

### 3. コネクティビティ

北村誠・小笠原 敬（沖縄県環境科学センター）

#### 3-1. 目的

オニヒトデ大量発生の幼生生き残り仮説を検証するためには、水質や海流、着底後の稚ヒトデ分布に関する研究のみならず、どの場所に幼生が多いのかを実際に野外で調べる研究も必要となる。そのため平成26年度からプランクトンネットによるオニヒトデ幼生の採集を行った。

平成27年8月中旬まで、沖縄島西海岸（那覇空港から名護湾）におけるヒトデ幼生の捕獲に、太平洋標準プランクトンネット（目合 60 $\mu$ m、口径 45cm、側長 180cm）を用い、一定距離（100m）を船上にて手曳きする手法を用いていた。しかしながら、各採水地点の浮遊性懸濁物質が高く、ろ布の目詰まりのため満足いくろ水量が得られなかった。特にオニヒトデ産卵期の7月は、沖縄島付近を通過する台風の影響も受け、ろ水量の顕著な低下が見られた。

したがって平成28年度は、目合を 125 $\mu$ m にした改良太平洋標準プランクトンネットを用いて調査した。また各地点でのろ水量は、船舶動力を用い 100m<sup>3</sup>（顕微鏡観察量：5m<sup>3</sup>）を基準とした。

採集されたサンプルは、昨年度と同様に実体顕微鏡による観察を行い、ヒトデ幼生の検出を行う。次に、池原ら（2012）によって報告されている簡易スクリーニング法（PCR・電気泳動）、さらに増幅した DNA 断片をシーケンスし、相同性検索により幼生がオニヒトデかどうかを決定した。

#### 3-2. 方法

##### 3-2-1. 幼生採集

沖縄島西海岸に設定した 16 地点（図 3-3-1）において、6月から8月にかけてオニヒトデ幼生を 125 サンプル採集した（表 3-3-1）。オニヒトデ幼生は、濾水計を装着した改良北太平洋標準プランクトンネット（目合 125 $\mu$ m、口径 45cm、側長 180cm）を、船舶動力によって表層水平曳きした。得られたサンプルはエタノールで速やかに固定した後、静置した。その後、上清を除き 100ml のサンプル量とし、冷蔵保管した。

表3-3-1. 幼生サンプリングの概要.

| 海域 | 地点数            | サンプリング頻度                      |
|----|----------------|-------------------------------|
| 全域 | 名護湾から那覇港まで 3地点 | 6月中旬～7月, 1回/週. 8月～9月上旬, 1回/2週 |
| 恩納 | 恩納周辺 8地点       | 6月中旬～7月, 1回/週. 8月～9月上旬, 1回/2週 |
| 砂辺 | 砂辺周辺 5地点       | 6月中旬～7月, 1回/週. 8月～9月上旬, 1回/2週 |

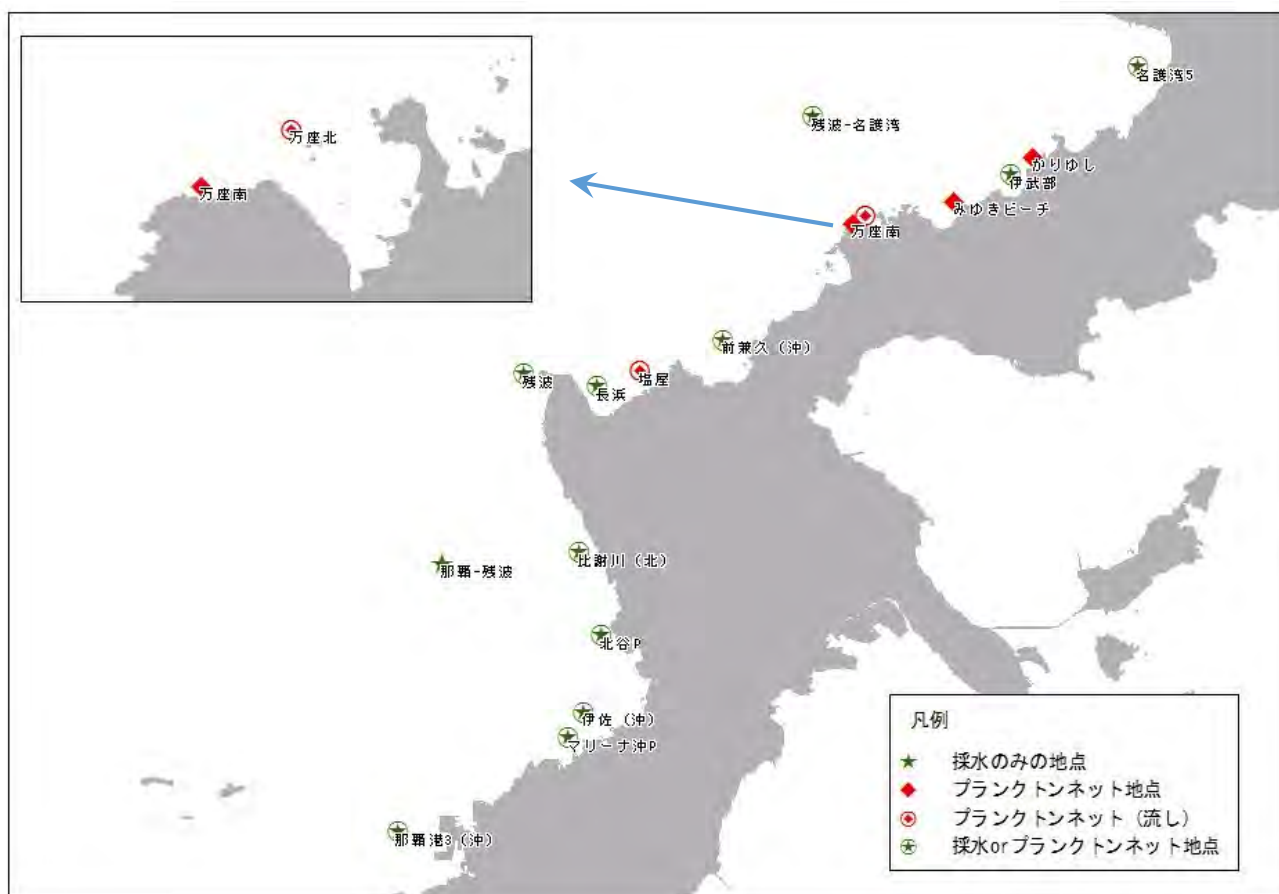


図3-3-1. 幼生サンプリング地点.

### 3-2-2. 幼生の種同定

プランクトンネットによって得たサンプル量の $5\text{m}^3$ 分を用い、実体顕微鏡によるヒトデ幼生の判定を行った。さらにこれら個別のヒトデ幼生を池原ら(2012)によって報告されている簡易スクリーニング法(PCR・電気泳動)によって、オニヒトデ特異的なDNA断片が含まれているかを調べる。さらに簡易スクリーニング方で増幅されたオニヒトデの特異的DNA領域をシーケンスし、全塩基配列の決定、BLASTによる相同性検索により幼生がオニヒトデかどうかを決定した。

### 3-3. 結果および考察

現時点(6/15~8/17)におけるろ水量は、ほぼ9割の採取地点で目標ろ水量( $100\text{m}^3$ )を越えている。また目標検鏡量( $5\text{m}^3$ )を下回った地点はない(最低ろ水量:7/20伊佐 $19\text{m}^3$ 、8/1長浜 $19\text{m}^3$ )。

