

A-0804 海洋酸性化が石灰化生物に与える影響の実験的研究

(2) CO₂増加が水産重要生物の幼生に及ぼす影響に関する研究

独立行政法人水産総合研究センター

中央水産研究所 浅海増殖部 生物特性研究室	木村 量
東北区水産研究所 海区水産業研究部 沿岸資源研究室	高見秀輝
北海道区水産研究所 亜寒帯海洋環境部 生物環境研究室	小埜恒夫

<研究協力者> 北海道区水産研究所 海区水産業研究部 海区産業研究室

鬼塚年弘

平成20～22年度累計予算額：38,900千円（うち、平成22年度予算額：11,900千円）

予算額は、間接経費を含む。

[要旨] 本研究は食料資源として重要な水産重要生物について、大気中二酸化炭素濃度の増加に伴う海洋酸性化が近未来に起こった場合に、その影響を調べることを目的としている。このプロジェクトでは石灰化生物である貝類等、特に世界的に報告がほとんどない重要巻貝の幼生の影響評価に取り組む。まず、海水中の二酸化炭素濃度を一定に高く保った環境下での影響を調べた。エゾアワビ幼生では、pCO₂（二酸化炭素分圧）が1500 ppm（現状の3倍以上、21世紀末に予想される濃度の最大値の1.5倍）以上で受精率・ふ化率の低下、幼生の幼殻長減少と奇形率増加が認められた。さらに、変態期および着底後に30日以上長期間飼育した結果、やはり1500 ppm pCO₂以上の濃度で成長や殻形成に影響があることが認められた。また、サザエ卵・幼生でも、1500 ppm 以上の高いpCO₂環境では、受精後の卵発育段階が遅れること、ふ化後の奇形率の増加、2000 ppmで有意に殻長が減少することなど、エゾアワビとよく似た傾向の影響が認められた。これらの結果は、海洋酸性化が進行すると遠い将来には貝類幼生の生態変化を引き起こす可能性があることを示唆している。一方、アオリイカ卵をふ化まで1ヶ月以上高pCO₂環境で流水飼育した結果、2000 ppm pCO₂でも対照区とふ化率や生残率、ふ化仔魚の重量に大きな違いは見られず、海洋酸性化に対して感受性の低い水産重要種もあることを示した。さらに、沿岸域では、海水中二酸化炭素濃度が季節・日周変動を示すことが明らかとなってきたため、本研究で開発した装置の特性を生かして、エゾアワビふ化幼生を用いてpCO₂を24時間周期で日周変動させた実験を行った。エゾアワビ幼生を流水条件下で75時間飼育し終了後に幼生の死亡率、奇形率および幼殻長を実験区ごとに比較した。その結果、親によって二酸化炭素濃度に対する感受性が異なるが、日周変動を有する実験区では濃度一定区と比較して、いずれも二酸化炭素濃度平均値より最大値が影響することが示唆された。このような実験条件設定での結果は世界初であり閾値の議論に重要な知見となる。

[キーワード] 二酸化炭素、海洋酸性化、食料重要種、貝類幼生、殻形成

1. はじめに

大気中の二酸化炭素（CO₂）が増加して海に溶け込むことで、海のpHは既に17世紀の産業革命以

降0.1低下して来た。今後の低下予測は海洋モデルで行われており、2100年までに0.5低下するという予測があり¹⁾、現在の化石燃料消費を続けると約300年後に最大で0.7程度低下すると考えられている²⁾。ただし、実際にそのpH変化(CO₂増加)で海の生物と生態系にどのような影響が起るかの知見が不足している³⁾。そこで、本研究では、わが国沿岸に生息する多様な動物種のうち、CO₂影響が顕著に現れると考えられる石灰化生物(炭酸カルシウムの殻や骨格を持つ生物)として沿岸性底生生物(ウニ、貝類、サンゴなど)を中心に、CO₂濃度を高めて飼育する実験で影響評価を行う。飼育実験には、制御に工夫を施した装置を用い、低レベルのCO₂濃度増加飼育実験に特に力を入れる。すなわち、近未来に沿岸海洋でおこる状況をシミュレートした飼育実験で、近い将来のCO₂の影響を評価する。CO₂の濃度増加という実感しにくい現象の影響を、認識しやすい海の生物の殻ができなくなるという現象から明らかにし、地球温暖化影響を回避するために超えるべきではない大気CO₂濃度レベル(ガードレール値)の評価に資する。

本サブテーマでは、産業上重要な魚介類を対象に、最も影響が出やすいと考えられる時期である卵から幼生初期に焦点をあてて、CO₂を高めた環境下でどのような影響が出るかを解明する。

2. 研究目的

大気中CO₂濃度が上昇するにつれて海洋のpHが低下すると、炭酸カルシウムの殻を作る生物では、殻の生産速度が低下することが報告されている⁴⁾。この成長阻害など海洋酸性化によって影響を受ける生物では、有孔虫、石灰藻、ウニなどで報告がされている⁴⁾。しかし、水産重要生物を扱った例はまだほとんどない。もし、水産重要種で海洋酸性化によって大きな影響があるとすると、食料生産の面からも人類の危機を迎えることになる。

多くの魚類と同様に、海洋生物は大量の卵を産み、発生初期に大量減耗した後に生き残り、次世代を形成するという戦略を取るものが多い⁵⁾。この意味で発生初期に海洋酸性化の影響があるかどうかは大きな意味を持つ。また、巻貝では成貝ではアラゴナイトとカルサイトの結晶を持つ種でも発生初期に形成される幼殻ではアラゴナイト⁶⁾であるため、より早く海洋酸性化の影響を受けることが予想される。最近の海洋酸性化による無脊椎動物に関する総説では、マガキ、ムラサキイガイ幼生について高いpCO₂飼育海水による影響が報告されている⁷⁾が、水産上重要な巻貝での報告例はない。そこで本サブテーマでは日本、中国、アメリカ、オーストラリアなどで食用され、特に日本で最も高価な水産物のひとつであるアワビ類をとりあげた。アワビ類幼生では栄養源を卵黄に依存するので、多くの二枚貝類・ウニ類幼生のように餌料藻類を与える必要がないため、飼育環境のCO₂濃度変動を最小限に抑えることが可能である。特にエゾアワビでは、長年の種苗生産技術の蓄積があり、人工授精や変態誘起などの技術が確立している。エゾアワビを中心にサザエやアオリイカという重要種の評価を進めたほか、エゾアワビについては影響評価方法の深化も行った。

本サブテーマでは、初年度CO₂濃度調整装置を用いて水産重要生物幼生の流水飼育実験系を確立した。また、重要巻貝エゾアワビ幼生初期において、短期間の無給餌実験で高CO₂濃度(低pH)が成長・生残等に及ぼす影響を明らかにした。2年目は、長期間にわたり高CO₂濃度(低pH)が及ぼす影響を解明するために、エゾアワビ幼生から変態した初期稚貝に給餌飼育し、高CO₂濃度が餌生物に与える影響を軽減しつつ高CO₂濃度の影響を評価する実験手法を開発すること、それを用いてエゾアワビ初期稚貝で1ヶ月程度の長期間にわたり高CO₂濃度(低pH)が成長・生残等に及

2) pCO₂の精度保持の確認

流水実験開始前に、全ての飼育チャンバーとペリスタポンプ用一時貯水槽から採水して電量滴定法によりDIC（全炭酸）を、一点式滴定法によりアルカリ度の測定を行った。測定の際に（株）環境総合テクノス社製の海洋炭酸系参照海水を合わせて測定し、絶対値の確度を確保した。これらの観測値と水温・塩分から各チャンバーのpCO₂を算出し、CO₂添加装置から供給された海水の培養実験系通過中のpCO₂変動を評価した。流水実験開始後は、各実験区に幼生を入れないダミー用飼育チャンバーを設け、そこから定期的に採水して同様にDICとアルカリ度の測定を行い、pCO₂の安定を確認した。止水実験では、各実験区毎に幼生を入れない飼育サンプル瓶を一つずつ用意し、幼生を入れた瓶と同様に取り扱いながら実験開始前後にそこから採水し、DICとアルカリ度を測定してpCO₂の安定を確認した。全実験期間を通じて、各実験区の流水飼育チャンバーおよび止水飼育サンプル瓶のpCO₂計算値は、CO₂添加装置の設定pCO₂値と±50 ppm程度の誤差範囲内で一致しており、飼育実験が意図された通りのpCO₂環境下で実施された事を確認できた。

なおこれらの実験に先立ち、試験場の原海水にペニシリンGカリウムとストレプトマイシン硫酸塩をそれぞれ単独で、あるいは混合して加えた場合のDICとアルカリ度の変化を測定し、変態率測定止水実験に使用する抗生物質の炭酸系への影響を評価した。この結果、ストレプトマイシン硫酸塩はDICを僅かに減少させるだけであるのに対して、ペニシリンGカリウムは60単位（=37.5 µg/ml又は100 µM）あたり10 µmol/kgの大きなアルカリ度低下を引き起こすことが判明した。これはDICが一定の場合、室温下で30-40 ppmのpCO₂低下に相当する。この結果を基に、本課題の変態率測定ではペニシリンは使用せず、全てストレプトマイシンのみを抗生物質として使用している。

（2）エゾアワビ初期幼生

1) 親貝の飼育と採卵

実験に用いた卵および浮遊幼生（図2）は、宮城県石巻市泊浜地先で採集し、その後東北水研（宮城県塩釜市）内の流水水槽で飼育した殻長90 mm以上の成貝等から得た。これらの成貝は、実験開始までクボタ社製のFRP製角型水槽

