧が複合的に影響していることが示された。Gao et al. (2012)は植物プランクトンの増殖に対するCO₂分圧増加は低光量では促進効果を、高光量では阻害効果を示すことを報告したが、本研究の比増殖速度の結果はそのような傾向を示さなかった。逆に、*Thalassiosira weissflogii*ではCO₂分圧増加は低光量で阻害効果を、高光量で促進効果を示した。一方、外洋域に生息する *Thalassiosira oceanica*では、光量の違いにかかわらずCO₂分圧増加は増殖を阻害する傾向が見られた。CO₂分圧増加が比増殖速度に与える影響は種毎に異なることが示された。水温が4 °C増加した場合と、CO₂分圧が400 ppm から1000 ppmへ増加した場合の比増殖速度の変化を比較すると、どの種においても水温増加の効果のほうが大きいことがわかった。これらの結果は珪藻類の比増殖速度に与える影響はCO₂分圧増加よりも水温増加の方が卓越することを示している。

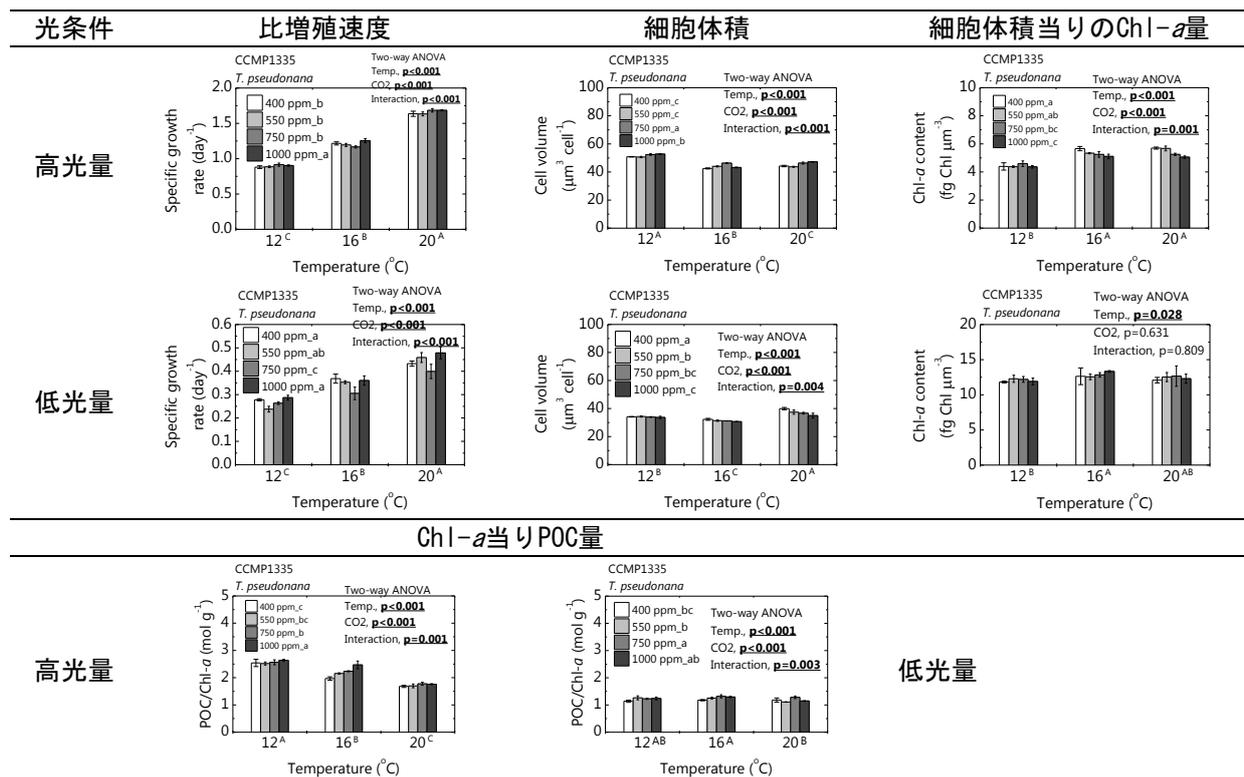
細胞体積は *Thalassiosira weissflogii* において水温増加に伴って減少したが、どの種においても細胞体積当りのChl-*a*量は水温およびCO₂分圧による顕著な変化が見られず安定していたことから、珪藻による有機物生産の変化を評価するうえで、Chl-*a*当りのPOCおよびDOC量を指標として解析することとした。

有機炭素生産も主に水温増加により変化することが実験的に示された。高光量ではChl-*a*当りのPOC量は3種ともに水温増加に伴って減少した。3種のうち、全水温でDOCが生産されたのは高光量の *T. weissflogii*のみであり、POCと同様にChl-*a*当りのDOC生産は水温増加に伴って減少する一方、CO₂分圧の有意な影響は認められなかった。また、*T. weissflogii*の生産する全有機炭素（POC+DOC）に占めるDOCの割合は水温増加に伴い減少した。DOC放出率はCO₂分圧によっても有意な影響を受けたが影響の仕方は水温によって異なっており、水温とCO₂分圧による複合影響が認められた。珪藻のPOCおよびDOC生産は水温増加に対しては直線的に応答するのに対し、CO₂分圧増加の影響は水温との間で複合作用を示すことがわかった。

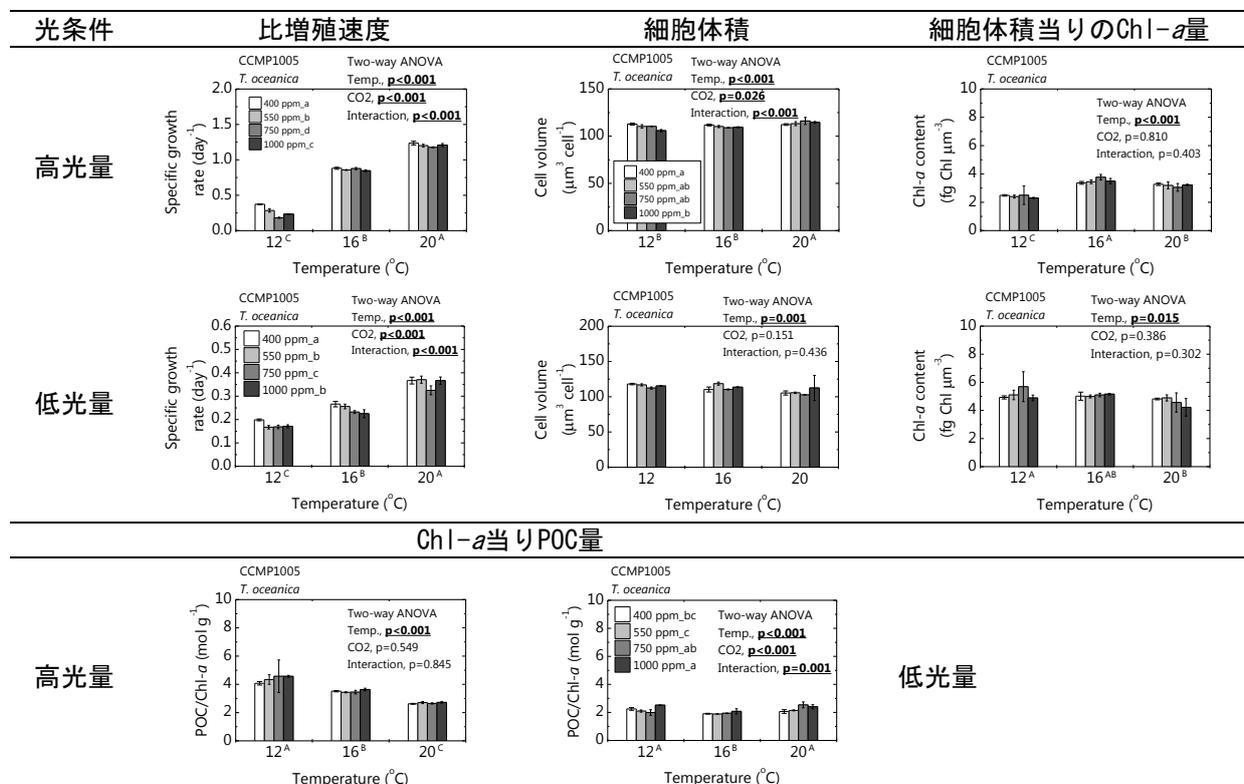
以上の結果から、珪藻の比増殖速度および有機炭素生産量が水温増加に対して直線的に応答することが明らかとなった。一方、CO₂分圧の増加に対する応答は水温増加への応答と比較して小さく、種特異的かつ水温特異的であり、応答の一般化は難しいことがわかった。