実体顕微鏡による観察の結果、採集した125サンプル中25サンプル(検出率20%)でヒトデ幼生が42個体確認された(表3-3-2)。平成27年度のヒトデ幼生の検出は、211サンプル中10サンプル(検出率5%)11個体であったことを考慮すると、ろ水量とヒトデ幼生検出力は、ほぼ比例する結果となった(昨年度の幼生捕獲が成功し始めた8月中旬からの平均検鏡量は $0.9\text{m}^3$ 、本年度は $5\text{m}^3$ )。またヒトデ幼生の個体数は、ほぼ4倍となった。

表3-3-3-2. 実体顕微鏡による観察結果.

| 地点名    | Jun.                          |    |    |    |    | Jul.                           |               |    |                 |                          | Aug.                           |    |    | Jun-Aug<br>BI & BR |                   |    |
|--------|-------------------------------|----|----|----|----|--------------------------------|---------------|----|-----------------|--------------------------|--------------------------------|----|----|--------------------|-------------------|----|
|        | 19                            | 20 | 21 | 22 | 28 | 29                             | 5             | 6  | 12              | 19                       | 20                             | 21 | 26 | 27                 | 16                | 17 |
| 全<br>域 | 1 残波一名護湾                      | ND | ND | ND | ND | ND                             | ND            | ND | BR:1<br>(1000*) | ND                       | ND                             | ND | ND | ND                 | ND                | 1  |
|        | 2 名護湾                         | ND | ND | ND | ND | ND                             | ND            | ND | ND              | ND                       | ND                             | ND | ND | ND                 | ND                | 0  |
|        | 3 那覇港                         | ND | ND | ND | ND | ND                             | ND            | ND | ND              | ND                       | ND                             | ND | ND | ND                 | ND                | 4  |
| 恩<br>納 | 1 伊武部                         | ND | ND | ND | ND | ND                             | BR:1<br>(650) | ND | ND              | ND                       | ND                             | ND | ND | ND                 | ND                | 1  |
|        | 2 かりゆし                        | ND | ND | ND | ND | ND                             | ND            | ND | BI:1<br>(600)   | ND                       | ND                             | ND | ND | ND                 | ND                | 1  |
|        | 3 みゆきビーチ                      | ND | ND | ND | ND | ND                             | ND            | ND | ND              | ND                       | ND                             | ND | ND | ND                 | ND                | 0  |
|        | 4 万座北(ライン曳き)                  | ND | ND | ND | ND | ND                             | ND            | ND | BI:1(500)       | ND                       | ND                             | ND | ND | ND                 | ND                | 1  |
|        | 5 万座南                         | ND | ND | ND | ND | ND                             | ND            | ND | ND              | BR:1<br>(500**)          | ND                             | ND | ND | ND                 | BI:2(650,<br>700) | 4  |
|        | 6 前兼久                         | ND | ND | ND | ND | ND                             | ND            | ND | ND              | BI:1(900),<br>BR:1(1000) | ND                             | ND | ND | ND                 | ND                | 7  |
|        | 7 塩谷(ライン曳き)                   | ND | ND | ND | ND | ND                             | ND            | ND | ND              | ND                       | ND                             | ND | ND | ND                 | BI:1(750)         | 2  |
|        | 8 長浜                          | ND | ND | ND | ND | ND                             | ND            | ND | ND              | ND                       | ND                             | ND | ND | ND                 | ND                | 10 |
| 砂<br>辺 | 1 残波                          | ND | ND | ND | ND | ND                             | ND            | ND | ND              | ND                       | ND                             | ND | ND | ND                 | ND                | 3  |
|        | 2 比謝川                         | ND | ND | ND | ND | ND                             | ND            | ND | ND              | ND                       | ND                             | ND | ND | ND                 | ND                | 3  |
|        | 3 北谷                          | ND | ND | ND | ND | ND                             | ND            | ND | ND              | BR:1<br>(600*,**)        | ND                             | ND | ND | ND                 | ND                | 1  |
|        | 4 伊佐沖                         | ND | ND | ND | ND | ND                             | ND            | ND | ND              | ND                       | ND                             | ND | ND | ND                 | ND                | 1  |
|        | 5 マリーナ沖                       | ND | ND | ND | ND | ND                             | ND            | ND | ND              | ND                       | ND                             | ND | ND | ND                 | ND                | 2  |
| 合計     | Bipinnaria: 4 Brachiolaria: 0 |    |    |    |    | Bipinnaria: 7 Brachiolaria: 10 |               |    |                 |                          | Bipinnaria: 15 Brachiolaria: 5 |    |    | 41                 |                   |    |

Gastrolia larvae (囊胚): GA (μm), Bipinnaria larvae: BI (μm), Brachiolaria larvae: BR (μm)

\*: 1/10 check, \*\*: 基礎直径 (μm), \*\*\*: LOST

不明: 1

平成 26～28 年度 (6/15～8/17) までに採取されたヒトデ幼生の発生段階と DNA 解析による種判定の結果を表 3-3-3 に示す。

表 3-3-3. DNA 解析によるオニヒトデ幼生の判定.