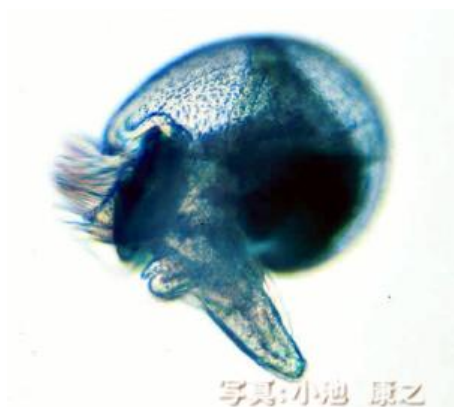


図2 実験に用いたエゾアワビのトロコフォア幼生（上）、ベリジャー幼生（中）と飼育チャンバー（下）。

(V-タンク、518 L) で雌雄別に飼育されていたものである。餌には乾燥マコブを使用し、常に飽食させた。エゾアワビの成熟は水温の上昇に伴って進行するため、実験開始時に生殖巣が充分発達するように飼育水温を調整した。なお、実験開始時の飼育水温は20℃であった。産卵・放精の誘発は菊地・浮⁸⁾の紫外線照射海水を用いた方法にしたがった。雌雄別に1個体ごとに紫外線照射海水が流入する遮光した20 Lの角型水槽に收容した。産卵・放精が認められてから(通常誘発開始から2-3時間後)、紫外線照射海水の流入を止め、実験に供するまで1-2時間静置した。

2) 実験の概要

異なる二酸化炭素濃度下で2回の実験を行った(2008_Exp 1、2)。2008_Exp 1では、CO₂調整海洋生物飼育装置により二酸化炭素濃度が450、650、850、1050 ppmとなるように設定して得られた飼育海水を用いて実施し(近未来影響評価)、2008_Exp 2では、二酸化炭素濃度設定値を450、500、1100、1650、2150 ppmとして生成された飼育海水を使用した(高濃度影響評価)。

二酸化炭素濃度別に飼育した個体について、受精率、孵化率、生残率、奇形率(以上止水飼育)、最大幼殻長(ふ化後流水飼育)、変態率、周口殻(親と同じ貝殻)形成率(ふ化幼生流水飼育後に止水飼育)を比較した。また、一部の幼生について幼殻の形態を走査型電子顕微鏡(scanning electron microscope、日立S-2460N、以下SEMと略記)によって観察した。

3) 飼育実験装置

エゾアワビ飼育実験装置は以下の2種類を用いた。①pCO₂調整海水を止水飼育で用いるふ化率等や変態率の測定においては300 ml透明プラスチックサンプル瓶を用いた。泡立てないように調整海水を入れ卵や幼生を入れた後蓋をして20℃の恒温室に入れて実験終了時まで静置し、実験終了直前にpHメーターでpHを測定した。②ふ化後変態実験に供する4日間は、φ40 mmの塩ビ製パイプの側面に穴を開けて、底面と側面を80 μmのネットでふさいで作成した飼育チャンバーを用いた(図2、内径48 mm、深さ50 mm程度)。このチャンバーを300 ml透明プラスチックサンプル瓶に入れ、その底からペリスタポンプ用貯水槽(10L)に一旦貯留したpCO₂調整海水をペリスタポンプにて一定量(毎分10 ml前後)送り出し、上部から海水がオーバーフローするようにした。目視では、ペリスタポンプによって対流が起こるなど強い流れは認められず、幼生はチャンバー内で緩やかに定位していた。これらの飼育チャンバーおよびペリスタポンプ用一時貯水槽は、水温20℃に設定されたウォーターバス水槽(138x65x27 cm)に入れ、pCO₂調整海水の水温差がなるべくないように維持した。

4) 受精率、孵化率の測定

産卵誘発により放出された卵を紫外線照射海水で洗浄し、洗浄海水10 mlと共に約1,000個の卵を容量300 mlのサンプル瓶に移した。サンプル瓶には、あらかじめ異なる二酸化炭素濃度で調整した海水で満たし、卵收容後に精子懸濁海水5 mlを加え受精させた。精子添加後に瓶にフタをして密閉し、20℃の恒温室に静置した。なお、1濃度区当たりの繰り返し数を3回とした。エゾアワビは20℃で飼育した場合、受精から約13時間後に孵化する⁹⁾ので、卵に精子を添加してから14-15時間後に各サンプル瓶に中性ホルマリンを3 mLずつ加えて試料を固定した。実体顕微鏡により、固定試料中の未受精卵数(a)、卵割後停止卵数(b)、孵化個体数(c)、死卵数(d)を調べ、受精率：

$(b+c)/(a+b+c-d)$ および孵化率： $c/(a+b+c-d)$ を算出した。

5) 浮遊幼生の殻長、死亡率、奇形率の測定

誘発により放出された卵を紫外線照射海水で洗浄し、洗浄海水100 mlと共に約10,000個の卵を2 L透明プラスチック製サンプル瓶に移した。異なる二酸化炭素濃度で調整した海水を卵が収容されたサンプル瓶に満たした後、精子懸濁海水50 mLを加え受精させた。精子添加後に瓶にフタをして密閉し、20°Cに調温したウォーターバスに15-16時間浸漬した。孵化したトロコフォア幼生について実体顕微鏡により形態、行動が正常な個体を選んで飼育実験に供した。幼生の代謝活動が実験海水中の二酸化炭素濃度に及ぼす影響を減じるため、上述したチャンバー中で流水飼育した。各飼育チャンバーにトロコフォア幼生を200個体ずつ収容し、1濃度区あたり5個のチャンバーを設定した。エゾアワビでは水温20°Cで孵化から約20時間後に幼殻が完成してベリジャー幼生となり、73時間後に着底・変態可能となるため⁹⁾、孵化後75時間まで幼生を流水飼育した。流水飼育後、各チャンバー中の幼生を50 %エタノールで固定し、生残個体、死亡個体、奇形個体を計数し、死亡率、奇形率を求めた。なお、奇形個体とは幼殻の形成が不完全なため、殻内に軟体部収縮して完全に引き込むことができないものを指す(図3)。これらを計数した後、チャンバー毎に固定した幼生のうち無作為に20個体(2008_Exp 1)または50個体(2008_Exp 2)を抽出し、倒立顕微鏡下で画像解析ソフト(WinRoof Ver.3、三谷商事)を用いて幼殻の最大殻長¹⁰⁾を計測した。

6) 幼殻形態の観察

前項で50 %エタノールにより固定した試料のうち、450 ppm区、1050 ppm区(2008_Exp 1)および2150ppm区(2008_Exp 2)の浮遊幼生をSEM観察に供した。観察に当たっては、試料をエタノール濃度の上昇系列によって脱水した後、試料台に接着したカーボンテープ上にエタノール中の標本を滴下して、風乾後にイオンスパッターによってプラチナを蒸着した。

7) 変態率、周口殻形成率の測定

孵化後73時間流水飼育した正常な幼生について、2008_Exp 1では50個体、2008_Exp 2では20個体を各々のチャンバーから選別し、50 mlのプラスチック製容器に二酸化炭素濃度を調整した海水(いずれも1濃度区当たり繰り返し数5)20 mlと共に収容した。なお、海水には幼生の変態を誘起するため1.5 μM の γ -アミノ酪酸と300 $\mu\text{g/ml}$ のストレプトマイシン硫酸塩を添加した。これらを20°Cの恒温室に静置し、96時間後に着底個体および周口殻形成個体の割合を実体顕微鏡により調べた。なお、変態個体とは遊泳器官である面盤が消失した個体を、周口殻形成個体とは幼殻の周辺部から

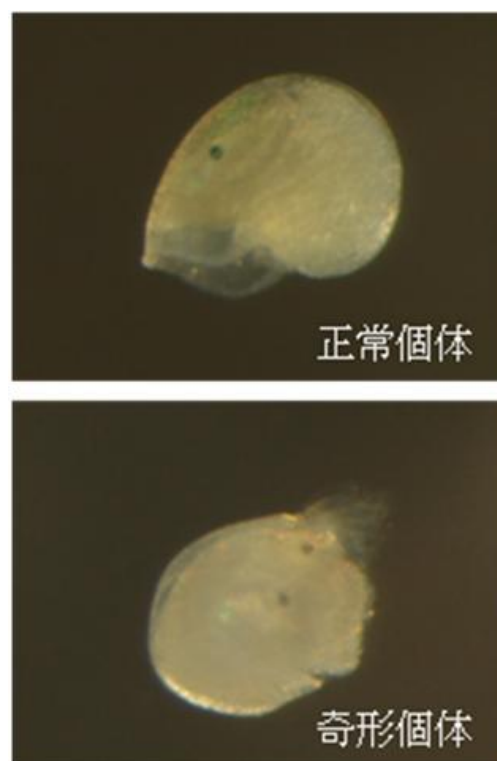


図3 エゾアワビベリジャー幼生の正常個体(上)と奇形個体(下)の実体顕微鏡写真。正常個体の幼殻最大殻長は約280 μm 。

新たな成貝型の殻(周口殻)の成長が認められた個体を指す。

(3) エゾアワビ着底初期稚貝

1) 初期稚貝の履歴

実験に用いた初期稚貝は、2008年8月に宮城県石巻市泊浜地先で採集し、その後東北水研（宮城県塩釜市）内の流水水槽で飼育した殻長90 mm以上の成貝から得た。紫外線照射海水によって産卵誘発を行い、受精卵を得た。CO₂濃度(pCO₂)が大気平衡(約450 ppm)となる海水(水温20℃)を用いて受精から変態可能な被面子幼生に発達するまで88時間飼育した。正常に発達した被面子幼生を選別し、1.5 μMのγ-アミノ酪酸と300 μg/mlのストレプトマイシン硫酸塩を添加して変態を誘起した。これら薬品の添加から96時間後に遊泳器官である面盤が消失し、初期稚貝に変態した個体を実験に用いた。

2) 実験の概要

異なるpCO₂下で2回の実験を行った(2009_Exp 1、2)。2009_Exp 1では、AICAL装置により海水中のpCO₂が大気平衡(対照区、約450 ppm)、600、800、1000、1200 ppmとなるように調整して飼育実験を行い(近未来影響評価)、2009_Exp 2では、対照区(約450 ppm)、500、1000、1500、2000 ppmとして生成された海水により飼育実験を行った(高濃度影響評価)。

各pCO₂下で初期稚貝を変態直後から44日間(2009_Exp 1)または33日間(2009_Exp 2)流水飼育した。容量50 mlのプラスチック製容器に10個体の初期稚貝を収容し、1濃度区あたり3つの容器を用いた(繰り返し数3)。容器の内面には餌料として付着珪藻*Cylindrotheca closterium*を繁茂させ、流量約10 ml/minでpCO₂を調整した海水を給水した(図4)。飼育開始時および開始後12日目に初期稚貝の最大殻長を測定し、この間の成長速度を求めた。実験終了時に殻の形態をSEMで観察した。