図(4)-10 珪藻 *Thalassiosira weissflogii* の比増殖速度、細胞体積、Chl-*a*含量、有機物生産の変化。二元配置分散分析 (Tukey-Kramer法) により有意水準5%で検定した結果を図中の右上に示した。水温実験区間もしくはCO₂分圧実験区間に有意差が認められた場合は、a > b > cの序列で示した。Interaction (交互作用) が有意である場合は、水温とCO₂分圧の複合影響が認められたことを示す。



図(4)-11 珪藻 *Thalassiosira pseudonana*。図(4)-10と同様。本種では培養中の正味のDOC生産が検出できなかったため、Chl-a当りDOC量および有機炭素生産に占めるDOCの割合は示していない。



図(4)-12 珪藻 *Thalassiosira oceanica*。図(4)-10と同様。本種では培養中の正味のDOC生産が検出できなかったため、Chl-a当りDOC量および有機炭素生産に占めるDOCの割合は示していない。

b 円石藻

本実験では円石藻の増殖を妨げないために培養中の培地へのバブリングは行わず、ただし細胞密度の増加によるDIC消費を抑えるため、半連続培養システム構築した。培養中の培地への新たなCO₂供給がないために培養中にDICが減少したが、pHおよびpCO₂の変化は小さく抑えられた(表(4)-4)。また、pCO₂は設定したCO₂分圧値とよく一致した。このような比較的安定したCO₂環境での培養条件下で、水温3段階とCO₂分圧4段階を組み合わせた培養実験により、円石藻*Gephyrocapsa oceanica*(図(4)-13)および*Emiliania huxleyi*(図(4)-14)の比増殖速度、POC、DOC、PIC生産に与える水温とCO₂分圧の複合影響のデータセットを得た。

表(4)-4 円石藻*Gephyrocapsa oceanica*を20 °C、高光量で培養した際の炭酸系の測定および計算結果。

CO ₂ 分圧 実験区	TA、 μmol/kg		DIC、 μmol/kg		pH (total)		pCO ₂ 、 ppm	
	培養前	培養後	培養前	培養後	培養前	培養後	培養前	培養後
400 ppm①	2263	2269	2026	1988	8.01	8.09	434	347
400 ppm②	2265	2266	2043	2015	7.98	8.04	470	405
400 ppm③	2267	2268	2041	2016	7.99	8.04	463	404
550 ppm①	2267	2272	2065	2031	7.94	8.02	527	428
550 ppm②	2266	2268	2077	2063	7.91	7.94	570	521
550 ppm③	2269	2268	2092	2067	7.88	7.93	614	534
750 ppm①	2261	2270	2123	2099	7.79	7.87	778	637
750 ppm②	2264	2274	2134	2131	7.77	7.80	824	765
750 ppm③	2266	2271	2141	2118	7.75	7.82	856	719
1000 ppm①	2265	2269	2162	2148	7.69	7.74	994	883
1000 ppm②	2265	2271	2173	2174	7.67	7.68	1071	1044
1000 ppm③	2266	2268	2177	2164	7.65	7.70	1101	991

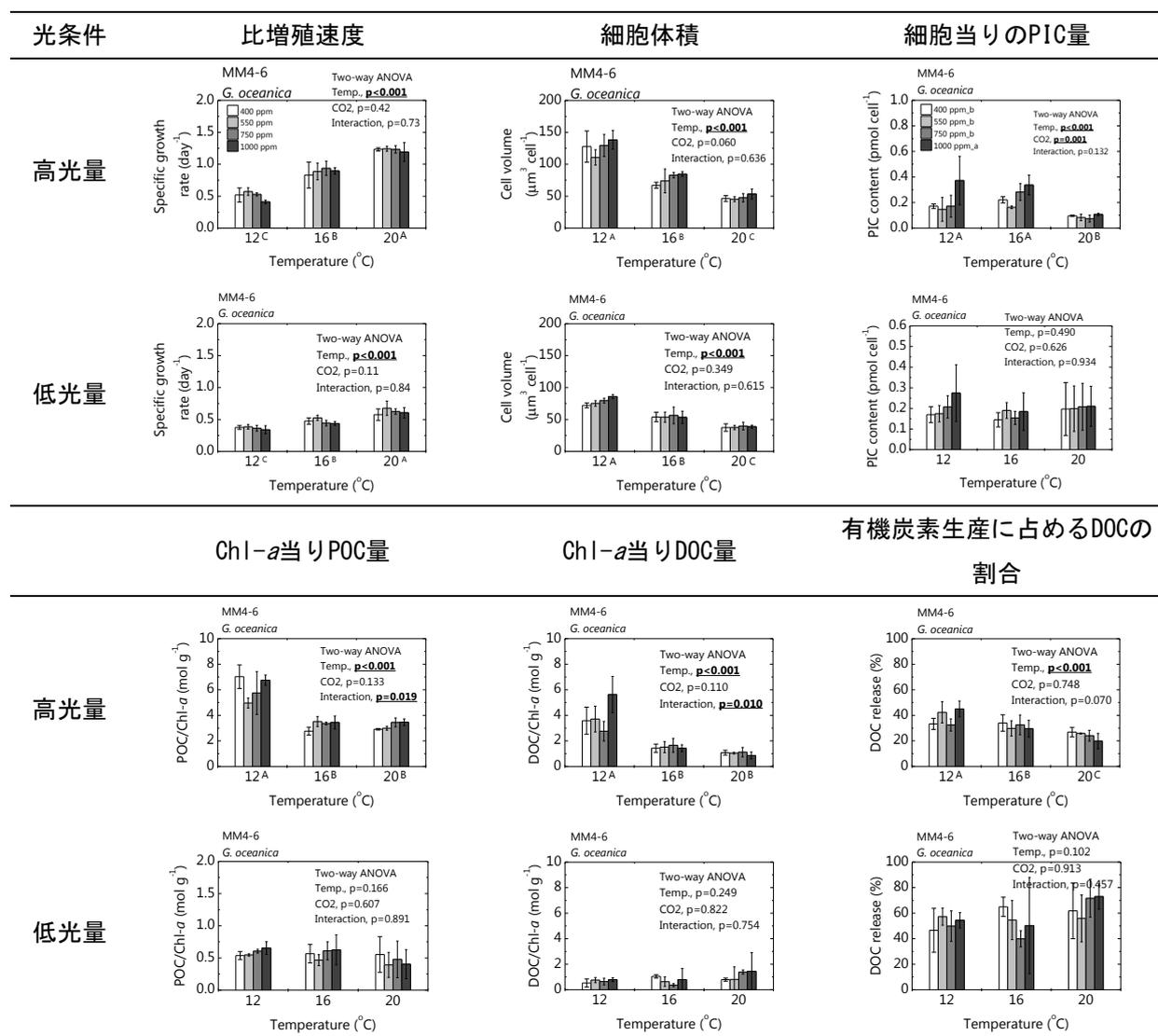
比増殖速度は2種ともに光量の違いにかかわらず、水温増加に伴って増加する一方で、CO₂分圧増加の有意な影響は見られなかった。水温が4 °C増加した際と、CO₂分圧が400 ppm から1000 ppmへ増加した際の比増殖速度の変化を比較すると、水温増加の効果のほうが大きいことがわかった。円石藻類の比増殖速度に与える影響はCO₂分圧よりも水温増加が卓越することが示された。