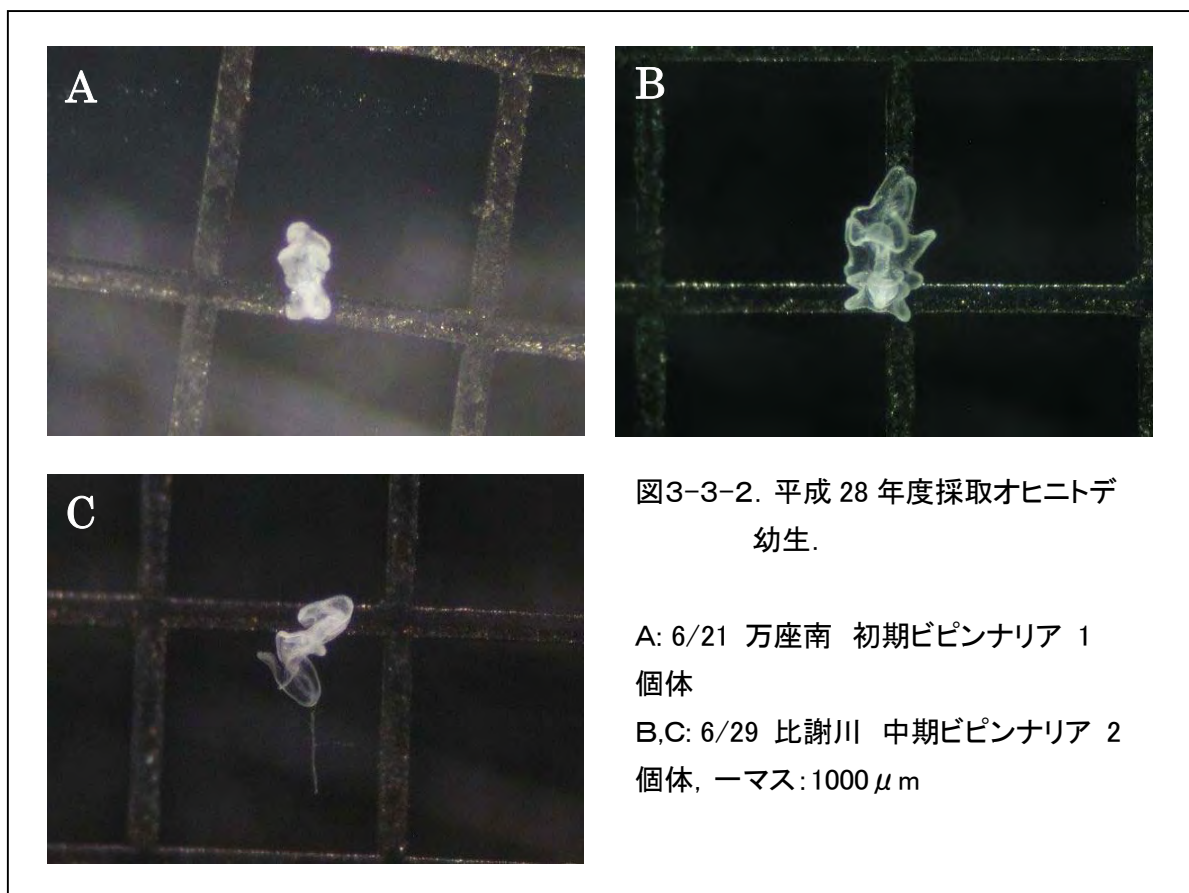
| No. | 年度  | 日付   | 地点     | 発生段階      | 体長 (μm) | 検鏡量 (m <sup>3</sup> ) | 幼生判定 | No. | 年度  | 日付   | 地点     | 発生段階      | 体長 (μm) | 検鏡量 (m <sup>3</sup> ) | 幼生判定 |
|-----|-----|------|--------|-----------|---------|-----------------------|------|-----|-----|------|--------|-----------|---------|-----------------------|------|
| 1   | H26 | 7/11 | ムーンビーチ | 囊胚        | 400     | 1.9                   | ○    | 15  | H28 | 7/19 | 長浜     | ビピンナリア    | 700     | 5.0                   | ×    |
| 2   |     | 7/11 | ムーンビーチ | ビピンナリア    | 500     | 1.9                   | ×    | 16  |     | 7/19 | 長浜     | ブラキオラリア   | 800     | 5.0                   | ×    |
| 1   | H27 | 7/21 | 前兼久(沖) | ビピンナリア    | 700     | 0.9                   | ×    | 17  |     | 7/19 | 長浜     | ブラキオラリア   | 1,000   | 5.0                   | ×    |
| 2   |     | 7/21 | 前兼久(沖) | ブラキオラリア   | 900     | 0.9                   | ×    | 18  |     | 7/20 | 北谷     | ブラキオラリア** | 600     | 5.0                   | ×    |
| 3   |     | 7/31 | 北谷P    | ブラキオラリア   | 950     | 0.9                   | ×    | 19  |     | 7/21 | 長浜     | ビピンナリア    | 1000    | 5.0                   | ×    |
| 4   |     | 8/14 | 前兼久(沖) | ブラキオラリア   | 800     | 1.2                   | ×    | 20  |     | 7/21 | 長浜     | ブラキオラリア** | 500     | 5.0                   | ×    |
| 5   |     | 8/14 | 長浜     | ブラキオラリア   | 1,100   | 0.6                   | ×    | 21  |     | 7/21 | 残波-名護湾 | ブラキオラリア*  | 1,000   | 5.0                   | ×    |
| 6   |     | 8/27 | 万座P    | ブラキオラリア   | 700     | 1.0                   | ×    | 22  |     | 8/1  | 前兼久    | ビピンナリア    | 800     | 5.0                   | ×    |
| 7   |     | 8/27 | 万座P    | ブラキオラリア   | 800     | 1.0                   | ×    | 23  |     | 8/1  | 前兼久    | ブラキオラリア   | 800     | 5.0                   | ×    |
| 8   |     | 8/27 | 長浜     | ブラキオラリア   | 800     | 0.8                   | ×    | 24  |     | 8/1  | 前兼久    | ブラキオラリア   | 1,000   | 5.0                   | ×    |
| 9   |     | 8/27 | 長浜表層   | ブラキオラリア   | 750     | 1.3                   | ×    | 25  |     | 8/1  | 前兼久    | ビピンナリア    | 900     | 5.0                   | ×    |
| 10  |     | 9/1  | マリーナ沖  | ブラキオラリア   | 1,050   | 0.3                   | ×    | 26  |     | 8/1  | 前兼久    | 不明        | 700     | 5.0                   | ×    |
| 11  |     | 9/2  | 万座P    | ビピンナリア    | 400     | 0.6                   | ×    | 27  |     | 8/1  | 長浜     | ブラキオラリア*  | 1,050   | 5.0                   | ×    |
| 12  |     | 9/2  | 前兼久表層  | ブラキオラリア   | 950     | 0.1                   | ×    | 28  |     | 8/1  | 残波     | ビピンナリア*   | 700     | 5.0                   | ×    |
| 1   | H28 | 6/21 | 万座南    | 初期ビピンナリア* | 300     | 5.0                   | ○    | 29  |     | 8/2  | 前兼久    | ビピンナリア    | 550     | 5.0                   | ×    |
| 2   |     | 6/29 | 比謝川    | 中期ビピンナリア  | 600     | 5.0                   | ○    | 30  |     | 8/2  | 長浜     | ブラキオラリア   | 1,200   | 5.0                   | —    |
| 3   |     | 6/29 | 比謝川    | 中期ビピンナリア  | 550     | 5.0                   | ○    | 31  |     | 8/2  | 長浜     | ビピンナリア*   | 700     | 5.0                   | ×    |
| 4   |     | 6/29 | 比謝川    | ビピンナリア    | 200     | 5.0                   | ×    | 32  |     | 8/16 | 万座南    | ビピンナリア    | 550     | 5.0                   | ×    |
| 5   |     | 7/5  | 伊武部    | ブラキオラリア   | 650     | 5.0                   | ×    | 33  |     | 8/16 | 万座南    | ビピンナリア    | 700     | 5.0                   | ×    |
| 6   |     | 7/5  | 長浜     | ビピンナリア    | 500     | 5.0                   | —    | 34  |     | 8/16 | 塩屋     | ビピンナリア    | 750     | 5.0                   | ×    |
| 7   |     | 7/5  | 長浜     | ブラキオラリア   | 900     | 5.0                   | ×    | 35  |     | 8/17 | 残波     | ビピンナリア    | —       | 5.0                   | —    |
| 8   |     | 7/6  | 伊佐     | ブラキオラリア   | 950     | 5.0                   | ×    | 36  |     | 8/17 | 残波     | ビピンナリア    | 700     | 5.0                   | ×    |
| 9   |     | 7/12 | 万座北    | ビピンナリア    | 500     | 5.0                   | ×    | 37  |     | 8/17 | マリーナ沖  | ブラキオラリア   | 700     | 5.0                   | ×    |
| 10  |     | 7/12 | 前兼久    | ビピンナリア    | 900     | 5.0                   | ×    | 38  |     | 8/17 | マリーナ沖  | ビピンナリア    | 550     | 5.0                   | ×    |
| 11  |     | 7/12 | 前兼久    | ブラキオラリア   | 1,000   | 5.0                   | ×    | 39  |     | 8/17 | 那覇港    | ビピンナリア    | 450     | 5.0                   | ×    |
| 12  |     | 7/12 | 塩屋     | ビピンナリア    | 750     | 5.0                   | ×    | 40  |     | 8/17 | 那覇港    | ビピンナリア    | 500     | 5.0                   | ×    |
| 13  |     | 7/19 | 万座南    | ブラキオラリア** | 500     | 5.0                   | ×    | 41  |     | 8/17 | 那覇港    | ビピンナリア    | 500     | 5.0                   | ×    |
| 14  |     | 7/19 | かりゆし   | ビピンナリア    | 600     | 5.0                   | ×    | 42  |     | 8/17 | 那覇港    | ビピンナリア    | 650     | 5.0                   | ×    |

\*: 1/10 check, \*\*: 基盤直径 (μm),

平成 26 年度の実体顕微鏡観察で確認された浮遊可能な囊胚、及び初期ビピンナリアのうち、囊胚のみオニヒトデ幼生ということが判った (ムーンビーチ 0.53 個体/m<sup>3</sup>)。平成 27 年度は、12 個体のヒトデ幼生が確認されたがどの幼生もオニヒトデではなかった。平成 28 年度は、42 個体の中で 3 個体がオニヒトデ幼生であることが判った (万座南 0.20 個体/m<sup>3</sup>【図 3-3-2 A】、比謝川 0.40 個体/m<sup>3</sup>【図 3-3-2 B、C】)。今後、各地点における残りの採取サンプル 50m<sup>3</sup> を用い、DNA 解析によるオニヒトデ幼生の検出を行う。