3) 統計解析

初期幼生、初期稚貝の実験とも、各測定項目における二酸化炭素濃度区間の平均値の差を一元配置の分散分析により検定した。受精率など比率の平均値を検定する際には、値を逆正弦変換した。分散分析で有意差が認められた場合には、Tukey-Kramer HSD testにより多重比較を行った。検定には、統計解析ソフトJMP Ver. 7(株式会社SASインスティテュートジャパン)を用いた。

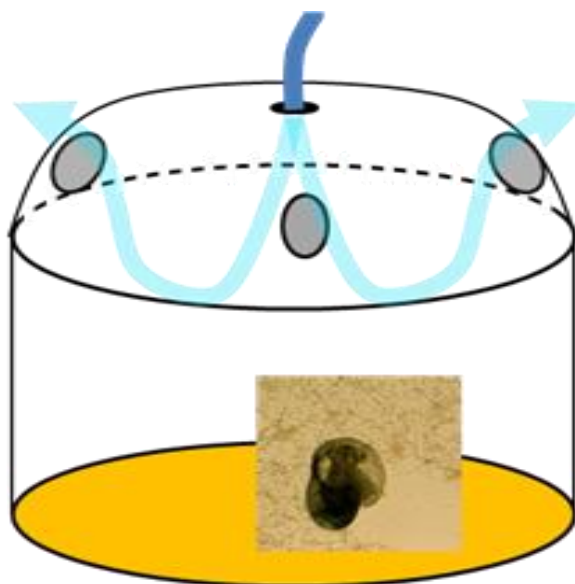


図4 初期稚貝用飼育チャンバー。模式図。内面に餌の付着珪藻を繁茂させ上部から注水しつつ実験海水に水没させている。

(4) アオリイカ

アオリイカ *Sepioteuthis lessoniana* 卵は2009年5月27日に神奈川県横須賀市長井地先のタチアマモ根本（水深5 m）で産卵直後と思われる卵塊を潜水にて採集。実験室内で5日間馴致後、卵塊を3-6房ずつ切り取り実験海水を入れた1 Lプラスチック容器（飼育チャンバー）に吊した状態で保持した（図5）。1チャンバーに収容された卵は平均 25.9 ± 3.1 個であった。



図5 チャンバー中のアオリイカ卵。卵はゼリー状物質で覆われている。

AICAL装置により海水中の pCO_2 が大気平衡（約400）, 450（対照区）, 1000, 1500, 2000 ppmとなるように調整した海水をウォーターバス中の10 L容器から、サイフォンを利用して1濃度区繰り返し3個の飼育チャンバーに輸送した。卵を入れたチャンバー水温は21-22℃を保つよう設定し、卵採集日を0日として50日間飼育した。発生途中で死亡した個体数、ふ化日、ふ化した個体数を毎日記録し、ふ化までの日数(平均加重日数)、ふ化率を算出した。ふ化した個体は同日に5 %中性ホルマリンで固定し、湿重量を測定した。



図6 サザエ4-cell期（左）とベリジャー幼生（右）

(5) サザエ（図6）

サザエ *Turbo (Batillus) cornutus* 親貝は、三浦半島西部沿岸で漁獲された殻長60-120 mmの個体を長井漁協から購入し、1ヶ月以上陸上水槽で飼育した後採卵に供した。前日から紫外線照射海水中で馴致、翌日に数度昇温させた紫外線照射海水にサザエ親貝を曝露し放卵・放精を促した。個体毎に産卵誘発刺激を与えた。産卵個体は65-75 mm。サザエふ化率測定実験には300 mlのプラスチック容器を用いた。各実験区5回の繰り返しで、容器に pCO_2 調整海水を満たし、放出された卵および希釈精子をピペットで分注し、24℃の恒温室に移した。2、24、26時間後に取り出して1 %海水中性ホルマリンで固定し、菅原・関（1994）¹¹⁾のエゾアワビ胚発育を参考に発育段階を記録（約50個体）した。また、エゾアワビと同様の方法で、ふ化幼生を2日間流水で飼育し、取り上

げたベリジャー幼生の幼殻長を測定した。

(6) pCO₂日周変動実験

AICAL装置により、海水中二酸化炭素濃度が800±400 ppm、1200±400 ppm の24時間周期で変動する実験区および800、1200 ppm、大気平衡（400 ppm前後）の一定濃度となる実験区を設定した（図7）。濃度変更は、なるべく自然界の変動に近くなるように、2時間一定値を保った後に200 ppmを変動させる階段型のプログラムとした。これらの条件下で受精後14時間のエゾアワビトロコブフォア幼生を水温20℃の流水条件下で75時間飼育した。ふ化後正常な200個体を選別してから実験チャンパーに収容し、回収できなかった個体は幼殻形成前に死亡したと仮定して計算した。飼育終了後に幼生の死亡率、奇形率および幼殻長を実験区ごとに比較した。異なる親から得られた受精卵を用いて2回の実験を行った(Batch I, II)。

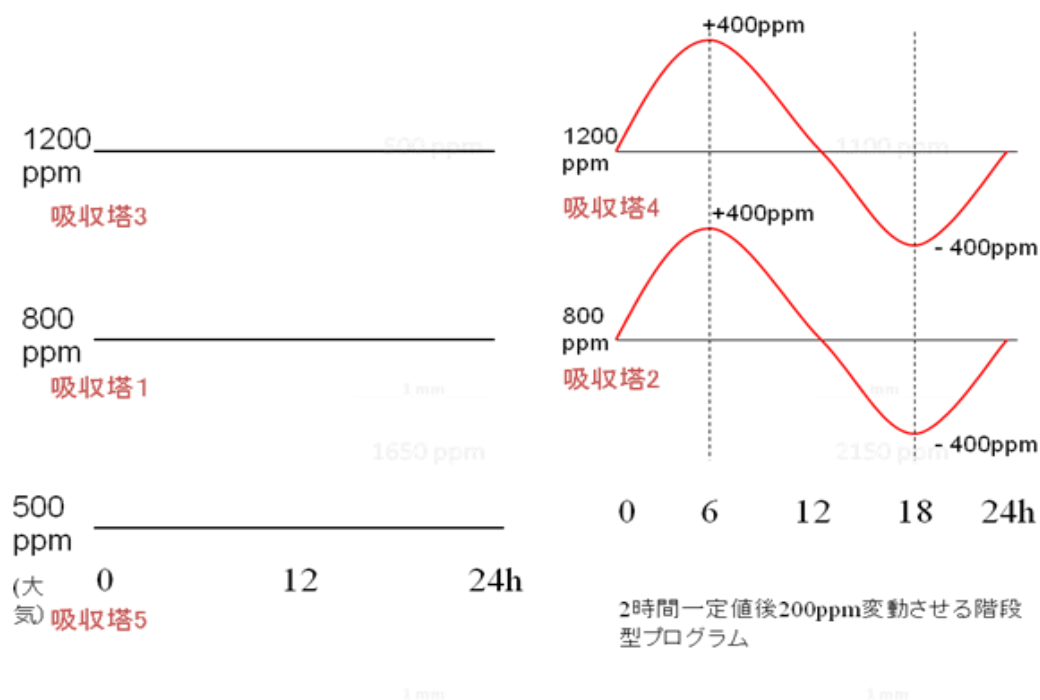


図7 AICAL装置による各実験区における二酸化炭素濃度設定値の変動パターン

4. 結果・考察

(1) エゾアワビ初期幼生

1) 受精率、孵化率（図8）

2008_Exp 1では、全ての濃度区で95 %以上の高い受精率を示し、二酸化炭素濃度の違いによる有意な差は認められなかった。2008_Exp 1の孵化率は、二酸化炭素濃度が最も低い450 ppm区で76.7 %を示し、他の濃度区(91-93%)のほうが有意に高かった。450 ppm区では、他の濃度区よりも卵数が少なかったため、相対的に精子の量が過剰となり、このことが孵化率を低下させた一因と

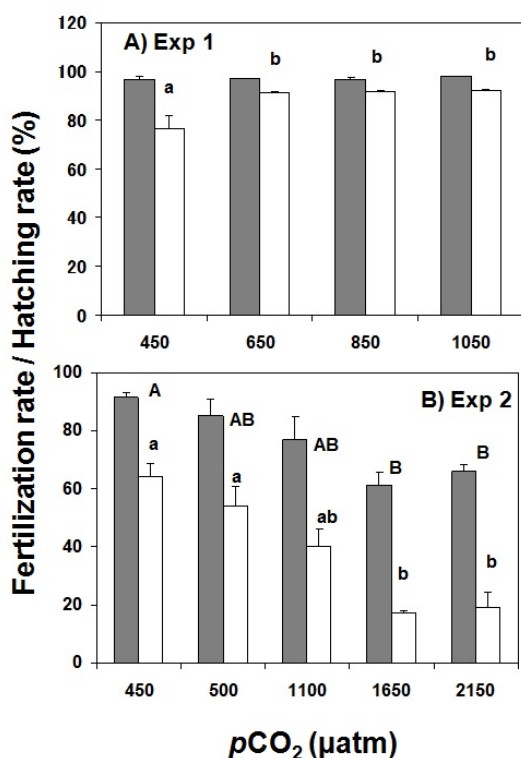


図8 エゾアワビ幼生の受精率（灰色）、ふ化率（白）、2008_Exp 1(A)と2008_Exp 2(B)。異なるアルファベットはそれらの間で有意差があること示す。