2種ともに光量の違いにかかわらず、細胞体積は水温増加に伴って大きく減少したが、両種ともに細胞体積当りのChl-*a*量は水温およびCO₂分圧の変化に対して比較的安定していたことから、円石藻による有機物生産の変化を評価するうえで、珪藻と同様にChl-*a*当りのPOCおよびDOC量を指標として解析することとした。

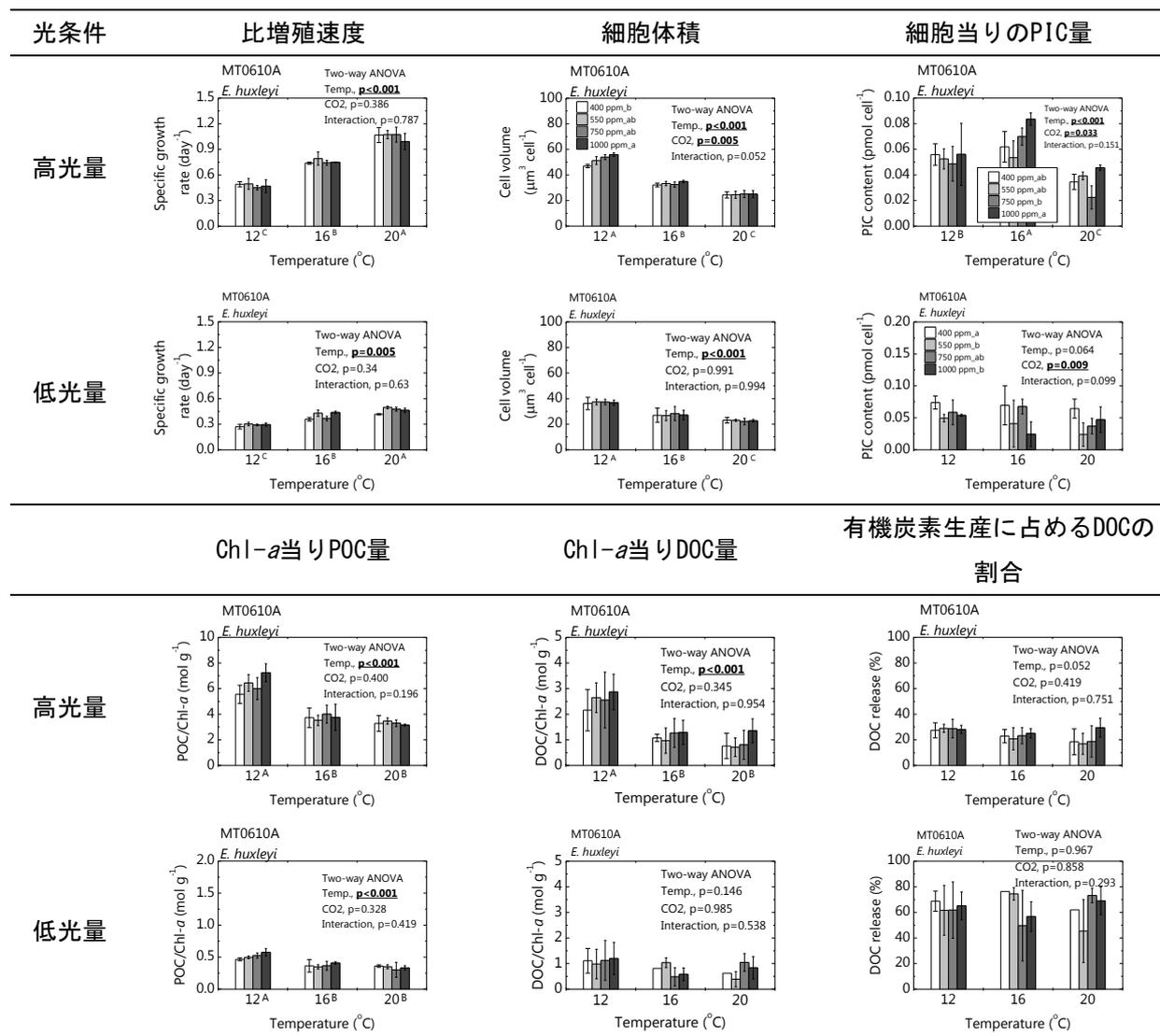
円石藻の有機炭素生産は、比増殖速度と同様に、水温に依存して変化する傾向が明らかとなった。高光量条件では、Chl-*a*当りのPOCおよびDOC量は水温増加に伴って有意に減少する一方、CO₂分圧の有意な影響は認められなかった。*Gephyrocapsa oceanica*のDOC放出率も同様の傾向を示しており、高光量

では水温増加に伴いDOCとして細胞外に放出される有機炭素の割合が減少した。一方、両種とも光量の強弱にかかわらず、DOC放出率に対するCO₂分圧の有意な影響は見られなかった。円石藻の有機物生産についてはCO₂分圧による有意な影響は一切認められず、その動態は水温に依存して変化することが示された。

PIC量の測定結果からは、両種の炭酸カルシウム殻の生産が海洋酸性化により阻害される傾向は見られなかった。高光量での細胞当りのPIC量は水温毎に値が変化することに加えて、1000 ppmでPIC量が増加する傾向が見られた。CO₂分圧の増加に伴うpHの低下は円石藻炭酸カルシウム殻の生産を低下させる可能性が懸念されているが、本実験に用いた2株に関しては1000 ppmまでの範囲のCO₂分圧の増加が殻の生産に与える影響は小さいものと推測された。CO₂分圧増加に対する円石藻の応答は種毎に異なることに加えて (Langer et al., 2006)、同一種においても株毎に異なることが明らかにされており (Langer et al., 2009)、本研究においても円石藻の応答の多様性を支持する結果が得られた。