沖縄島におけるオニヒトデの産卵は、6 月下旬から 7 月上旬にかけて行われることが知られている。平成 26 年度は、7 月 11 日のオニヒトデ幼生の囊胚期が確認されたことにより、産卵は 7 月 10

日に行われたことが予想される。平成 28 年度は、6/21 に初期ビピンナリア幼生、6/29 に中期ビピンナリア幼生が確認されたことから、平成 28 年度の産卵は 6 月 18 日から 24 日あたりに起こったことが予想される。また 6 月 13 日時点で採集した瀬底島周辺の雌オニヒトデ（9 個体）の中で、大きく卵巣を発達させた個体は観察されず、すでに産卵が始まっていることが示唆された。これら結果より、平成 28 年度のオニヒトデの産卵は、今まで知られている産卵期より早い傾向にあったと考えている。



## 4. 幼生餌料制限

中富 伸幸（創価大学）・山本 修一（創価大学）

### 4-1. 目的

平成 28 年度は以下の 2 つの研究テーマを掲げて実施した。

- 炭素・窒素安定同位体比分析によるオニヒトデ幼生の餌起源の解明
- オニヒトデ幼生初期の餌濃度と必須脂肪酸の同化に関する研究

### 4-2. 炭素・窒素安定同位体比分析によるオニヒトデ幼生の餌起源の解明

#### 4-2-1. 背景

現在提唱されているオニヒトデ大量発生メカニズムの中で、オニヒトデの浮遊幼生期における生存率の増加が主要因である「幼生生き残り仮説」が最も有力視されている (e. g. Birkeland, 1982)。これまでナノサイズ (2-20  $\mu\text{m}$ ) の植物プランクトンがオニヒトデ幼生の主要な餌資源であると報告されている (Lucas 1982; Ayukai 1994) が、自然環境下では植物プランクトン量の指標であるクロロフィル *a* (Chl. *a*) 濃度は常時変動し、オニヒトデ幼生が生存できないと報告されている濃度 ( $<0.25 \mu\text{g L}^{-1}$ ; Fabricius et al., 2010) にしばしば低下することが知られている。それでもなお、自然環境下でオニヒトデ幼生が生き残る理由として、植物プランクトン以外にも細菌やデトリタス (以後、これらを総称して POM とする) も餌として利用する可能性が指摘されている (Olson, 1987)。そのため、オニヒトデ幼生が現場環境下において、どの有機物を餌として利用しているのかを明らかにすることは、大量発生メカニズムを理解し、効率の良いオニヒトデ対策を実施するうえで極めて重要である。

これまでオニヒトデ幼生の餌起源の推定は、主に染色法を用いて顕微鏡による胃内容物の観察によって行われてきた。しかし、サンゴ礁海域の POM の主成分であるデトリタス (生物の死骸など) や染色されない有機物粒子が含まれる場合はその評価が困難である上、幼生が濾過捕食によって胃内に取り込んだ粒子全てがそのまま同化されて成長に利用されるとは限らない。

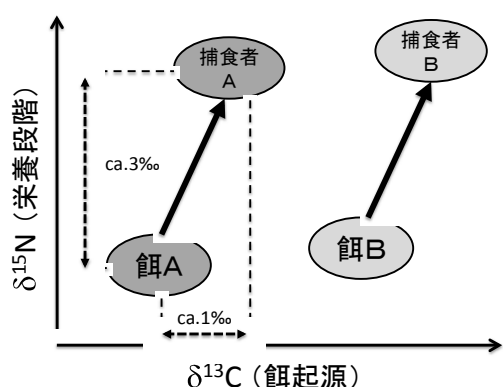
そこで 2015 年度に行った実験では、これまでの直接観察的な方法ではなく、生物体内に蓄積される化学的情報を元に餌起源を推定する「全炭素・窒素安定同位体比による解析方法 (図 3-4-1)」を応用し、表 3-6-1 に示したような実験区を設けてオニヒトデ幼生の培養実験を行った。それぞれの実験区は、Control: 孔径 0.22  $\mu\text{m}$  のメンブレンフィルターで濾過した海水 (POM なし)、Condition A: 孔径 20  $\mu\text{m}$  のナイロンメッシュで濾過した海水 (POM あり; 主に植物プランクトンを含む)、Condition B: 孔径 2  $\mu\text{m}$  のナイロンメッシュで濾過した海水 (POM あり; 主にナノ鞭毛虫と細菌を含む)、Condition C: 単離培養した藻類を添加した人工海水の 4 実験区である。

その結果、図 3-4-2 に示す結果が得られた。POM を含まない Control ではビピンナリア中期まで成長したのみでその後は収縮した; 植物プランクトンで培養した Condition C ではブラキオラリア初期まで成長し、安定同位体比も植物プランクトン *Dunaliella* sp. の値に近づいていった; POM を含む Condition A および Condition B では主に、前者ではビピンナリア後期まで、後者ではビピンナリア中期まで成長し、いずれにおいても安定同位体比は POM の値に近くなった。

このことから、少なくともオニヒトデ幼生はPOMを餌資源として同化していることが明らかになった。さらに、これまでは幼生の餌資源として微小生物 (< 2 $\mu$ m) の寄与率は低いと考えられていたが、Condition Bの実験で示されたように、2 $\mu$ m以下のPOM(バクテリアや生物の死骸などのデトリタス等の有機粒子)も餌として同化していることから、その微小有機粒子だけでも幼生は少なくとも2週間は生存できることも明らかになった。

さらに、Condition AおよびCondition Bの実験区で幼生が食したPOMを質的・量的に評価するために、実験期間中のPOMの構成と炭素量を求めた(図3-4-3)。構成に注目すると、Condition A (<20 $\mu$ mのPOM)では常にデトリタス由来の炭素が50%以上と最も多い(最大で93.1%)こと、Condition B (< 2 $\mu$ mのPOM)ではバクテリア由来の炭素が大きく(18.3~73.3%)、次いでデトリタス由来の炭素の割合が大きいことがわかった。これらの結果は、オニヒトデ幼生は必ずしも植物プランクトン等の生きている生物だけでなく、デトリタスを利用して生存、成長している可能性があることが明らかになってきた。

そこで本年度のテーマ(1)では、オニヒトデ幼生はPOMを構成するどの画分の有機物を同化しているのか、特にデトリタスの餌資源としての意義を明らかにすることを目的とした。具体的には、POMの中からデトリタスだけを分離することは不可能であることから、オートクレーブを用いて海水中に含まれるPOMを加熱処理することで有機物を非生物(デトリタス)化し、それらを餌として幼生の成長の度合いを観測すること、また餌としての同化の程度は炭素・窒素安定同位体比を継時的に測定して、デトリタスの餌としての寄与を明らかにすることを目的とした。



炭素安定同位体比( $\delta^{13}\text{C}$ )は「餌起源」を、窒素安定同位体比( $\delta^{15}\text{N}$ )は「栄養段階」を示す指標となる。単純な捕食関係において、一般的には捕食者の体を構成する $\delta^{13}\text{C}$ は代謝(同化)を通じてその餌に近い値(+ca. 1‰)を示し、 $\delta^{15}\text{N}$ は餌と捕食者の捕食関係に応じて上昇する(+ca. 3‰)性質がある。