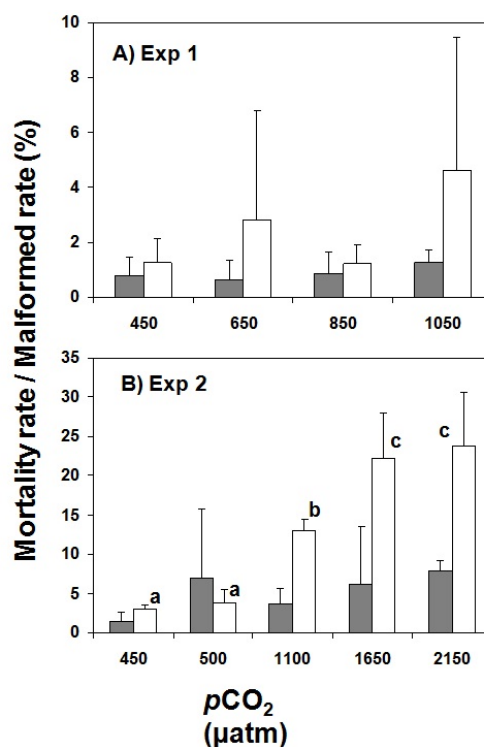


図9 エゾアワビ幼生の死亡率（灰色）、奇形率（白）、2008_Exp 1(A)と2008_Exp 2(B)。異なるアルファベットはそれらの間で有意差があること示す。

考えられる。2008_Exp 2の受精率は高濃度区で低下する傾向が認められ、1650 ppm区および2150 ppm区では、450 ppm区よりも有意に低かった($p < 0.05$)。孵化率も同様に二酸化炭素濃度の上昇に伴って減少し、1650 ppm区と2150区では450 ppm区、500 ppm区と比較して有意に低かった($p < 0.05$)。

2) 死亡率、奇形率 (図9)

死亡率は2008_Exp 1、2共に二酸化炭素濃度区間に有意な差は認められなかった。2008_Exp 1における奇形率は1050 ppm区で最も高い平均値を示したが、濃度区間に有意差は認められなかった。2008_Exp 2における奇形率は二酸化炭素濃度の上昇に伴って有意に増加した($p < 0.05$)。

3) 幼殻形成

図10に孵化から75時間後における幼殻の平均最大殻長を二酸化炭素濃度別に示した。2008_Exp 1では各濃度区の平均殻長は276 µm (1050 ppm)から283 µm (450 ppm)であり、濃度が高い実験区ほど殻長が減少する傾向が認められた($p < 0.05$)。同様の傾向は2008_Exp. 2でも認められ、1650 ppm区および2150 ppm区の平均殻長は、450ppm-1100ppm区と比較して有意に小さかった($p < 0.05$)。

孵化から75時間後の浮遊幼生について、450 ppm、1050 ppm区(Exp 1)および2150 ppm区(2008_Exp 2)で幼殻形態をSEMで観察した(図11, A-F)。殻口部を拡大してみると、1050 ppm区と2150 ppm区では殻縁辺部に損傷が認められる個体が多かった(図11, E, F)。幼殻の損傷については、SEM用試料作成時の人為的な影響によって生じた可能性が考えられるが、少なくとも450 ppm区では損傷個体が見られなかったことから、高濃度区の幼生では幼殻の構造がより脆弱であった可能性が推察される。また、2150 ppm区では他の濃度区と比較して殻縁辺部の構造が不規則になっており、薄皮状のめくれあがった殻が形成されていた(図11, F)

4) 変態率、周口殻形成率

2008_Exp 1、2共に全ての濃度区で80%以上の高い変態率を示した。周口殻形成率は2008_Exp 1では全ての濃度区で80%以上の高い値を示したのに対して、2008_Exp 2では、39-58%の低い値を示した。2008_Exp1、2共に濃度区間で周口殻形成率に有意な差は認められなかった($p>0.05$)。

以上の結果から、ふ化直後のエゾアワビ幼生について、1500 ppm pCO_2 を超える海水では受精率、ふ化率(ふ化直後)、死亡率、奇形率(幼殻の奇形を含む)、幼殻長(ふ化後75時間後)において影響があることが示された。一方で、1100 ppm pCO_2 以下の実験区では大きな影響はほとんど認められなかった。Kurihara (2008)⁷⁾の総説では、マガキとムラサキイガイでは

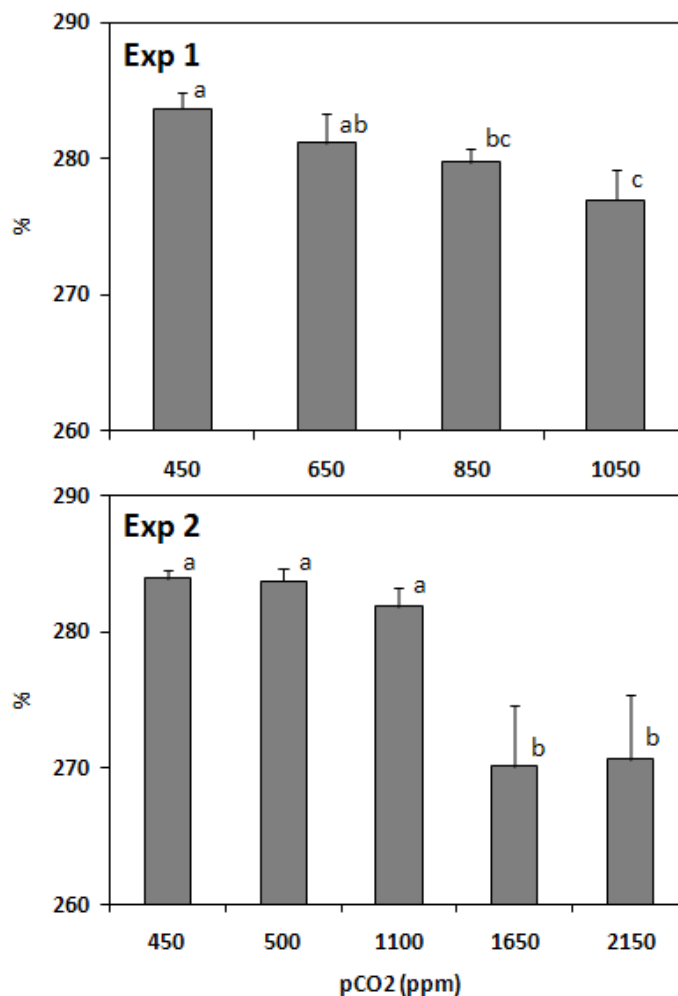


図10 異なる二酸化炭素濃度下でエゾアワビ浮遊幼生を75時間流水飼育した場合の幼殻最大殻長(平均+SD)。異なるアルファベットはそれらに有意差があることを示す。(ANOVA with Turkey-Kramer, $p<0.05$)

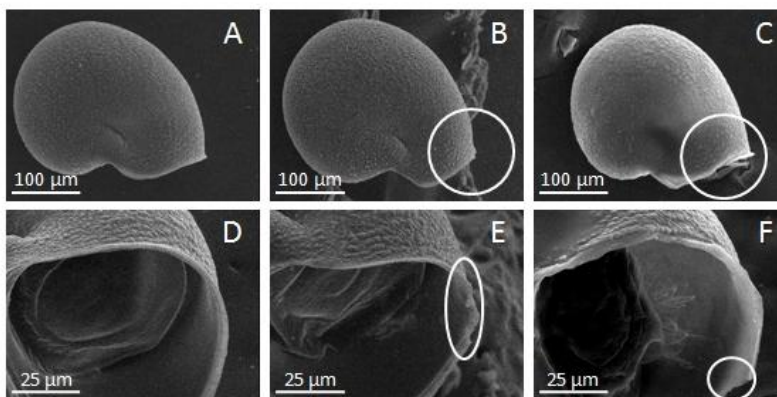


図11 二酸化炭素濃度450 ppm区、1050 ppm区、2150 ppm区で75時間流水飼育したエゾアワビバリエーション幼生の走査型電子顕微鏡写真。幼殻向頂側の全体像(A, B, C)および殻口部(D, E, F)を示す。

2000 ppm pCO₂ (pH7.4)でも受精率に影響はなかったが、殻形成についてマガキでは1000 ppmで奇形が出る、2000 ppmでは殻形成がうまくいかないことを報告している。また、イガイでは2000 ppmでサイズ減少が20 %に加えて殻の奇形が起こることが報告されている¹²⁾。今回のエゾアワビでの結果は、過去に得られた二枚貝のふ化率や奇形率の結果^{7), 12), 13)}と不整合はなく、ふ化直後数日間の危機的な値として、1500 ppm前後の評価が重要になってくる可能性を示唆している。今回の実験で用いた海水のアラゴナイト飽和度 Ω を計算すると、後述するように1000-1500 ppmの間で $\Omega=1$ になっており、1以下になると影響が現れることが推測される。変態率についてpCO₂濃度が高くなっても対照区と比べあまり変わらなかったことは、巻貝では変態期直前以降は高pCO₂環境への感受性が変わることを示しているのかもしれない。今後さらに実験を進めて明らかにすべき項目である。

(2) エゾアワビ着底稚貝

飼育実験開始から12日間の成長速度について、2009_Exp 1では、450~1200 ppmのpCO₂間で飼育された初期稚貝には、成長速度に有意な差が認められなかった。2009_Exp 2では、1500 ppmでの成長速度は対照区の450 ppmと比較して有意に低く、2000 ppmでは他のすべての濃度区と比較して最も低い成長速度を示した。なお、2009_Exp 1では全濃度区で2009_Exp 2よりも成長速度が低かったが、これは、両実験で飼育水温が異なったことが一因として