図(4)-13 円石藻*Gephyrocapsa oceanica*。図(4)-10と同様。

図(4)-14 円石藻*Emiliana huxleyi*。図(4)-10と同様。

c 珪藻および円石藻で得られた結果の比較

本研究では珪藻と円石藻の2大藻類グループの複数種を水温3段階、CO₂分圧4段階、光量2段階の組合せで培養することにより、これまでに例のない規模の影響評価データを獲得できた。全ての結果を俯瞰するため、水温増加とCO₂分圧増加に対する応答を増加、減少、凸凹型に分類するとともに、水温およびCO₂分圧の交互作用(複合影響)が認められるか否かをまとめた(表(4)-5)。比増殖速度や有機物生産への影響はCO₂分圧よりも主に水温によってもたらされることがわかる。POC生産は高光量では全5種で水温増加により低下する一致した結果を示したが、低光量では水温増加に対する応答は種特異的だった。DOC生産についても同様の結果が得られた。一方、CO₂分圧増加は有意な影響をもたらすものの、全種が同様の応答を示すことはなかった。さらに、CO₂分圧増加が有意な影響をもたらした場合のほとんどのケースで水温との間の交互作用が認められたことは、CO₂分圧増加への応答が水温毎に異なることを示している。このことは、海洋酸性化の影響を評価する際、選択する試験水温によって、影響の評価結果が異なることを示す。CO₂分圧増加への応答が多様であるという培養実験の事実は、将来の海洋生態系の変化を予測しようとする際に十分考慮されなければならない、非常に重要な知見である。

表(4)-5 単離株実験での、水温およびCO₂分圧が増加した際の影響と交互作用の有無のまとめ。

- ↗ : 増加
 ↘ : 減少
 凸 : 中間域で増加
 凹 : 中間域で減少
 ○ : 有意な影響あり
 × : 有意な影響なし

項目	種	水温増加		CO ₂ 分圧増加		交互作用	
		高光量	低光量	高光量	低光量	高光量	低光量
比増殖速度	<i>T. oceanica</i>	↗	↗	↘	↘	○	○
	<i>T. pseudonana</i>	↗	↗	↗	凹	○	○
	<i>T. weissflogii</i>	↗	↗	↗	↘	○	○
	<i>G. oceanica</i>	↗	↗	×	×	×	×
	<i>E. huxleyi</i>	↗	↗	×	×	×	×
POC生産	<i>T. oceanica</i>	↘	凹	×	↗	×	○
	<i>T. pseudonana</i>	↘	凸	↗	↗	○	○
	<i>T. weissflogii</i>	↘	↗	凸	×	○	×
	<i>G. oceanica</i>	↘	×	×	×	○	×
	<i>E. huxleyi</i>	↘	↘	×	×	×	×
DOC生産	<i>T. oceanica</i>	—	—	—	—	—	—
	<i>T. pseudonana</i>	—	—	—	—	—	—
	<i>T. weissflogii</i>	↘	凸	×	凹	○	○
	<i>G. oceanica</i>	↘	×	×	×	○	×
	<i>E. huxleyi</i>	↘	×	×	×	×	×
DOC割合	<i>T. oceanica</i>	—	—	—	—	—	—
	<i>T. pseudonana</i>	—	—	—	—	—	—
	<i>T. weissflogii</i>	↘	凸	凹	×	○	○
	<i>G. oceanica</i>	↘	×	×	×	×	×
	<i>E. huxleyi</i>	×	×	×	×	×	×
PIC生産量	<i>G. oceanica</i>	↘	×	↗	×	×	×
	<i>E. huxleyi</i>	凸	×	凹	↘	×	×

(2) 現場プランクトン群集を用いた影響評価実験

1) 2013年秋季実験

水温増加によるCO₂分圧増加を抑えるために水酸化ナトリウム溶液を添加することにより、現場濃度実験区のCO₂分圧は水温の違いにかかわらず非常によく一致した(表(4)-6)。一方、理論計算により高CO₂海水を添加した1000 ppm実験区のCO₂分圧の実測値は目標値に達せず、800 ppm程度までしか増加しなかった。高CO₂海水の添加量の理論計算はCO₂飽和海水を想定して行ったため、高CO₂海水のCO₂分圧が飽和に達していなかった可能性がある。また、タンク海水に高CO₂海水を添加、混合する過程で相当量のCO₂が損失してしまったことも考えられる。ただし、TAおよびDIC測定値から計算したpCO₂はかなり1000 ppmに近く(表(4)-7)、CO₂分圧の実測値と矛盾する。一つの可能性として、pCO₂計測時にガス透過膜を静置海水中に固定したために、効率的なガス透過が達成できず、計測値が過小評価されたことが考えられる。

Day 0では、1000 ppm実験区のCO₂分圧は現場濃度に比べて大きく増加したが、植物プランクトンの増殖に伴いCO₂分圧は急速に低下し、Day 5には300 ppm以下まで低下した(表(4)-7)。これは電極で測定したpH(NBSスケール)の時系列変化でも確認できる(図(4)-15)。ただし、電極測定pHの時系列から判断して400 ppmと1000 ppm実験区間でのCO₂分圧の差は実験終了時まで維持されていたと考えられる。

表(4)-6 各実験区のCO₂分圧の実測値。

実験	水温区	Day #	水温 ℃	400 ppm (現場濃度)	700 ppm	1000 ppm
2013	自然海水	Day -1	19.3	371		
	±0 °C	Day 0	19.3	359		742
	+2 °C	Day 0	21.3	362		766
	+4 °C	Day 0	23.3	362		844
2014実験①	自然海水	Day -1	27.0	544		
	±0 °C	Day 0	27.0	524	698	1071
	+2 °C	Day 0	29.0	516	700	1031
	+4 °C	Day 0	31.0	518	697	1030
2014実験②	自然海水	Day -1	27.0	500		
	±0 °C	Day 0	27.0	449	675	1101
	+2 °C	Day 0	29.0	428	688	1047
	+4 °C	Day 0	31.0	426	698	1124

表(4)-7 2013年沿岸海水実験の炭酸系の測定および計算結果。

Day 0はタンク海水1連試料の計測値、Day 3およびDay 5は3連培養ボトルの平均値。

Day #	水温	CO ₂ 分圧	TA	DIC	pH	pCO ₂
	実験区	実験区	μmol/kg	μmol/kg	total	ppm
0	±0 °C	400 ppm	2106	1891	8.05	372
		1000 ppm	2106	2021	7.71	908
	+2 °C	400 ppm	2123	1892	8.05	375
		1000 ppm	2123	2030	7.71	926
	+4 °C	400 ppm	2140	1891	8.06	374
		1000 ppm	2140	2042	7.69	972
3	±0 °C	400 ppm	2110	1836	8.17	269
		1000 ppm	2111	1950	7.93	524
	+2 °C	400 ppm	2129	1806	8.22	231
		1000 ppm	2128	1929	7.98	454
	+4 °C	400 ppm	2142	1761	8.28	194
		1000 ppm	2144	1933	7.98	465
5	±0 °C	400 ppm	2110	1702	8.39	139
		1000 ppm	2110	1811	8.22	236
	+2 °C	400 ppm	2125	1677	8.42	127
		1000 ppm	2125	1803	8.23	231
	+4 °C	400 ppm	2143	1683	8.40	134
		1000 ppm	2142	1826	8.18	264

Chl-*a* 濃度は培養開始直後から増加し、Day 2 から Day 4 の間でピークに達したと考えられる（図(4)-15）。濃度の立ち上がりは+4 °C実験区で速かった。ただし、+4 °Cの1000 ppm実験区の増殖速度は400 ppmと比較して抑制されており、CO₂分圧増加の影響と考えられる。一方、大型 Chl-*a* の割合は実験期間を通じて水温およびCO₂分圧実験区間に差が認められず、サイズから見た植物プランクトンの群集組成は水温およびCO₂分圧の影響を受けなかったと考えられる。