図3-4-1. 全炭素・窒素安定同位体比による解析方法の概念図。

表3-6-1. サイズの異なる懸濁態有機物(POM)を餌として含む幼生の培養条件。

| Cond. A  | Cond. B                                | Cond. C               | Control        |
|--|--|-----------------------|----------------|
| <20 $\mu$ m海水  | <2 $\mu$ m海水                           | 培養藻類添加                | <0.2 $\mu$ m海水 |
| Nanoplankton/<br>Nanoflagellate/<br>Picoplankton/<br>Bacteria/<br>Detritus | Picoplankton/<br>Bacteria/<br>Detritus | <i>Dunaliella</i> sp. | POMなし          |

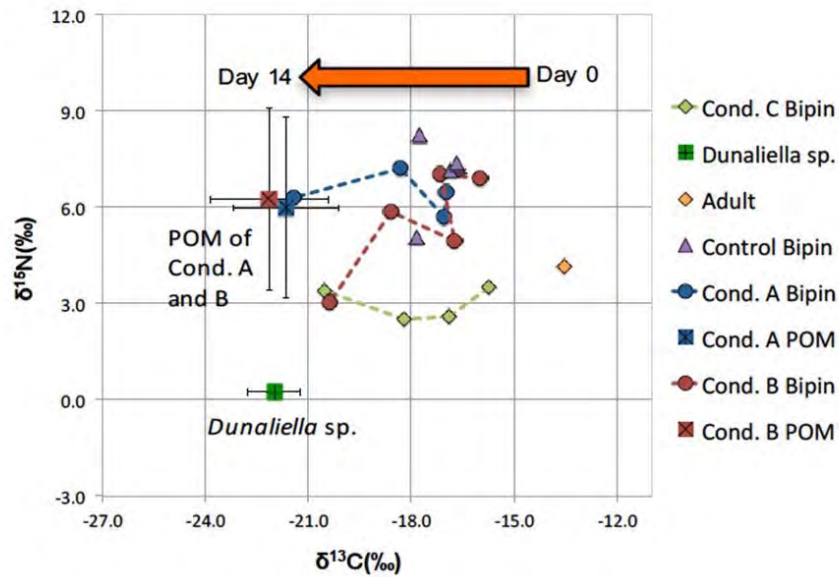


図3-4-2. 各実験区における幼生と餌(POM)の炭素( $\delta^{13}\text{C}$ )と窒素( $\delta^{15}\text{N}$ )安定同位体比の変化。破線は同位体比の継時の変化を、また四角のプロットは餌、それ以外のシンボルは幼生と親個体の同位体比の変化を示す。

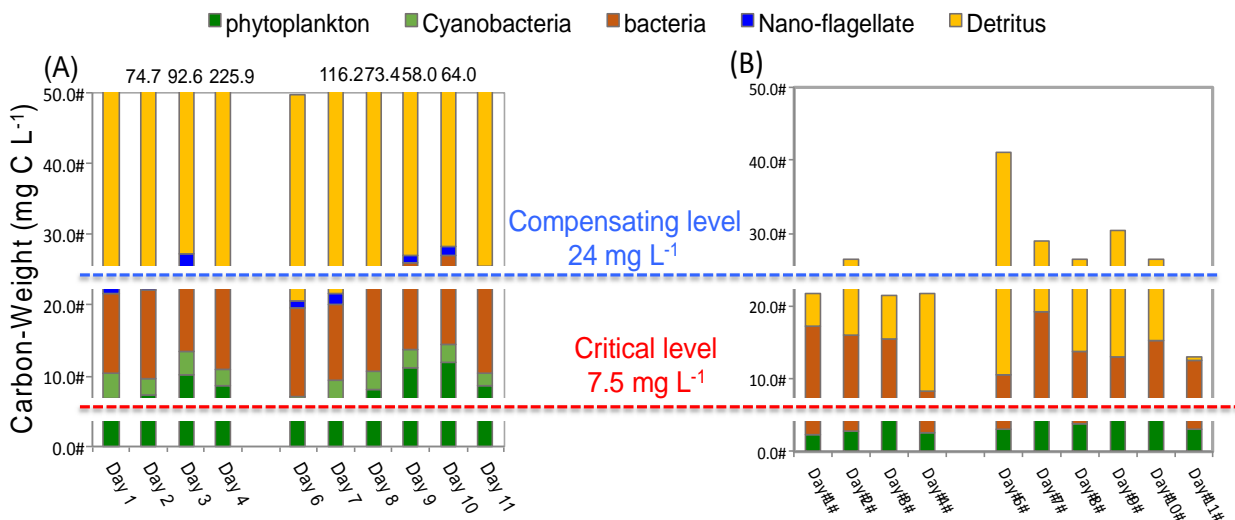


図3-4-3. Condition A と condition B における POM 中の炭素組成の変化。

植物プランクトン、シアノバクテリア、バクテリア、ナノ鞭毛虫、デトリタスを POM の構成要素とし、それぞれ炭素量換算式(2)－Ⅷ参照を用いて算出した。参考としてオニヒトデ幼生の餌要求量を満たす Chl. *a* 濃度を炭素換算したものを Compensating level(青い破線)、大多数が死滅する濃度を Critical level(赤い破線)として示す。



## 4-2-2. 試料および方法

### (1) 幼生培養実験の概要

オニヒトデ幼生の培養実験は2016年7月に沖縄県瀬底島の琉球大学熱帯生物圏研究センターで行った。実験に用いた幼生は、同年6月末に恩納村沖で採集されたオニヒトデ(*Acanthaster planci*)の成体雌雄から媒精した受精卵を孵化させ、濾過海水で満たした水槽で1日馴化させた初期幼生のうち、細胞膜の張りが良い幼生を選別した。培養実験用の海水は、培養期間中は毎日午前中に干潮時を避け、沖縄県本部町本部港付近(26° 40' 33.4" N, 127° 53' 00" E)で採集し、その後速やかに実験室に持ち帰って濾過作業、後述する加熱処理を行った。この自然海水中に含まれるPOMを濾過しサイズ画分することで、現場環境に近いオニヒトデ幼生の餌として与えて培養実験を行った。採水場所は2015年度に実施した本部町大浜の河口付近(26° 39' 00" N, 127° 52' 48" E)とは異なるが、これは事前調査により生産性(Chl. *a*濃度)が他の採水可能地点よりも比較的高いことが見込まれたからである。

### (2) 生物態POMと非生物態POMによる培養実験

オニヒトデ幼生の培養実験は、下記の実験条件および図3-4-4に示したよう実験条件で実施した。実験系列ごとに2L広口瓶を5本ずつ用意し、幼生1個体あたりの濾過速度を考慮して十分な餌量を含む個体密度(1個体 10 mL<sup>-1</sup>)になるように調整するために200個体/培養瓶(2,000 mL)の条件で培養した。実験区は、餌資源の異なる海水として以下のような5系列の条件(図3-4-5)で培養実験を行った。