あげられる(2009_Exp 1 平均 : 18.7 °C、範囲 : 16.3-20.4 °C、

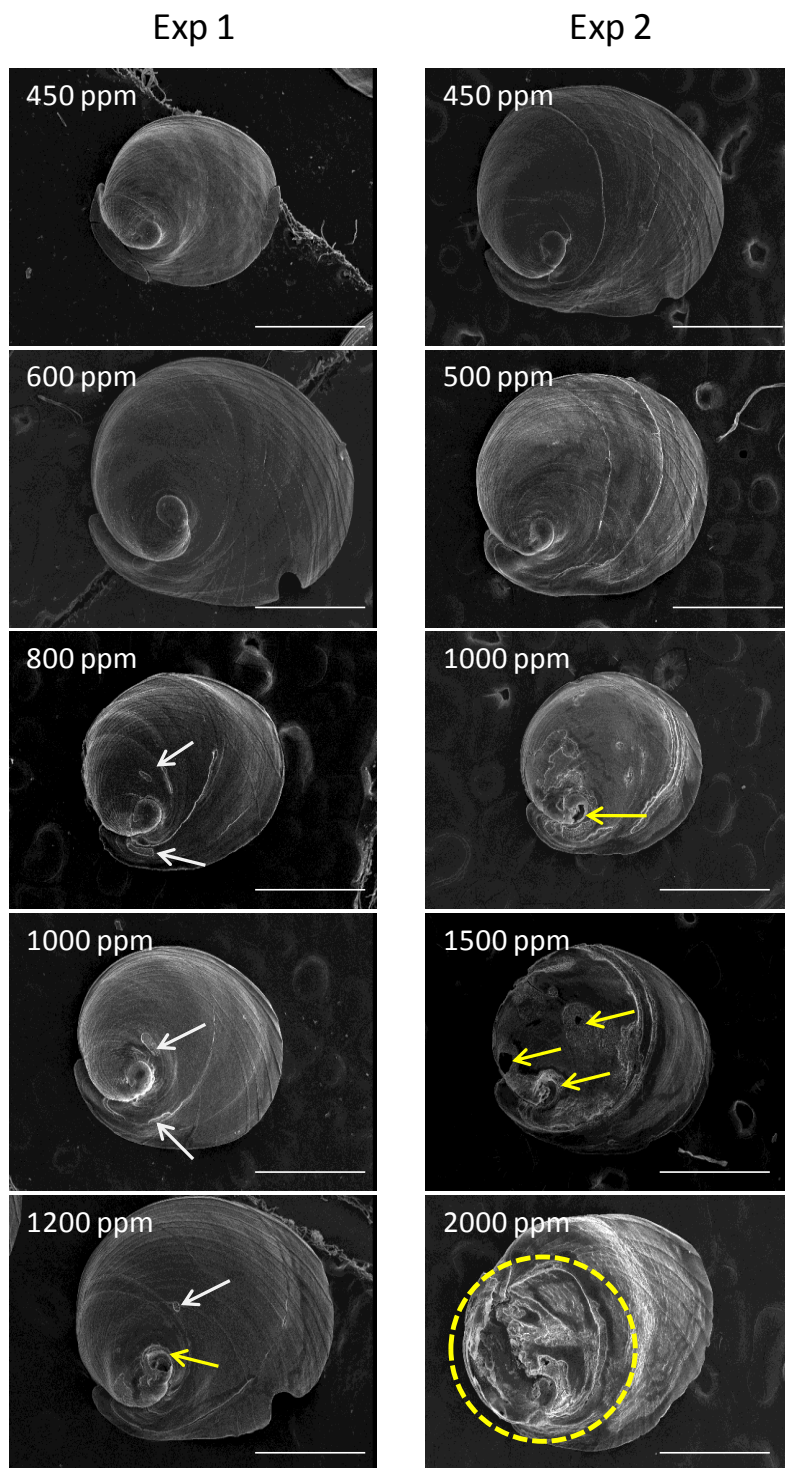


図 12 異なる pCO₂ 下でエゾアワビ初期稚貝を変態直後から 44 日間(Exp 1)または 33 日間(Exp 2)飼育した場合の殻の電子顕微鏡像。

2009_Exp 2 平均：21.5°C、範囲：20.3-22.3°C)。いずれの実験においても、これまでに報告されている好適な餌条件で飼育した場合の平均的なエゾアワビ初期稚貝成長速度と同等あるいはそれ以上の結果となった¹⁴⁾。

2009_Exp 1、2共に、実験開始2週間後から飼育容器内に多種の微細藻類が混入し、設定した濃度区間で容器内の餌料環境を一定に保つことが困難となった。微細藻類は種によってエゾアワビ初期稚貝に対する餌料価値が大きく異なるため¹⁴⁾、2週間以降では海水中CO₂濃度の違いが初期稚貝の成長に与える影響を評価することができなかった。

初期稚貝を変態直後から44日間(2009_Exp 1)または33日間(2009_Exp 2)飼育し、殻表面をSEMで観察した(図12)。2009_Exp 1、2の観察結果を集約すると、pCO₂が600 ppm以下では正常に殻が形成されるが、800 ppm以上になると、貝殻外層が部分的に剥離したような跡が認められた(白矢印)。1000-1500 ppmになると貝殻表面に穴が認められるようになり(黄矢印)、2000 ppmでは着底後の比較的初期に形成された殻が溶解し大部分が失われていた(点線範囲内)。

pCO₂が1200 ppm以下では殻の成長速度に有意差が認められなかったので、少なくとも上記濃度内では殻が伸張する方向の形成速度には影響しないと考えられる。成長速度が有意に低下した1500および2000 ppm区においても、縁辺部には新たな殻が形成されており、この部位には殻が溶解した痕跡が認められなかった。したがって、1500 ppm以上で見られた成長速度の低下は、殻の溶解によるものではなく、形成速度が低下したことによると考えられる。

変態後に幼殻縁辺から形成される周口殻について、変態後5~6日目のエゾアワビでは殻層を構成する結晶はアラゴナイトであることが報告されている¹⁵⁾。また、同じアワビ類であるセイヨウトコブシ(*Haliotis tuberculata*)1歳貝の殻についても、その真珠層はアラゴナイトの単結晶である¹⁶⁾。したがって、本研究で対象としたエゾアワビ初期稚貝の殻はアラゴナイトで構成されていた可能性が高い。初期稚貝を800 ppmで飼育した場合には貝殻外層に異常が認められた。このときのアラゴナイト飽和度は1.46であり、また殻が部分的に溶解し穴が開いていた1500 ppmでは1.02、殻の溶解が著しかった2000 ppmでは0.77であった。これらのことから、エゾアワビ初期稚貝ではアラゴナイト飽和度が1を下回らなくても800 ppm程度のpCO₂で貝殻外層に影響が出始める可能性が高いことが示唆された。

(3) アオリイカ

アオリイカ卵の46日間の高pCO₂曝露実験期間中、数時間から最大10時間程度のCO₂濃度調整装置の停止が6-8回発生したが、ほぼ全期間にわたって設定濃度のpCO₂を保っていた。設定値より200 ppm以上低下した場合をエラーと見なしエラー値を除去したpCO₂値の平均値およ

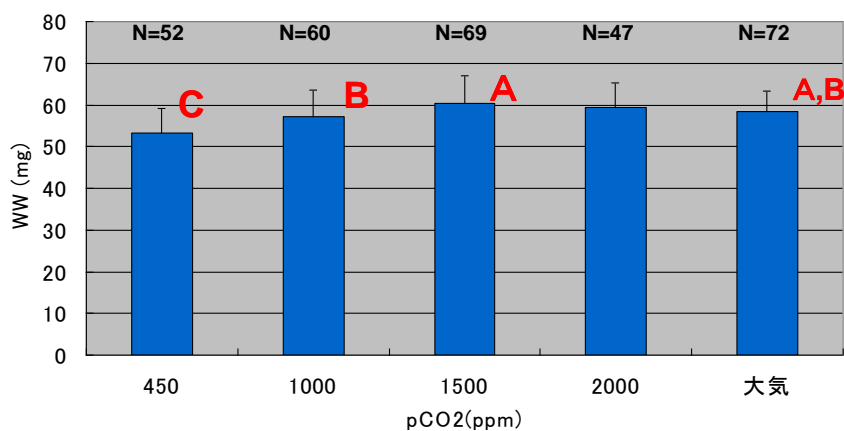


図13 異なるpCO₂実験区からふ化したアオリイカ幼生のふ化時湿重量、異なるアルファベットは有意差を示す(ANOVA, p<0.05)。

びSDは、 438 ± 25 ppm(設定値450 ppm、以下同じ)、 976 ± 22 ppm (1000)、 1527 ± 17 ppm (1500)、 2065 ± 17 ppm (2000)、 413 ± 33 ppm (大気平衡)であった。ただし、週2回の頻度で実験チャンバーから直接採水して $p\text{CO}_2$ を確認した結果は、上記設定濃度より高めで推移していた。実験期間中の飼育チャンバー水温は概ね $20.5\text{-}22.0^\circ\text{C}$ で変動し、 CO_2 濃度調整装置の水温と概ね $1.0\text{-}1.5^\circ\text{C}$ 以内で推移した。

アオリイカのふ化は7月1日(35 d)から始まり7月14日(48 d)まで継続し、1日最大12個体ふ化した。ふ化までの平均日数は対照区41.2に対し実験区は40.4-42.2で有意差はなかった。平均ふ化率も対照区87 %に対し実験区87-100 %で有意差はなかった。ふ化した日のアオリイカ幼生湿重量(mg)は、7月1日(35 d)から5日(39 d)にかけて増加し、その後平均55 mg前後で推移した。そこで、ふ化幼生の重量が一定レベルで推移した期間(39 d-46 d)の期間にふ化した幼生重量の平均値を $p\text{CO}_2$ 実験区毎に比較した(図13)。

その結果、対照450 ppm区(平均 53.2 ± 6.0)と1500 ppm区(平均 60.4 ± 6.6)で有意差が認められたが、大気平衡区(平均 58.5 ± 4.7)と1500 ppm区では有意差はなく、全体として大きな差はないと考えられた(ANOVA, Turkey-Kramer HDS検定)。

イカ類についてはその生理的特性から $p\text{CO}_2$ 上昇に対して感受性が高い¹⁷⁾という報告がある一方で、アオリイカの稚魚は非常に $p\text{CO}_2$ 高濃度に強いという報告もある¹⁸⁾。吉川(2004)¹⁹⁾は、魚類の卵割期は仔稚魚期に比べて高 $p\text{CO}_2$ 環境に弱く、24時間曝露試験のLC50がマダイ、シロギスなどで仔魚期に3-5 % CO_2 であるのに対し、卵割期は1.3-2.8 % CO_2 (=13000-28000 ppm)であり、アオリイカ稚魚はそれらより強くLC50=5.9 % CO_2 と報告している。アオリイカの卵期も稚魚期より弱い可能性が考えられたが、今回発生初期と考えられるアオリイカ卵を海洋酸性化影響のレベルで調べたが、この曝露レベルでは、少なくとも生残やふ化率に大きな影響はないと考えられた。