秋季の有機物生産は80 %程度が粒子態として行われた（図(4)-16）。5日間でのPOC生産量は水温増加の影響が見られない一方、CO₂分圧増加により有意に増加した。このため、粒子態有機物のC:N比もCO₂分圧増加により有意に増加した。植物プランクトンブルームによる有機物生産での炭素固定量がCO₂分圧増加によって促進される結果は過去にも報告されている（Riebesell et al., 2007; Yoshimura et al., 2014）。この現象はCO₂分圧増加が植物プランクトンによる過剰な炭素固定を誘引した結果であると推測されている（Arrigo, 2007）。本研究や過去の実験の結果はブルームの発達から衰退までを考慮した実験により得られた知見であり、ブルームのピーク時までを解析した場合はPOC生産量の違いは見られていない（Yoshimura et al., 2014）。このことから、CO₂分圧増加は栄養塩が枯渇した後のブルーム衰退期における植物プランクトンのPOC生産に影響を与えていることが推察される。一方、DOC生産量は2 °Cの増加で有意に増加したが、CO₂分圧増加の影響は認められなかった。結果的に、

有機炭素生産に占める DOC の割合も水温増加による影響に限られた。また、PIC 生産量は実験区内でのばらつきが大きく、水温および CO₂ 分圧の有意な影響は見られなかった。

2) 2014年夏季実験

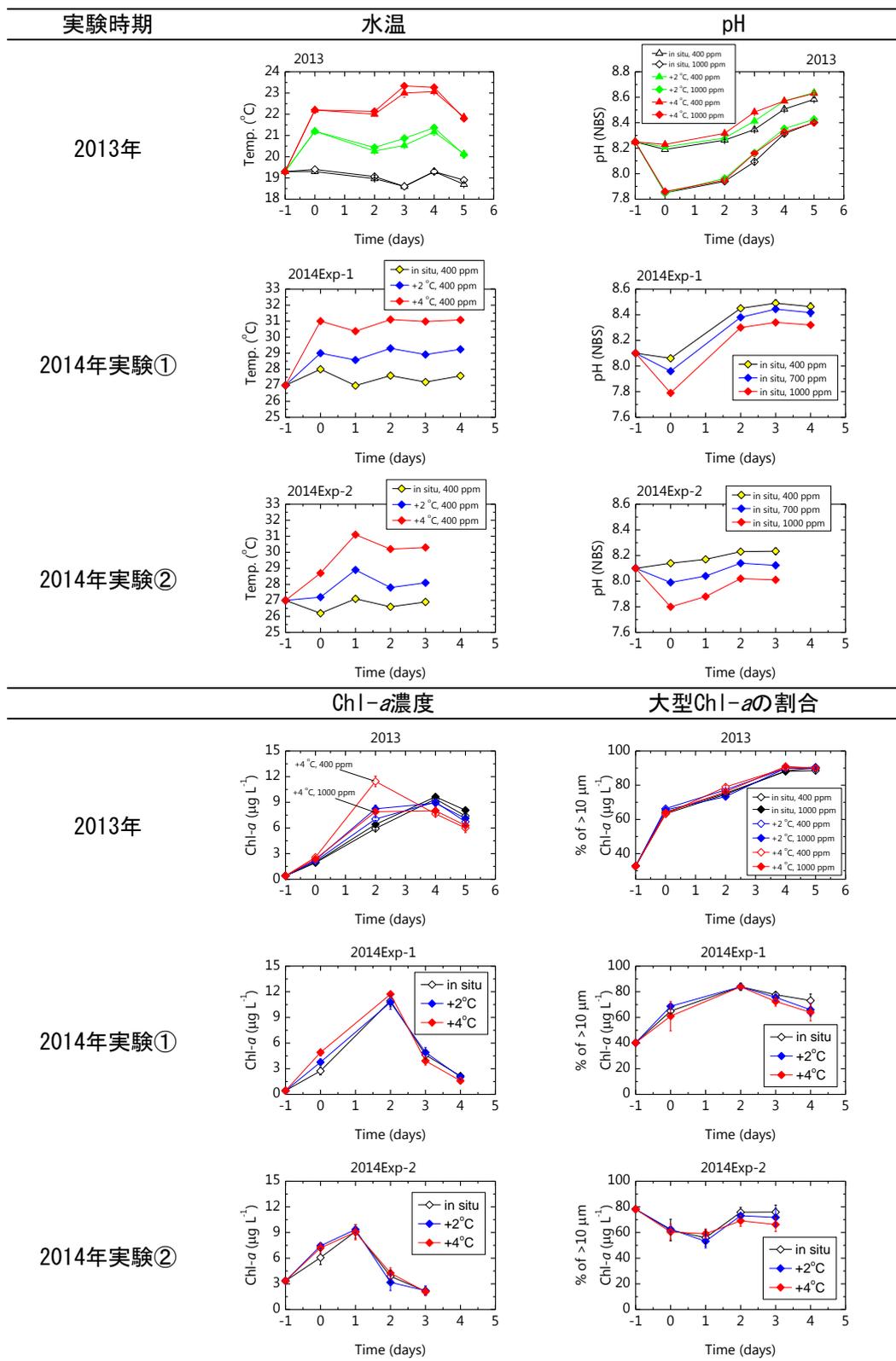
本実験においても、高CO₂海水および水酸化ナトリウムの添加により、培養海水のCO₂分圧はターゲット濃度に非常に近く調節できた（表(4)-6）。Day 0のpCO₂実測値とTAおよびDICから求めたpCO₂計算値はよく一致した（表(4)-8）。実験①ではDay 3にはpCO₂はすべての実験区で300 ppm以下に低下しており、電極pH測定値の急速な上昇と一致する（図(4)-15）。一方、実験②のpCO₂やpHの変化は比較的緩やかだった。

夏季の実験ではCh1-*a*濃度の時系列変化は各水温のCO₂分圧実験区間で有意な差が見られなかったため、3つのCO₂分圧実験区を平均し、水温実験区毎にプロットした（図(4)-15）。Ch1-*a*濃度の立ち上がりは実験①、②ともに水温増加で促進された。ただし、濃度のピーク値は水温によらず一定だった。秋季実験と同様に、Ch1-*a*のサイズ組成は水温やCO₂分圧によって変化しておらず、植物プランクトン群集を構成する大型および小型植物プランクトンの組成は水温とCO₂分圧増加のいずれの影響も示さなかった。