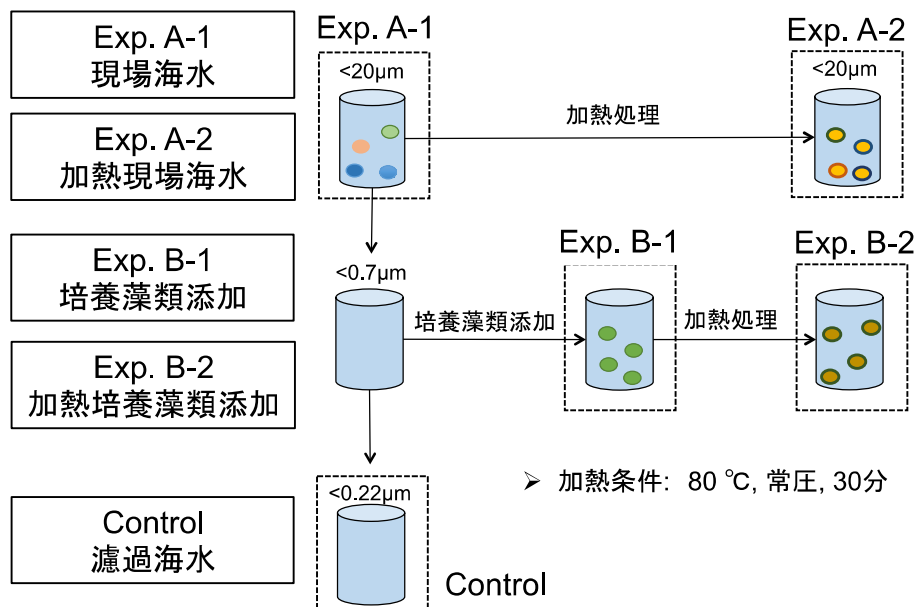


図3-4-4. 各実験系列における設定条件の概要図。

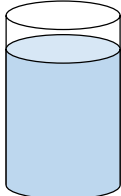
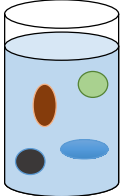
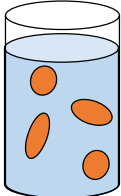
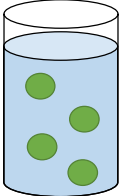
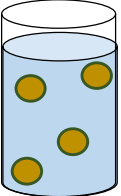
| 実験系列    | Control   | Exp. A-1  | Exp. A-2  | Exp. B-1  | Exp. B-2  |
|---------|---|---|---|---|---|
| 海水      | 限界濾過海水  | 濾過海水  | 加熱処理自然海水  | 藻類添加海水  | 加熱処理藻類添加海水  |
| 条件      | POMなし   | 生物態POM + デトリタス  | 非生物態POM + デトリタス   | 単一藻類 (植物プランクトン)   | 単一藻類由来のPOM  |
|         |  |  |  |  |  |
| 主な含有有機物 | DOM   | 植物プランクトン、鞭毛虫、繊毛虫、バクテリアなど  | デトリタス化したPOM   | <i>Dunaliella</i> sp.   | デトリタス化した <i>Dunaliella</i> sp.  |

図3-4-5. 各実験系列の培養海水に含まれる主な餌資源.

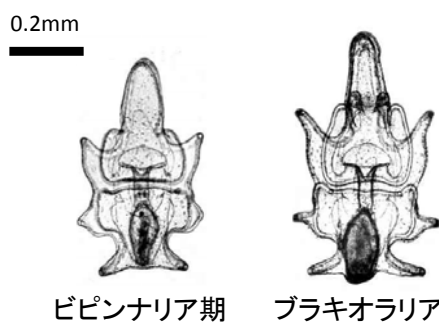


図3-4-6. オニヒトデ幼生のビピンナリア期およびブラキオラリア期の形態.

### <実験条件>

Exp. A-1 : 孔径 20  $\mu\text{m}$  のナイロンメッシュで濾過した海水 (生物態 POM)

Exp. A-2 : Exp. A-1 の海水を加熱処理した海水 (非生物態 POM)

Exp. B-1 : 単離培養した藻類を添加 ( $2,000 \text{ cell mL}^{-1}$  に調整) した濾過海水 (単一植物プランクトン)

Exp. B-2 : Exp. B-1 の海水を加熱処理した海水 (単一植物プランクトンに由来する非生物態 POM)

Control : 孔径 0.22  $\mu\text{m}$  のメンブレンフィルターで濾過した海水 (濾過海水 ; POM なし)

培養期間は媒精 2 日後からビピンナリア後期もしくはブラキオラリア初期 (図 3-4-6) に成長するまで約 2 週間行った。実験期間中は、採水直後の自然海水を濾過して用意した培養用の海水を 1 日 1 回交換した。培養の広口瓶は攪拌器によって常に振盪攪拌しながら、室温を至適生育温度 ( $27.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ ) に調整して飼育培養した。

### (3) 成長度測定

Day 4、7、10、13 において各実験区で幼生試料採集と共に成長度測定を行った。測定は実体顕微鏡で行った。一系列 100 匹ずつをランダムに取り出し、1 匹ずつの成長段階を測定した。成長段階測定と同時に、一系列 20 匹ほどの幼生を実体顕微鏡に接続したカメラを用いて写真撮影した。

#### (4) 分析試料の採集および固定

安定同位体比分析用の試料は、day 0、4、7、10、13に各実験区1検体当たりの個体数を100-200匹として個別にピペットで回収した後、ガラスファイバーフィルター（GF/F：孔径0.7 μm）上に捕集した。幼生個体を採集する時に、実体顕微鏡を用いて幼生の成長段階を測定し、写真撮影を行った。同様に、実験条件ごとに準備したPOM試料は毎日1試料あたり1~3L程度の培養海水を、また単離培養した植物プランクトンを用いる培養海水も同様にGF/Fフィルターを用いて濾過捕集した。

培養海水の環境指標として、採集現場で水温と塩分を測定し、バクテリアおよびナノ鞭毛虫の計測用の海水試料を採集した。実験室に海水を輸送した後、直ちにChl. *a*測定用の試料はメンブレンフィルター（孔径0.22 μm）で捕集し、栄養塩はシリンジフィルターを通過した濾液を採集して測定直前まで冷凍保存した。バクテリア計測用試料は1%ホルマリンで、またナノ鞭毛虫計測用試料は2%グルタルで固定した。

#### (5) 全炭素・窒素安定同位体比測定

全炭素・窒素安定同位体比の測定は、元素分析/安定同位体比質量分析計（EA/IRMS: FLASH 2000 CHN/O Analyzer / Delta V™ Isotopic Ratio Mass Spectrometer、Thermo Scientific社）を用いて行った。フィルター上に採集した試料は、オープンで乾燥（60°C、24h）後に秤量し、試料採集前後の乾燥重量の差として試料量を求めた。試料はフィルターごとスズフィルムに封入し、元素分析ならびに安定同位体比分析を行った。各試料の同位体比は、以下の式に従って求めた。

$$\text{安定同位体比} \cdot \cdot (\text{‰}) = (R_{\text{sample}} - 1) / R_{\text{standard}} \times 1000$$

( $R_{\text{sample}}$  =測定試料の同位体存在比、 $R_{\text{standard}}$  =標準試料の同位体存在比で、 $\delta^{13}\text{C}$ の場合はPDB、 $\delta^{15}\text{N}$ はAirを標準として計算)

#### (6) Chl. *a*および栄養塩類の測定

自然海水中のChl. *a*濃度は、海水（500~1000 mL）をフィルター上に濾過捕集して、Suzuki & Ishimaru (1990) に準じてDMF（ジメチルホルムアミド）を用いて抽出し、Welschmyer法に準じてターナー蛍光光度計(Tuner社)によってChl. *a*による蛍光を測定した(Welschmyer, 1994)。硝酸、亜硝酸、アンモニア、リン酸、ケイ酸の各種栄養塩類は、オートアナライザー（SWAAT、BLTEC社）を用いて分析を行った。

#### (7) バクテリアおよびナノ鞭毛虫の計数

固定された海水試料はメンブレンフィルター上に濾過捕集し、直ちにバクテリアはSYBR Gold（DNA染色剤）、ナノ鞭毛虫はプリムリン（タンパク質染色剤）を用いて染色し、蛍光顕微鏡による全菌数計数法で細胞数（cell ml<sup>-1</sup>）を計数した。なお、蛍光の違いにより、バクテリアは従属栄養バクテリアとシアノバクテリアを、ナノ鞭毛虫は従属栄養ナノ鞭毛虫（HNF: Heterotrophic Nano-Flagellate）および独立栄養ナノ鞭毛虫（ANF: Autotrophic Nano-Flagellate）を区別して計数した。