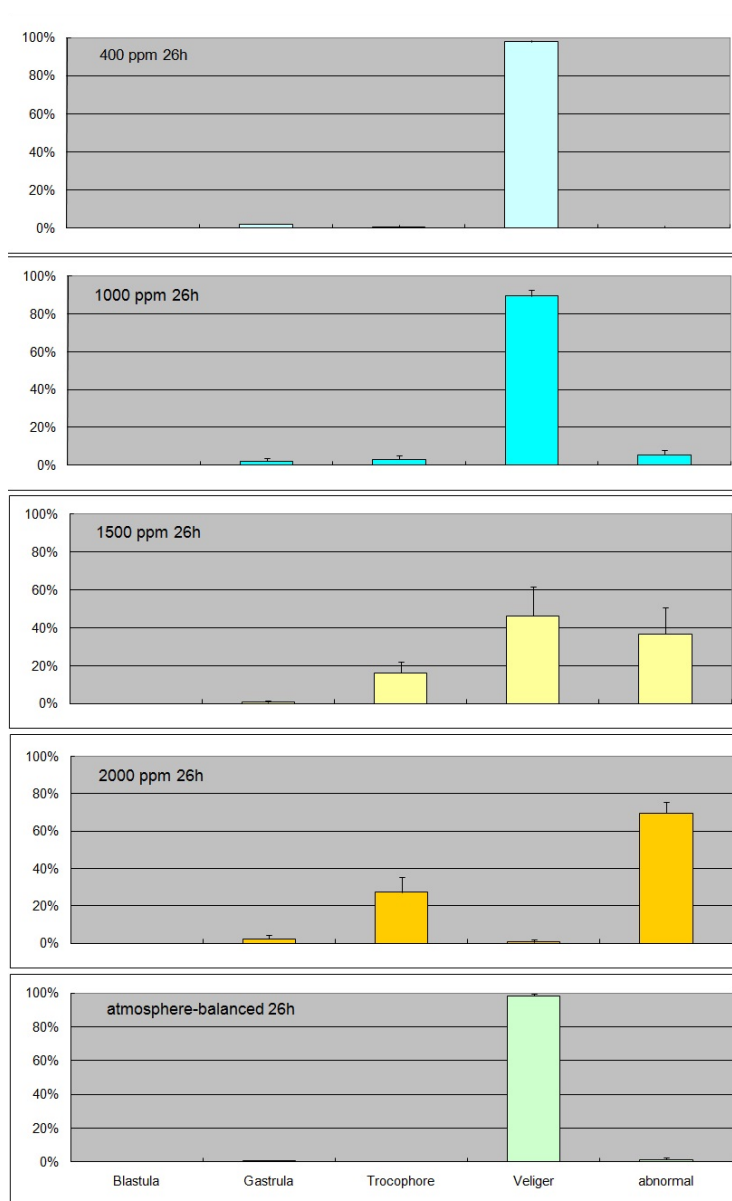


図14 サザエ受精後26時間後の発育段階、横軸は左からBlastula, Gastrula、トロコフォア幼生、ベリジャー幼生、奇形ふ化個体、を示す。

(4) サザエ

サザエ卵では、受精後2時間後に対照区および大気平衡区では4細胞と8細胞期にある割合が75%前後であるが、1000 ppm以上では8細胞期がほとんど無く、4細胞期にあるものが0-45%で、対照区と比べ1500 ppm以上では有意に低くなっていた(ANOVA, $p < 0.05$)。つまり、卵発生の進行遅れが認められた。24時間後の正常ふ化率(トロコフォア幼生+ベリジャー幼生)でも対照区の約40%に比べ、1500

ppm以上ではほとんどふ化が無く、割合は有意に低くなっていた($p < 0.05$)。受精後26時間でも同様の傾向があり、全ての試験区でほぼ全数がふ化したものの、ベリジャー幼生に到達した割合および正常ふ化率で対照区に比べ1500 ppm以上では有意に低くなっていた($p < 0.05$ 、図14)。ふ化後48時間流水飼育したベリジャー幼生の殻長は、対照区の平均288 μm 、大気平衡区289 μm であったのに比べ、1000, 1500, 2000 ppmで徐々に小さくなり、2000 ppmでは253 μm と有意に減少した($p < 0.05$ 、図15)。

受精後2hの実験海水曝露では1000 ppm以上で卵進行が遅れる。しかし、1000 ppmでは進行が遅れてもその後大半が正常にふ化する。一方、1500 ppm以上では、進行遅れに加えふ化後の奇形割合が非常に高い。ふ化そのものだけは2000 ppmでもふ化まで進む(奇形含む)。予想に反して、4卵や8卵段階の途中で発生が止まる卵は少なかった。既報のマガキ¹³⁾、ムラサキイガイ¹²⁾の卵発生では、2000ppm曝露でも囊胚期まで発生速度に差が認められない。これら二枚貝に比べサザエではより感受性が高い可能性がある。

(5) pCO₂日周変動の影響

Batch Iでは、死亡率には実験区間で有意な差は認められなかったが、奇形率は1000 ppmを一時的に超える800 \pm 400 ppm (400~1200 ppm)区、および1200 \pm 400 ppm (800~1600 ppm)区と1200 ppm一定区で対照の大気平衡区(450 ppm)より有意に増加した。幼殻長は1200 \pm 400 ppm (800~1600 ppm)区と1200 ppm一定区で対照の大気平衡区と比較し有意差が認められた(図16)。Batch IIでは、Batch Iと比較してより高濃度の実験区で影響が認められ、奇形率では1200 \pm 400 ppm区と1200 ppm一定区で、幼殻長では1200 \pm 400 ppm区で対照区(450 ppm)と比較して有意差が認められた(図17)。

これらのことから、親によって二酸化炭素濃度に対する感受性が異なるが、日周変動を有する実験区では、いずれも二酸化炭素濃度の平均値よりも最大値が影響することが示唆された。

この結果は、大気CO₂濃度の閾値議論に大きく影響する重要な影響評価結果であるため、今後早急に知見を重ねる必要がある。

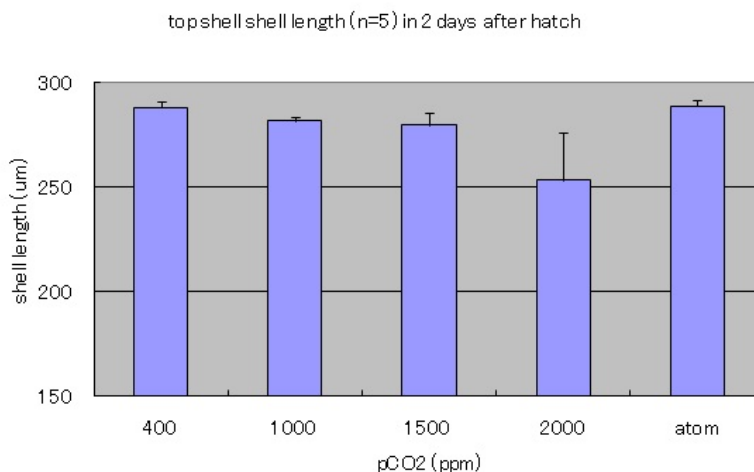


図15 ふ化後48時間流水飼育したサザエベリジャー幼生の殻長(μm)。横軸はpCO₂実験区を示す。

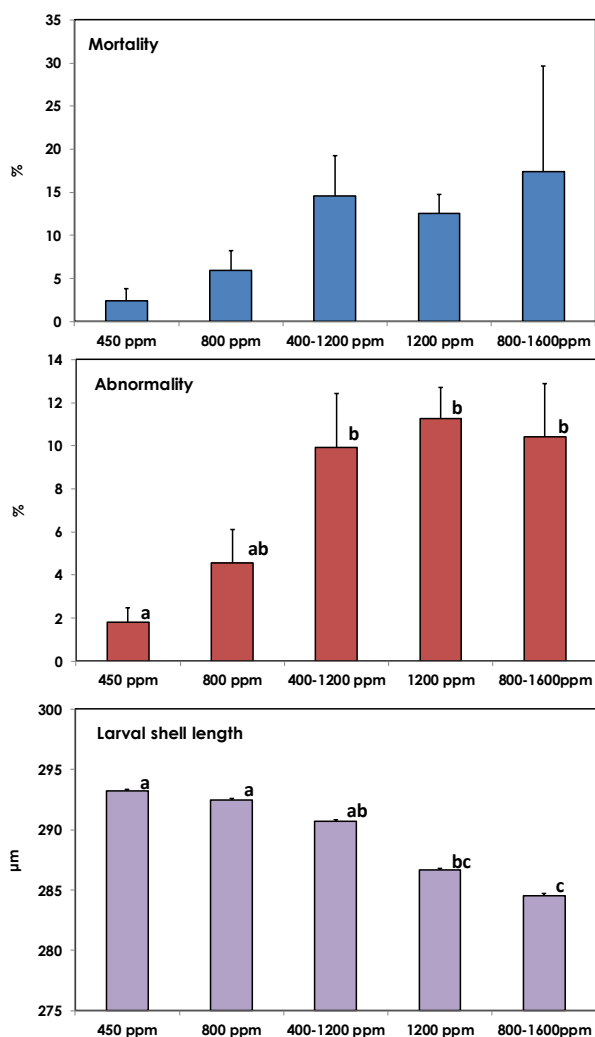


図16 pCO₂の日周変動がエゾアワビ幼生の死亡・奇形率・幼殻長に及ぼす影響 (Batch I)。異なるアルファベットは有意差を示す(ANOVA, p<0.05)。