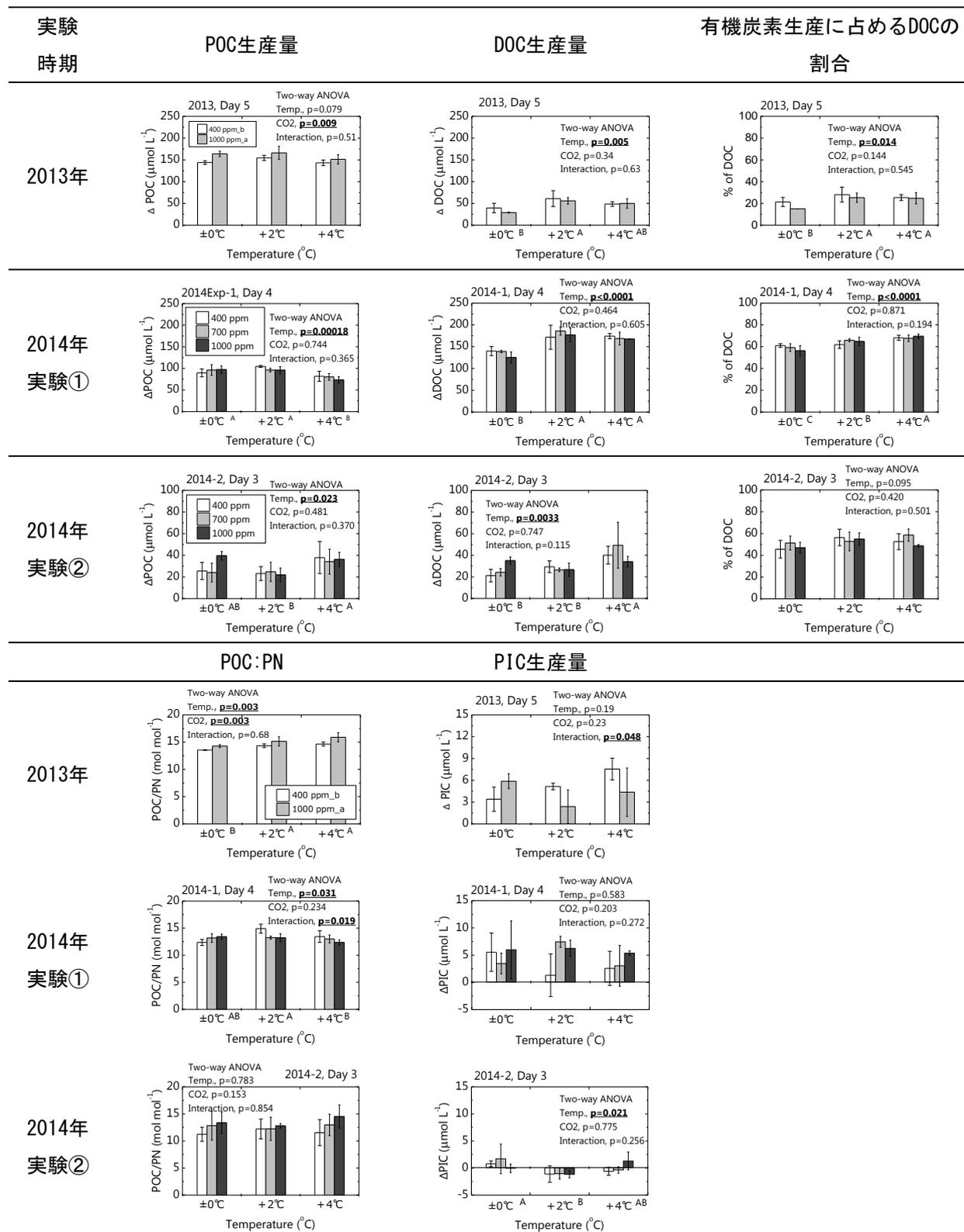
プランクトン群集による有機炭素生産はDOCの割合が50 %以上に達した（図(4)-16）。POC生産量は実験①では+4 °Cで減少、実験②では+2 °Cで減少を示しており、異なる応答を示した。DOC生産量は水温増加により促進される傾向を示した。POCおよびDOC生産量に対するCO₂分圧増加の有意な影響および水温とCO₂分圧増加の複合影響は見られなかった。また、PIC生産量がCO₂分圧増加によって減少する傾向は見られず、海洋酸性化による炭酸カルシウム殻の生成の阻害は確認できなかった。

3) 沿岸海水実験のまとめ

全ての現場実験の実験結果も合わせて考慮すると、水温およびCO₂分圧の増加に対する現場プランクトン群集の応答は実験実施時の水温などの環境条件により変化することがわかった（表(4)-9）。ただし、変化をもたらす要因は圧倒的に水温増加であることがわかる。CO₂分圧増加の影響はCh1-*a*濃度の増加速度の抑制、POC生産量の促進とPOC:PN比の上昇にのみ認められた。交互作用がほとんど認められないことも特徴である。すなわち、現場プランクトン群集の増殖や有機物生産にかかわる過程はもっぱら水温に依存して変化することを示している。Ch1-*a*濃度の立ち上がり速度はどの実験でも水温増加により促進された。また、DOC生産量も2 °Cの水温増加でどの実験でも促進された。結果として、水温増加によりDOCに変換される有機物画分の割合が増加することになった。一方、海洋酸性化の影響が懸念される炭酸カルシウム殻生産への阻害作用は本実験からは見いだせなかった。2014年夏季に連続して実施した2回の実験結果は多くの項目で一致していない。実験に用いたプランクトン群集の組成が異なることにより、環境変化への応答が変わることを示している。この意味で、実海洋のプランクトン生態系が将来の水温およびCO₂分圧の変化にどのように応答するかを予測することは現状では極めて困難であるが、時期や海域の異なるより多くの実験結果を蓄積することで、予測精度を高めるためのキーとなる知見が得られるものと考えられる。



図(4)-15 3回の沿岸海水実験での水温、電極測定pH (NBSスケール)、Chl-a濃度、大型Chl-a (10 μm 以上)の割合の経時変化。2014年の水温は400 ppm実験区のみ、pHは現場水温実験区のみを示す。2014年のChl-aは各水温の3つのCO₂分圧実験区間に有意差が認められなかったため、3つのCO₂分圧実験区の平均値と標準偏差を水温実験区毎に示した。



図(4)-16 3回の沿岸海水実験での培養期間中の有機炭素および無機炭素生産量。アルファベットは水温実験区間もしくはCO₂分圧実験区間で有意差があることを示す(二元配置分散分析、Tukey-Kramer法、有意水準5%)。値はA > B > Cの序列で示した。

表(4)-8 2014年沿岸海水実験の炭酸系の測定および計算結果。

Day -1およびDay 0はタンク海水1連試料の計測値、Day 3およびDay 4は3連培養ボトルの平均値。

実験	Day #	水温	CO ₂ 分圧	TA	DIC	pH	pCO ₂	
2014①	-1	±0 °C	400 ppm	2192	1968	7.92	547	
			700 ppm	2193	2003	7.84	670	
	0	±0 °C	400 ppm	2194	1959	7.94	519	
			700 ppm	2193	2003	7.84	670	
			1000 ppm	2195	2066	7.70	980	
		+2 °C	400 ppm	2208	1953	7.94	511	
			700 ppm	2206	2006	7.83	690	
			1000 ppm	2208	2066	7.70	978	
	+4 °C	400 ppm	2225	1948	7.95	501		
		700 ppm	2225	2000	7.85	659		
		1000 ppm	2225	2062	7.72	938		
		3	±0 °C	400 ppm	2200	1722	8.33	165
				700 ppm	2195	1774	8.25	211
				1000 ppm	2198	1827	8.17	265
	+2 °C	400 ppm	2213	1702	8.34	158		
		700 ppm	2212	1752	8.27	197		
		1000 ppm	2215	1816	8.18	258		
	+4 °C	400 ppm	2228	1709	8.32	169		
		700 ppm	2226	1758	8.25	209		
		1000 ppm	2228	1814	8.17	264		
		4	±0 °C	400 ppm	2193	1733	8.30	178
				700 ppm	2194	1768	8.26	207
				1000 ppm	2196	1833	8.16	275
	+2 °C	400 ppm	2211	1713	8.32	167		
700 ppm		2211	1762	8.25	207			
1000 ppm		2210	1819	8.17	267			
+4 °C	400 ppm	2229	1725	8.29	181			
	700 ppm	2228	1769	8.23	219			
	1000 ppm	2227	1830	8.15	286			
	2014②	-1	±0 °C	400 ppm	2167	1931	7.95	500
				700 ppm	2167	1931	7.95	500
	0	±0 °C	400 ppm	2180	1923	7.98	454	
700 ppm			2179	1993	7.84	672		
1000 ppm			2180	2064	7.67	1059		
+2 °C		400 ppm	2196	1927	7.97	468		
		700 ppm	2193	2008	7.81	738		
		1000 ppm	2194	2067	7.67	1070		
+4 °C		400 ppm	2211	1918	7.99	455		
		700 ppm	2211	2011	7.81	744		
		1000 ppm	2206	2083	7.63	1183		
3		±0 °C	400 ppm	2179	1877	8.07	361	
			700 ppm	2181	1940	7.95	494	
			1000 ppm	2179	1991	7.84	664	
	+2 °C	400 ppm	2196	1875	8.07	362		
		700 ppm	2194	1952	7.92	537		
		1000 ppm	2198	2018	7.79	767		
	+4 °C	400 ppm	2215	1856	8.10	333		
		700 ppm	2214	1947	7.94	520		
		1000 ppm	2214	2013	7.81	738		