## (8) POM の各種成分の炭素量換算

POM (懸濁態有機物) の主な構成要素である植物プランクトン、ナノ鞭毛虫、バクテリアの生物態と、生物の死骸や糞などや分解残渣などの非生物態のデトリタスは、分析方法の違いから一次的にそれぞれ異なる単位で算出される。そこで、統一した単位で比較検討を行えるように既報の炭素量換算式 (下記) を用いて生物態の炭素量をそれぞれ概算し、元素分析によって得られた POM の全有機炭素量 (TOC) から差し引いてデトリタスの炭素量を求めた。

$$OC_{\text{detritus}} \text{ (デトリタス中の有機炭素)} = TOC - OC_{\text{organism}} \text{ (生物態有機炭素)}$$
$$(OC_{\text{organism}} = B_{\text{phytoplankton}} + B_{\text{nanoflagellate}} + B_{\text{bacteria}})$$

$$B \text{ (生物量 } g \text{ C m}^{-3}) = A \text{ (存在密度 cell/m}^3) \times CW \text{ (炭素重量 } \cdot g \text{ C cell}^{-1})$$

植物プランクトン : Chl. *a* 濃度 (mg-chl. *a* m<sup>-3</sup>) × C:Chl. *a* 比 (= 30:1; Parsons et al., 1984)

ナノ鞭毛虫 : 細胞密度 (cell ml<sup>-1</sup>) × 細胞当たりの炭素量 (= 183 fg · m<sup>-3</sup>; Caron et al. 1995)

バクテリア : 細胞密度 (cell ml<sup>-1</sup>) × 細胞当たりの炭素量 (= 20 fg cell<sup>-1</sup>; Caron et al. 1995)

Chl. *a* 濃度は便宜上単位を測定値の · g-chl. *a* L<sup>-1</sup> から mg-chl. *a* m<sup>-3</sup> に変換した。ナノ鞭毛虫 1 個体当たりの体積 (· m<sup>3</sup>) は細胞が紡錘体であると仮定して、顕微鏡下で各細胞の短長辺の平均体長を測定して計算に用いた。

### 4-2-3. 結果および考察

#### (1) 各実験区における成長率

本実験において適時行った成長段階の測定結果を図3-4-7 (A~D) に、またビピンナリア後期以降まで成長した割合の経時変化を図3-4-8に示す。海水中に含まれていたPOMを含むExp. A-1 (非加熱)、Exp. A-2 (加熱処理) および植物プランクトンを添加したExp. B-1 (非加熱藻類添加) では、Day 4においていずれも約30%はビピンナリア後期まで成長したことを示している。また、加熱処理した植物プランクトンを含むExp. B-2とPOMも植物プランクトンも含まないControlでは、約10%弱程度がビピンナリア後期まで成長した。その後は各実験区において次第に違いが大きくなった。

実験区Exp. A-1では、ビピンナリア後期以降までの成長の割合がday4、day7、day10、day13でそれぞれ31% (Late-Bp)、89% (Late-Bp51%、初期ブラキオラリア38%)、98% (Late-Bp40%、初期ブラキオラリア58%)、99% (Late-Bp23%、初期ブラキオラリア23%、後期ブラキオラリア54%)と次第に高くなり、約半分がブラキオラリア後期まで成長した。Exp. A-2では、同様に29% (Late-Bpのみ)、89% (Late-Bp87%、初期ブラキオラリア2%)、54% (Late-Bp52%、初期ブラキオラリア2%)、53% (Late-Bp50%、初期ブラキオラリア3%)とday10以降大きく低下しただけでなく、ブラキオラリア後期までは成長しなかった。Exp. B-1では、同様に29% (Late-Bpのみ)、70% (Late-Bpのみ)、86% (Late-Bpのみ)、84% (Late-Bp72%、初期ブラキオラリア12%)と概ね高くなったが、ブラキオラリア後期までは成長しなかった。Exp. B-2では、同様に6% (ビピンナリア後期のみ)、13% (ビピンナリア後期13%、退化3%)、71% (ビピンナリア後期71%、退化10%)、65% (ビピンナリア後期65%、退化4%)と概ね高くなっていったが、ブラキオラリア後期までは成長はみられず、また退化するものが確認された。一方、Controlでは同様に8% (ビピンナリア後期のみ)、1% (ビピンナリア後期1%、退化7%)、17% (ビピンナリア後期17%、退化6%)、15% (ビピンナリア後期15%、退化8%)とブラキオラリア後期まではわずかに認められただけであり、退化したものの割合は最も高くなった。

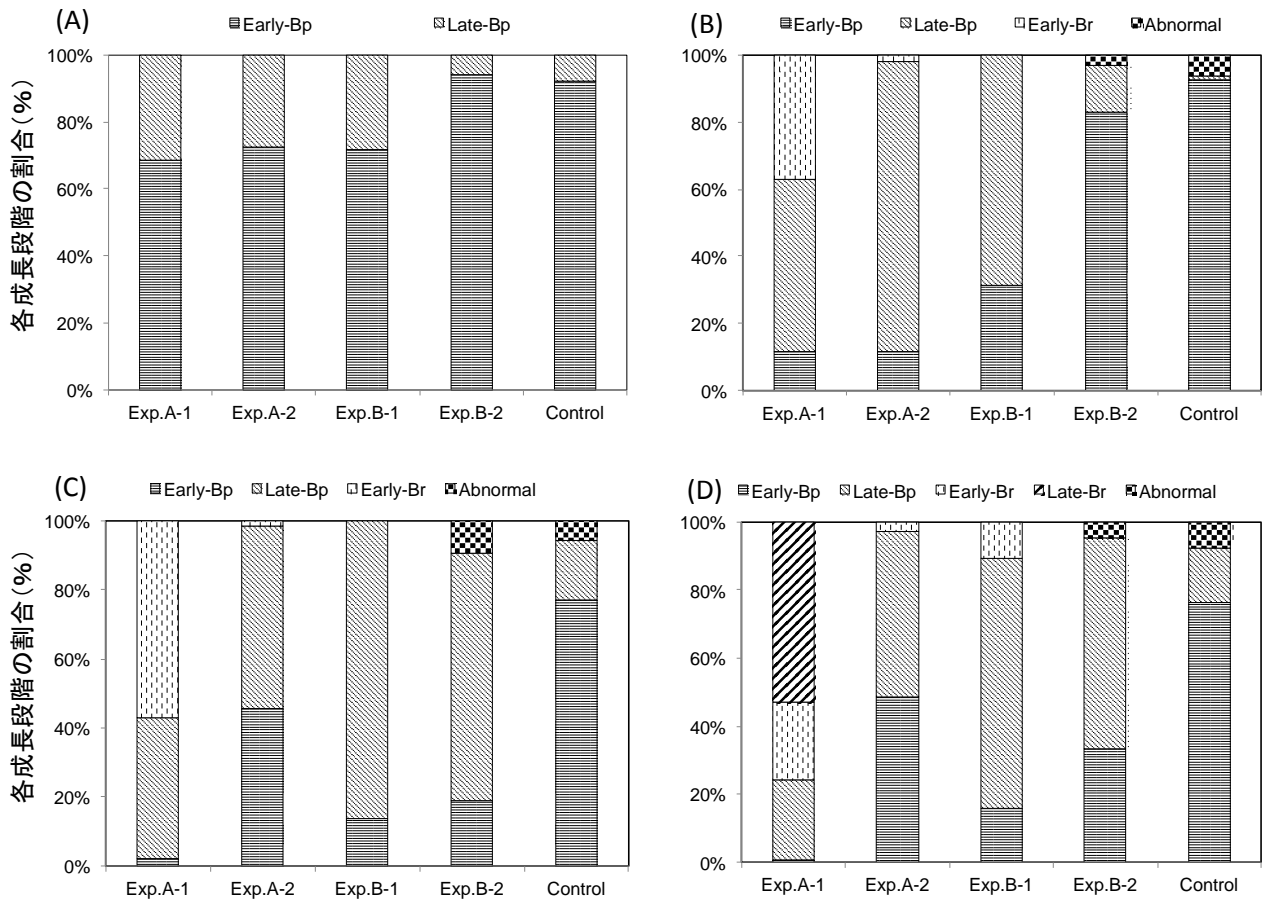


図3-4-7. Day4 (A)、day7 (B)、day10 (C)、day13 (D)における幼生の各成長段階の割合（ビピンナリア期はBp (Bipinnaria)、ブラキオラリア期はBr (Brachiolaria) として表記)