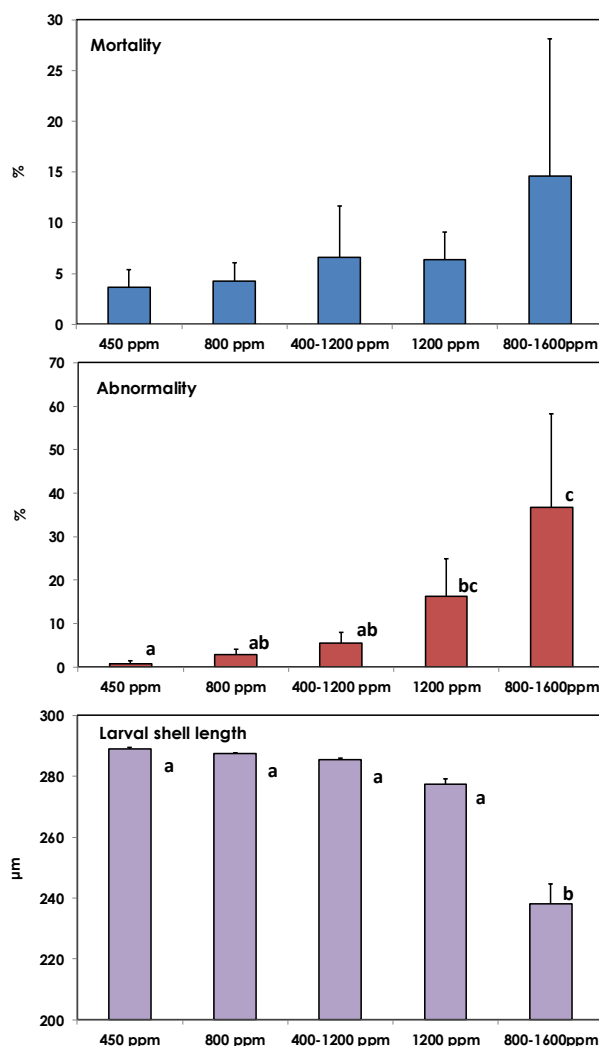


図17 pCO₂の日周変動がエゾアワビ幼生の死亡・奇形率・幼殻長に及ぼす影響 (Batch II)。異なるアルファベットは有意差を示す(ANOVA, p<0.05)。

(6) pCO₂の精度保持

塩釜、荒崎における各培養実験にて、一次貯水槽、飼育チャンバーのDICとアルカリ度の値を測定し、培養実験系中のpCO₂を事後的に確認した。アルカリ度とDICからのpCO₂算出値は、特に高pCO₂の場合にはアルカリ度の測定誤差によって大きな系統誤差を発生する可能性がある。このため、一次貯水槽、飼育チャンバーからの採水と同時に二酸化炭素濃度調整装置そのものからの採水も実施し、二酸化炭素濃度調整装置におけるアルカリ度・DICからのpCO₂算出値とpCO₂実測値とを用いて、全pCO₂算出値の絶対値補正を行う事とした(図18)。この処置により、一次貯水槽、飼育チャンバーにおけるpCO₂算出値の確度が飛躍的に向上した。

またCO₂濃度調整装置のpCO₂算出値と一次水槽・チャンバーにおけるpCO₂算出値との差を検討した。CO₂濃度調整装置から海水がチャンバーに導入されるまでの間の生物影響(配管中の付着ケイ藻類によるpCO₂低下、またはバクテリアによるpCO₂増加)によるpCO₂変動が、アオリイカ卵など長期飼育中の容器交換が困難な場合には、設定値より50 ppm以上大きくなる場合があり、チャンバーpCO₂値のばらつきを発生させている事が確認された。しかし多くの場合、飼育チャンバーとCO₂濃度調整装置間のpCO₂差は平均で±50 ppm程度に収まっており、培養実験のpCO₂管理は概ね良好に維持されていた。

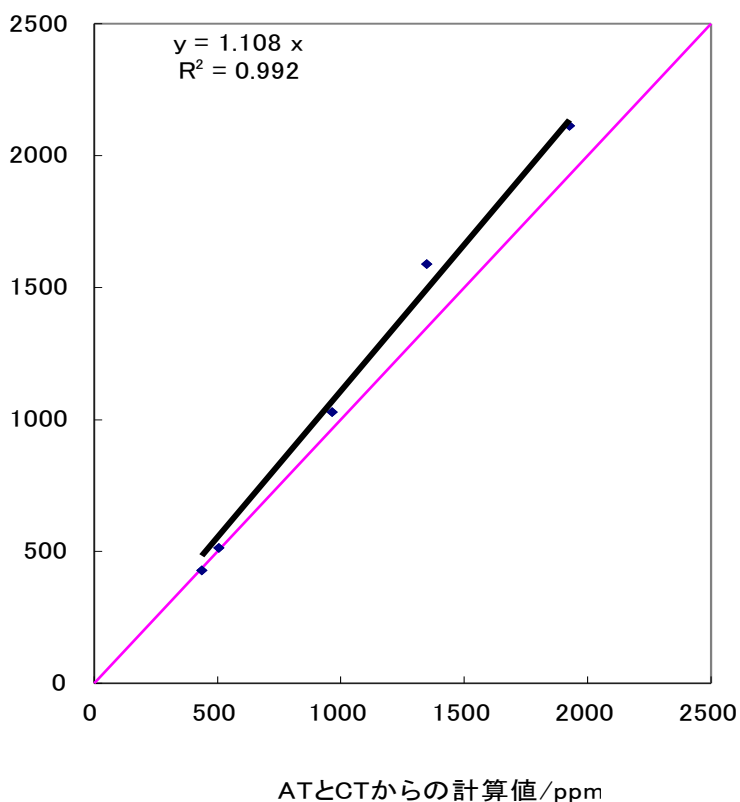


図18 ある培養実験時における、二酸化炭素濃度調整装置各吸収塔のpCO₂計算値(横軸)と実測値(縦軸)との比較例。各培養実験においてこのような検量線を作成し、一次水槽、チャンバーのpCO₂算出値についても全て同じ検量線が適用できるものと仮定して、全てのpCO₂計算値を補正して使用した。アルカリ度・DICからのpCO₂算出値は低pCO₂側では実測値と非常によく一致するが、高pCO₂側では算出値が低めに出る傾向がある。

エゾアワビ初期幼生の実験時(2008_Exp 1, Exp 2)に飼育実験水を二酸化炭素濃度調整装置および定期的採水により、意図した設定濃度が保たれているかを調べた結果を表に示した(表1, 2)。Exp 1の流水実験時には、全ての実験設定値に±50 ppmの範囲で維持されていた。装置でモニターされていたpCO₂値の変動係数は3.2-4.7%であった。Exp 1の止水実験時には、450, 650 ppm区では設定値に比べ30 ppm程度の上昇を示し、さらに高い850 ppm区では設定値に比べ-110 ppm、1050 ppm区では-190 ppmを示した(表1)。Exp 2の流水実験時には、全ての実験設定値に±60 ppmの範囲で維持されていた。装置でモニターされていたpCO₂値の変動係数は0.8-1.8%であった。Exp 2の止水実験時には、500 ppm区ではExp 1と同様に設定値に比べ10 ppm程度の上昇を示し、さらに高い1050, 1650, 2150 ppm区では設定値に比べそれぞれ-70, -130, -290 ppmを示した(表2)。

表1 2008 Exp1のエゾアワビ幼生実験期間における炭酸系パラメータ値(流水および止水実験)

Parameter	Measurement condition*	2008_Exp 1 (Dec. 8 - Dec. 12, 2008)				
		流水実験		2008_Exp 1 (Dec. 8 - Dec. 12, 2008)		
Target pCO ₂ (μatm)		450	650	850	1050	大気平衡
mean pCO ₂ (μatm)	m	486.0	637.6	833.0	1006.2	463.8
sd		23.2	26.9	29.3	32.0	19.5
mean pCO ₂ (μatm)	co	495.6	638.5	784.7	888.1	439.5
sd		23.7	36.9	44.8	67.1	34.7
mean DIC (μmol/kg)	pc	1929.7	1971.0	2000.6	2017.0	1911.3
sd		5.2	6.1	6.0	7.5	9.4
mean TA (μmol/kg)	pc	2102.9	2107.0	2108.2	2108.5	2104.4
sd		7.4	10.7	8.5	11.6	7.9
mean pH	co	7.94	7.84	7.76	7.71	7.98
sd		0.02	0.02	0.02	0.03	0.03
mean Aragonite saturation	co	2.05	1.70	1.44	1.31	2.24
sd		0.09	0.10	0.08	0.09	0.15
mean temperature (°C)	pc	20.2	20.1	20.2	20.3	20.3
sd		0.14	0.12	0.13	0.12	0.12
mean salinity	pc	31	31	31	31	31
		止水実験		2008_Exp 1 (Dec. 8 - Dec. 9, 2008)		
Target pCO ₂ (μatm)		450	650	850	1050	大気平衡
pCO ₂ (μatm)	co	479.3	658.0	739.6	859.4	405.6
DIC (μmol/kg)	pc	1955.3	1990.6	2008.1	2023.8	1910.6
TA (μmol/kg)	pc	2138.4	2123.7	2125.1	2120.2	2118.3
pH	co	7.96	7.83	7.79	7.73	8.01

* m: AICAL 装置によるモニタリング, pc: 定期的な採水・測定による, co: "CO₂sys" ソフトを用いて DICと TA測定値から算出

流水実験では、Exp 1, Exp 2の設定値最大区をのぞくと、ほぼ全ての実験区でダミーチャンバーから採水した値は、二酸化炭素濃度調整装置でモニターしたpCO₂値と同様なレベルを維持していた(設定値の約92%)。止水実験の終了時のpCO₂値は、Exp 1の850および1050 ppm区とExp 2の1650および2150 ppm区では期待した設定値より低かったが、二酸化炭素濃度調整装置でモニターした値に比べると85-89%の値を保っており、それぞれの実験区を明確に区別できるだけ分離していた。これらの測定の結果は、流水飼育、止水飼育実験とも、全ての飼育チャンバーで、二酸化炭素濃度調整装置で記録された値の±50-100 ppmの範囲に保たれていたことを示している。

流水実験中のアラゴナイト飽和度も同様に表1と表2に示した。pCO₂値を高めた実験区での飽和度は、650 ppm区の1.70から2150 ppm区の0.69の範囲であった。一方、対照区の海水(pCO₂ 428 - 513 ppm)での飽和度は、2.05 - 2.48であった。化学的に炭酸カルシウム結晶が作りにくい飽和度=1.0に注目すると、この値に近かったのは、二酸化炭素濃度調整装置モニター値で1029 ppmであった1100 ppm区の1.25と、同じくモニター値で1590 ppmであった1650 ppm区の0.84であった。したがって、pCO₂値で1029と1590 ppmの間に飽和度1.0があると予想された。