表(4)-9 3回の沿岸海水実験での水温およびCO₂分圧増加の影響のまとめ。

		水温増加	CO ₂ 分圧増加	交互作用
Chl- <i>a</i> 濃度の	2013年秋季	↗	↘	○
立ち上がり速度	2014年夏季①	↗	×	×
	2014年夏季②	↗	×	×
POC生産量	2013年秋季	×	↗	×
	2014年夏季①	↘	×	×
	2014年夏季②	凹	×	×
DOC生産量	2013年秋季	凸	×	×
	2014年夏季①	↗	×	×
	2014年夏季②	↗	×	×
DOC割合	2013年秋季	↗	×	×
	2014年夏季①	↗	×	×
	2014年夏季②	×	×	×
POC:PN	2013年秋季	↗	↗	×
	2014年夏季①	凸	×	○
	2014年夏季②	×	×	×
PIC生産量	2013年秋季	×	×	○
	2014年夏季①	×	×	×
	2014年夏季②	凹	×	×

(3) 単離株および現場プランクトン群集の影響評価実験の結果の比較

本サブテーマで実施した単離株を用いた室内実験（平成24および25年度）と沿岸海水を用いた現場実験（平成25および26年度）からは、将来の植物プランクトンの動態は主に水温増加に依存して変化し、CO₂分圧増加の影響は比較的小さいことがわかった。植物プランクトンの増殖速度が水温増加に伴って促進される様子は室内および現場実験の両者で一致し、普遍的な結果と考えられる。一方、水温増加に伴う有機炭素生産量の応答は室内実験では減少傾向、現場実験では増加傾向であり、相反する結果となった。これは、室内実験では指数増殖期のみを測定対象としたのに対し、現場実験では増殖期から衰退期までを測定対象としたため、測定期間が異なることに起因したと考えられる。2013年秋季の実験ではCO₂分圧増加が増殖衰退期のプランクトン群集による有機炭素生産にプラス効果をもたらす様子が捉えられたことから、増殖衰退期の有機炭素生産を詳細に把握することが将来の有機炭素生産量の変化を解明するうえでカギとなることがわかった。また、現場実験では植物プランクトン以外に動物プランクトンや細菌類が有機炭素生産にかかわっていることも結果の違いをもたらしたと推測され、今後はこれらの生物の役割とそれに対する水温とCO₂分圧増加の複合影響を解明することが課題と考えられる。

以上のように、単離株を用いた室内実験と沿岸海水を用いた現場実験により、水温とCO₂分圧増加の複合影響を検討し、将来の植物プランクトンの動態は主に水温増加に依存して変化することを明らか

にできた。本成果は実環境で将来に起こりうる現象を把握するうえで重要な知見となると考える。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

本研究はこれまでに報告例が少ない、植物プランクトンに対する水温とCO₂分圧増加の複合影響を評価する実験を、単離株を用いた室内培養実験と沿岸海水を用いた現場型培養実験の両者により実施し、多くのデータを得た。これらのデータは植物プランクトンに対する水温増加とCO₂分圧増加の影響を相対的に比較することを可能とした。結果として、植物プランクトンの応答はCO₂分圧増加よりも水温増加に依存するものであることが明らかとなった。将来の実環境では水温とCO₂分圧は同時に増加していくものであるため、その変化に対する植物プランクトンの応答のメカニズムを解明するためには、本研究のような水温とCO₂分圧の複数段階の組合せ実験が不可欠である。本研究はこれに加えて、光量の違いが水温とCO₂分圧の複合影響にもたらす効果も考慮することができた。将来の海洋は表層の水温増加により表層混合層深度が浅くなると予測されており、表層に生息する植物プランクトンの受け取る光量は増加する傾向にある。表(4)-5に示したように、光量が増加することで影響の仕方が変化し、光量が増加することで影響の発現が多くなる傾向にあることは、今後の影響評価研究の進め方に有益な知見をもたらしたと考える。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない。

<行政が活用することが見込まれる成果>

海洋生態系の基盤を形成する植物プランクトンへの影響を比較した場合に、海洋酸性化よりも地球温暖化の影響が重大であることを実験的に示したことは重要な成果である。環境政策の展開の方向性を議論するうえで活用しうる科学データを取得できたと考える。今後、本サブテーマの結果は学術論文として発表していくことになるが、次期IPCC評価報告書での生物影響のレビューに引用される成果となり得るものであり、政策立案者の意思決定に貢献できる可能性がある。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文(査読あり)>

特に記載すべき事項はない。

<その他誌上発表(査読なし)>

特に記載すべき事項はない。

(2) 口頭発表 (学会等)

- 1) 芳村毅、杉江恒二、津旨大輔：日本海洋学会秋季大会、清水（2012）
「珪藻類の増殖に対するCO₂分圧増加の影響の評価」
- 2) 芳村毅、杉江恒二、津旨大輔：日本海洋学会秋季大会、札幌（2013）
「植物プランクトンの増殖に対するCO₂分圧増加の影響の評価」
- 3) 芳村毅、野尻幸宏：日本海洋学会春季大会、東京（2014）
「珪藻*Thalassiosira weissflogii*の増殖に対する水温およびCO₂分圧の増加の影響評価」
- 4) 芳村毅、野尻幸宏：日本海洋学会秋季大会、長崎（2014）
「円石藻類の増殖に対する水温およびCO₂分圧の増加の影響評価」
- 5) 芳村毅、野尻幸宏、堀田公明：日本海洋学会2015年度春季大会、東京（2015）
「沿岸域のプランクトン群集に対する水温およびCO₂分圧の増加の影響評価」

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない。

(4) 「国民との科学・技術対話」の実施

- 1) 環境省環境研究総合推進費一般向け研究成果報告会「海洋酸性化がわが国周辺の生物に与える影響を評価する」（主催：環境研究総合推進費2A-1203課題、平成27年2月21日、TKP市ヶ谷カンファレンスセンター、聴衆約60名）にて講演

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

(6) その他

特に記載すべき事項はない。

8. 引用文献

- 1) Passow, U. and Carlson, C. A. The biological pump in a high CO₂ world. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 470, 249–271, doi:10.3354/meps09985 (2012).
- 2) Falkowski, P. Ocean Science: The power of plankton. *Nature* 483, S17–S20 (2012).
- 3) 諏訪僚太、中村崇、井口亮、中村雅子、守田昌哉、加藤亜記、藤田和彦、井上麻夕里、酒井一彦、鈴木淳. 海洋酸性化がサンゴ礁域の石灰化生物に及ぼす影響. *海の研究* 19, 21-40 (2010).
- 4) Riebesell, U. et al. Reduced calcification of marine plankton in response to increased atmospheric CO₂. *Nature* 407, 364-367 (2000).
- 5) 杉江恒二、芳村毅. 海洋酸性化が植物プランクトンの動態および物質循環に及ぼす影響. *海の研究* 20, 101-148 (2011).
- 6) Sarthou, G., Timmermans, K. R., Blain, S. and Tréguer, P. Growth physiology and fate of diatoms in the ocean: a review. *Journal of Sea Research* 53, 25-42, doi:10.1016/j.seares.2004.01.007 (2005).

- 7) Riebesell, U. , Wolf-Gladrow, D. A. and Smetacek, V. Carbon dioxide limitation of marine phytoplankton growth rates. *Nature* 361, 249–251 (1993).
- 8) Gao, K. et al. Rising CO₂ and increased light exposure synergistically reduce marine primary productivity. *Nature Clim. Change* 2, 519–523, doi:10.1038/nclimate1507 (2012).
- 9) Boyd, P. W. and Hutchins, D. A. Understanding the responses of ocean biota to a complex matrix of cumulative anthropogenic change. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 470, 125-135, doi:10.3354/meps10121 (2012).
- 10) Borchard, C. and Engel, A. Organic matter exudation by *Emiliania huxleyi* under simulated future ocean conditions. *Biogeosciences* 9, 3405–3423, doi:10.5194/bg-9-3405-2012 (2012).
- 11) Kim, J.-M. et al. Shifts in biogenic carbon flow from particulate to dissolved forms under high carbon dioxide and warm ocean conditions. *Geophys. Res. Lett.* 38, doi:10.1029/2011gl047346 (2011).
- 12) Guillard, R. R. L. in *Culture of Marine Invertebrate Animals* (eds W.L. Smith and M.H. Chanley) 26–60 (Plenum Press, 1975).
- 13) Wood, A. M. , Everroad, R. C. and Wingard, L. M. in *Algal Culturing Techniques* (ed R.A. Andersen) 269–285 (Elsevier, 2005).
- 14) Suzuki, K. , Minami, C. , Liu, H. and Saino, T. Temporal and spatial patterns of chemotaxonomic algal pigments in the subarctic Pacific and the Bering Sea during the early summer of 1999. *Deep-Sea Res. II* 49, 5685-5704, doi:10.1016/s0967-0645(02)00218-7 (2002).
- 15) Pierrot, D., Lewis, E. and Wallace, D. W. R. MS Excel program developed for CO₂ system calculations. ORNL/CDIAC-105a. Carbon Dioxide Information Analysis Center, Oak Ridge National Laboratory, U.S. Department of Energy, Oak Ridge, Tennessee. (2006).
- 16) Eppley, R. W. Temperature and phytoplankton growth in the sea. *Fish. Bull* 70, 1063-1085 (1972).
- 17) Boyd, P. W. et al. Marine Phytoplankton Temperature versus Growth Responses from Polar to Tropical Waters – Outcome of a Scientific Community-Wide Study. *PloS one* 8, e63091, doi:10.1371/journal.pone.0063091 (2013).
- 18) Langer, G. et al. Species-specific responses of calcifying algae to changing seawater carbonate chemistry. *Geochemistry, Geophysics, Geosystems* 7, doi:10.1029/2005gc001227 (2006).
- 19) Langer, G. , Nehrke, G. , Probert, I. , Ly, J. and Ziveri, P. Strain-specific responses of *Emiliania huxleyi* to changing seawater carbonate chemistry. *Biogeosciences* 6, 2637–2646 (2009).
- 20) Riebesell, U. et al. Enhanced biological carbon consumption in a high CO₂ ocean. *Nature* 450, 545–548, doi:10.1038/nature06267 (2007).
- 21) Yoshimura, T. et al. Organic matter production response to CO₂ increase in open subarctic plankton communities: Comparison of six microcosm experiments under iron-limited and -enriched bloom conditions. *Deep-Sea Res. I* 94, 1–14, doi:10.1016/j.dsr.2014.08.004 (2014).
- 22) Arrigo, K. R. Carbon cycle: Marine manipulations. *Nature* 450, 491–492 (2007).

Experimental study of multiple impacts of global warming and ocean acidification on marine species

Principal Investigator: Yukihiro NOJIRI

Institution: National Institute for Environmental Studies (NIES)
16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305-8506, JAPAN
Tel: +81-29-850-2499 / Fax: +81-29-858-2219
E-mail: nojiri@nies.go.jp

Cooperated by: National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Marine Ecology Research Institute, Central Research Institute of Electric Power Industry

[Abstract]

Key Words: Carbon dioxide, Ocean acidification, Global warming, Coastal biology, Combined impact, Coral species, fishery species, Manipulation experiment, Phytoplankton, Organic carbon production

Increase of atmospheric CO₂ concentration causes global warming and ocean acidification simultaneously and marine species will have the multiple impacts. Target species of the project are northward migrating corals, fishery fish, and phytoplankton around Japan coast. The results will give basic knowledge for predicting changes in coastal marine ecosystem, future fishery resources, and marine carbon cycles. A new scheme for CO₂ addition was applied to enlarge the applicable water volume. One or 10 ton tanks of pCO₂ adjusted seawater were prepared for fish experiments and the performance was well demonstrated. For coral species, simultaneous control of temperature and CO₂ concentration was also achieved with the newly developed CO₂ system.

It is known that the northward migration of coral species along the Kyushu and Honshu coast and the coral fauna are now changing. However, the lack of knowledge for CO₂ impact on the migrating and indigenous species makes the future prediction difficult. We sampled several sub-tropical and temperate coral species from Izu and Kushimoto, where migrating coral species are observed, for multiple impact study of temperature and CO₂ concentration changes. Experiment revealed that indigenous corals of Honshu has much resistance for low temperature, however, northward migrating species has much larger calcification rate in high temperature. Temperature increase and acidification showed interaction in the multiple dose experiment. Calcification of the northward migrating species was promoted by increase of temperature, while it was inhibited by CO₂ increase. It suggest that the northward migration of coral induced with global warming

may be moderated by ocean acidification

Culture study with CO₂ manipulation for Japanese whiting (*Sillago japonica*) was carried out. All the stages of the reproduction had not been impacted even under very high, unforeseen CO₂ levels of ocean acidification such as 4000 µatm. This is the first study in which elevated pCO₂ was maintained throughout the reproductive cycle of a marine fish with a large seawater tank volume. The finding suggests marine fish may be more tolerant of ocean acidification than has been generally thought. On the other hand, multiple doses of temperature and CO₂ increases showed impact for development of eggs at very high CO₂ concentration of 2000 µatm.

Impact of temperature and CO₂ increase for growth of diatom and coccolithophore has been compared in pure culture and natural coastal seawater experiments. The impact of temperature was much significant than the CO₂ increase in both cases for particulate organic carbon production.