表2 2008 Exp2のエゾアワビ幼生実験期間における炭酸系パラメータ値(流水および止水実験)

Parameter	Measurement condition*	2008_Exp 2 (Mar. 23- Mar. 27, 2009)				
		流水実験		2008_Exp 2 (Mar. 23- Mar. 27, 2009)		
Target pCO ₂ (µatm)		500	1100	1650	2150	大気平衡
mean pCO ₂ (µatm)	m	512.5	1029.6	1589.5	2113.3	428.1
sd		9.2	13.5	13.0	19.7	5.9
mean pCO ₂ (µatm)	co	511.8	996.3	1592.4	1955.1	413.6
sd		10.4	26.2	119.2	36.7	8.3
mean DIC (µmol/kg)	pc	2028.9	2126.7	2181.2	2209.6	1997.5
sd		4.1	4.2	8.3	6.7	3.0
mean TA (µmol/kg)	pc	2208.3	2209.4	2205.0	2208.0	2213.7
sd		1.3	1.9	1.9	4.6	6.2
mean pH	co	7.94	7.68	7.49	7.41	8.02
sd		0.01	0.01	0.03	0.01	0.01
mean Aragonite saturation	co	2.12	1.25	0.84	0.69	2.48
sd		0.03	0.03	0.06	0.01	0.05
mean temperature (°C)	pc	19.0	18.8	19.0	19.1	19.2
sd		0.22	0.25	0.22	0.28	0.27
mean salinity	pc	32	32	32	32	32
止水実験 2008_Exp 2 (Mar. 23 - Mar. 24, 2009)						
Target pCO ₂ (µatm)		500	1100	1650	2150	大気平衡
pCO ₂ (µatm)	co	510.1	981.8	1418.2	1858.6	407.7
DIC (µmol/kg)	pc	2023.4	2116.6	2164.5	2197.9	1985.7
TA (µmol/kg)	pc	2202.5	2200.4	2202.0	2202.3	2202.6
pH	co	7.94	7.68	7.54	7.43	8.02

* m: AICAL 装置によるモニタリング, pc: 定期的な採水・測定による, co: "CO₂sys" ソフトを用いて DICと TA測定値から算出

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

まだ世界的にも知見がほとんど無い巻貝類幼生への低pH環境による影響を評価したことは、今後この分野の研究の発展に貢献する知見である。特に、極端な高濃度CO₂によるpH低下ではなく、近未来をシミュレートした現実的な濃度での実験であり、さらに、pCO₂を日周変動させた実験結果も予備的に示せたことは、海洋酸性化影響評価研究に与える貢献は大きいと考えられる。水産学の立場からは、環境変化に対応した施策を講じる場合の基礎的知見として重要であると考えられる。

(2) 環境政策への貢献

IPCC第4次報告書で研究の緊急性が指摘されている海洋酸性化影響について、高精度な飼育装置を用いて安定した飼育結果を得たことは、2013年に予定されるIPCC第5次報告書に引用されるように本研究および今後の結果を論文として公表することにより、二酸化炭素濃度ガードレール値の設定に寄与することが期待できる。本研究で得られた結果については、国内外で活発に成果報告を行い、論文を発表した。

6. 引用文献

- 1) Caldeira K, Wickett ME (2005) Ocean model predictions of chemistry changes from carbon dioxide

- emissions to the atmosphere and ocean. *J. Geophys. Res.*, 110, C09S04, doi: 10.1029/JC002671
- 2) Caldeira K, Wickett ME (2003) Anthropogenic carbon and ocean pH. *Nature*, 425, 365- 365.
 - 3) Vezina AF, Hoegh-Guldberg O (2008) Introduction. (Theme Section: Effects of ocean acidification on marine ecosystems) *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 373, 199- 201.
 - 4) Kleypas JA, Feely RA, Fabry VJ, Langdon C, Sabine CL, Robbins LL (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.
 - 5) Gosselin LA, Qian PY (1997), Juvenile mortality in benthic marine invertebrates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 146, 265- 282.
 - 6) 渡部哲光 (1997) 「バイオミネラルリゼーション 生物が鉱物を作ることの不思議」 東海大学出版会、東京、pp.180.
 - 7) Kurihara H (2008) Effects of CO₂-driven ocean acidification on the early developmental stages of invertebrates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 373, 275- 284.
 - 8) 菊地省吾・浮 永久 (1974) アワビ属の採卵技術に関する研究 第2報 紫外線照射海水の産卵誘発効果. 東北水研報 33, 79-86.
 - 9) 関 哲夫・菅野 尚 (1977) エゾアワビの初期発生と水温による発生速度の制御. 東北水研報 38, 143-153.
 - 10) 林 育夫 (1983) 日本産アワビ類数種の前殻の形態に基づくおよび初期稚貝の同定. *Venus* 42, 49-58.
 - 11) 菅原義雄・関 哲夫(1994)1-3 エゾアワビ. pp.28-61. 野村正監修「カキ・ホタテ・アワビー生産技術と関連研究領域」野村正教授退官記念事業会、仙台、1994.
 - 12) Kurihara H, Asai T, Kato S, Ishimatsu A (2008) Effects of elevated pCO₂ on early development in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Biol.*, 4, 225- 233.
 - 13) Kurihara H, Kato S, Ishimatsu A (2007) Effects of increased seawater pCO₂ on early development of the oyster *Crassostrea gigas*. *Aquat. Biol.*, 1, 91- 98.
 - 14) Kawamura T, Roberts RD, Takami H (1998) A review of the feeding and growth of postlarval abalone. *J Shellfish Res* 17: 615-625.
 - 15) 岩田圭示 (1978) 原始腹足類エゾアワビ(*Haliotis discus hannai* INO)の前殻の石灰化機序に関する研究. 地球科学 32: 51-57.
 - 16) Jardillier E, Rousseau M, Gendron-Badou A, Fröhlich F, Smith DC, Martin M, Helléouet M-N, Huchette S, Doumenc D, Auzoux-Bordenave S (2008) A morphological and structural study of the larval shell from the abalone *Haliotis tuberculata*. *Mar Biol* 154: 735-744.
 - 17) Portner HO, Langenbuch M, Reipschlag A (2004) Biological impact of elevated ocean CO₂ concentrations: Lessons from animal physiology and earth history. *J Oceanogr* 60, 705-718.
 - 18) Kikkawa T, Watanabe Y, Katayama Y, Kita J, Ishimatsu A (2008) Acute CO₂ tolerance limits of juveniles of three marine invertebrates, *Sepia lycidas*, *Sepioteuthis lessoniana*, and *Marsupenaeus japonicus*. *Plankton Benthos Res* 3, 184-187.
 - 19) 吉川貴志(2004)二酸化炭素が海産魚卵および仔稚魚に与える影響。海生研報 7, 1-33.

7. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

8. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文（査読あり）>

- 1) Ryo Kimura, Hideki Takami, Tsuneo Ono, Toshihiro Onitsuka, and Yukihiro Nojiri: Effects of elevated pCO₂ on the early development of the commercially important gastropod, Ezo abalone *Haliotis discus hannai*. *Fisheries Oceanography*, 20, 357-366, 2011.

(2) 口頭発表（学会）

- 1) 高見秀輝、木村 量、小埜恒夫、鬼塚年弘、野尻幸宏：平成21年度日本水産学会秋季大会(2009) 「CO₂濃度の増加がエゾアワビの初期発育に及ぼす影響」
- 2) R. Kimura, H. Takami, T. Ono, T. Onitsuka, Y. Nojiri: North Pacific Marine Science Organization (PICES) Annual Meeting, Jeju, Republic of Korea (2009) “Effects of elevated pCO₂ on early development of the Ezo abalone *Haliotis discus hannai*”
- 3) 木村 量、鬼塚年弘、小埜恒夫、高見秀輝、野尻幸宏：2009年度水産海洋学会研究発表大会(2009) 「アオリイカ卵発生過程における高pCO₂環境の影響」
- 4) 木村 量、高見秀輝：日本海洋学会2010年度春季大会シンポジウム“海洋酸性化による環境影響” (2010) 「CO₂増加が水産生物幼生に及ぼす影響」
- 5) H. Takami, R. Kimura, T. Ono, T. Onitsuka, Y. Nojiri : International Symposium on Climate Change Effects on Fish and Fisheries: Forecasting Impacts, Assessing Ecosystem Responses, and Evaluating Management Strategies, Sendai. Japan (2010) “Effects of ocean acidification on the early developmental stages of Ezo abalone *Haliotis discus hannai*”
- 6) 小埜恒夫、鬼塚年弘、丹羽健太郎、黒木洋明、高見秀輝、堀井豊充、木村量：2010年海洋学会 (2010) 「なぎさ帯・地先水域における炭酸系の日周変動」
- 7) 木村量、鬼塚年弘、小埜恒夫、高見秀輝、野尻幸宏：平成22年度水産海洋学会研究発表大会 (2010) 「サザエ卵発生過程における高pCO₂環境の影響」
- 8) H.Takami, R. Kimura, T. Ono, T. Onitsuka, and Y. Nojiri: 環境省主催IPCC海洋酸性化ワークショップサイドイベント (2011) ”Impact of ocean acidification on early development of economically valuable abalone *Haliotis discus hannai*”
- 9) R. Kimura, T. Onitsuka, T. Ono, H. Takami and Y. Nojiri: 環境省主催IPCC海洋酸性化ワークショップサイドイベント (2011) “Effects of elevated pCO₂ on embryo of commercially important mollusc, oval squid *Sepioteuthis lessoniana*”

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない。

(4) シンポジウム、セミナーの開催（主催のもの）

- 1) 独) 水産総合研究センター 中央水産研究所浅海増殖部10周年記念 公開講座「荒崎で沿岸資源の維持・培養に取り組む」グローバルな気候変動と私たちの海（2009年3月14日、長井漁業協同組合魚会議室、観客60名）
- 2) 海洋の酸性化による水産重要生物の影響予測（2009年11月4日、中央水産研究所横須賀庁舎会議室、観客30名）

（5）マスコミ等への公表・報道等

- 1) 朝日新聞（2010年2月1日、全国版）
- 2) 朝日新聞（2009年9月4日、全国版）

（6）その他

特に記載すべき事項はない。