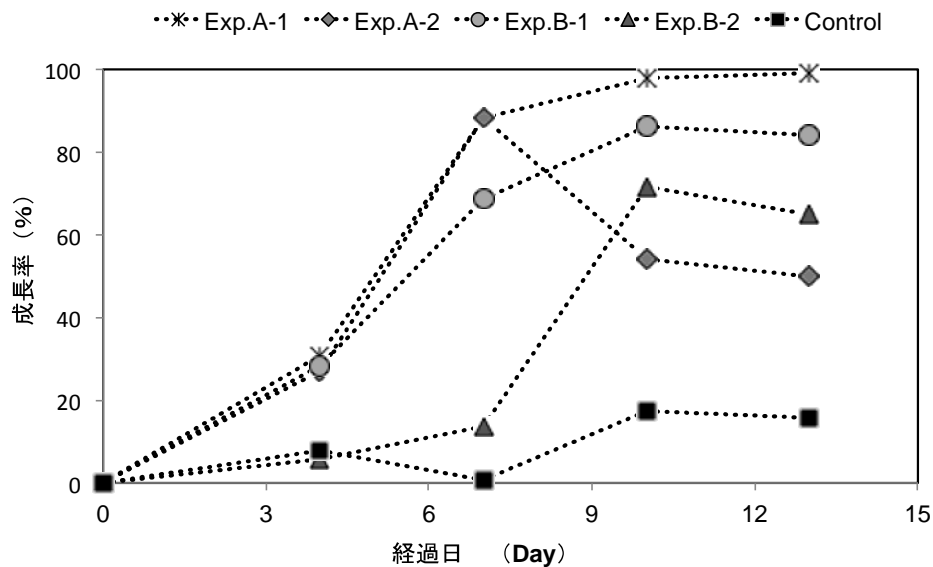


図3-4-8. 各実験区のビピンナリア後期以降まで成長した幼生の割合（最終成長率）の経時変化.

実験結果の解釈における主な考え方を図3-4-9に示した。まずビピンナリア後期以上の成長率が day7 で最も高く 90%程度に達し、またブラキオラリア初期まで成長する個体の割合も高く、さらにブラキオラリア後期までの成長が見られた Exp. A-1 が幼生の餌資源として最も適していることを示している。自然海水を餌として与えた Exp. A-1 の次に高い成長率が見られた条件は、植物プランクトン (*Dunaliella* sp.) を添加した Exp. B-1 であった。Exp. A-1 と比べてブラキオラリア初期までの成長は day13 で 12%と遅いが、Exp. A-1 以外の条件の中では最も高い割合を示した。加熱した POM を餌資源とした Exp. A-2 では day7 までは Exp. A-1 とほぼ同程度の成長をしているが、day10 になると急激に成長が悪くなった。また、植物プランクトンを含む Exp. B-1 と加熱処理を加えた Exp. B-2 の比較では明らかに非加熱の方が高い成長率を示している。これらのことは単一の植物プランクトンだけよりも、多様な有機物を含む POM が餌資源として最も有用であること、また幼生は加熱処理された有機物の同化が困難であることを示唆している。これは加熱処理によってタンパク質や脂質有機物が変性などを起こして幼生による利用を妨げていることが理由として挙げられる。また、幼生の成長率が顕著に低下していることから、加熱処理では実際の海水中 POM に含まれるデトリタスのような非生物態の有機物を再現できていない可能性が考えられる。一方、Exp. B-2 と Control を比較すると、Exp. B-2 の方がビピンナリア後期までの成長は良いが、退化した幼生の出現率は同程度であったことから、加熱した植物プランクトンは餌資源を含まない Control よりは幾分か餌として寄与していることから、幼生はそれらの有機物を一定程度は利用可能であることも示している。

昨年度の実験から、オニヒトデ幼生の成長にとってデトリタスを含む POM の餌資源としての価値が高いことが指摘されたが、本年度の実験によりそれをさらに支持する結果が得られた。加熱処理によってデトリタスのような非生物態の有機物にすると、オニヒトデ幼生による利用が幾分か困難になり、成長を阻害していることが示唆された。しかし、デトリタスの餌資源としての評価をより正しく行うためには、デトリタスに相当する有機物を何らかの方法により分離するか、あるいはより類似した有機物を餌として与える実験系列を検討する必要があることを示している。

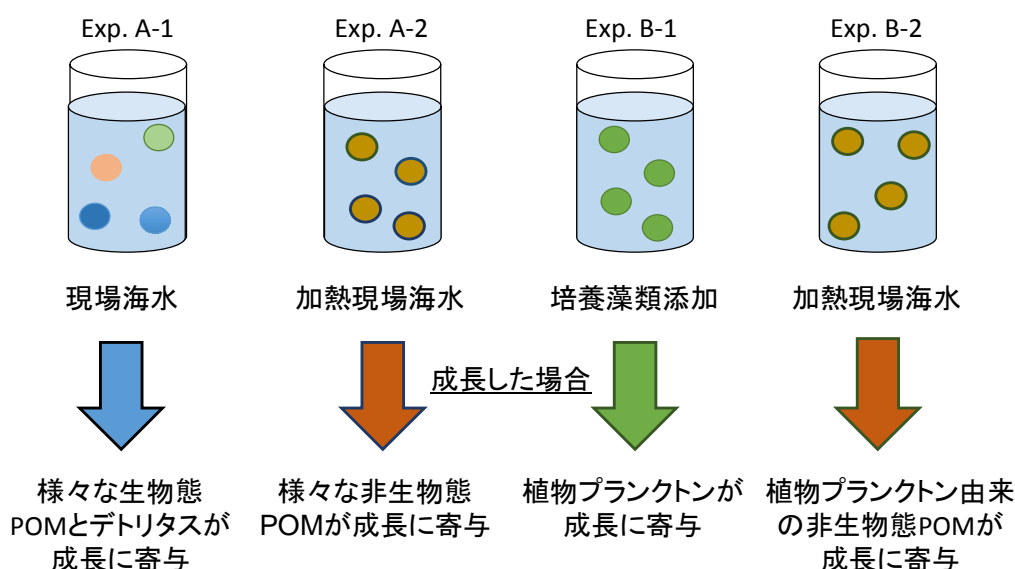


図3-4-9. 各実験区におけるオニヒトデ幼生の成長に寄与し得る主な餌資源。

## (2) オニヒトデ幼生による POM の同化

培養実験における各実験区におけるオニヒトデ幼生と餌の同位体比の変化を図3-4-10に示す。最初に、Controlの幼生は時間と共に安定同位体比が若干変動したが、その変化は小さく、餌を捕食していないことが示唆された (Larvae Control)。これは前年度の実験と同様の結果であり、オニヒトデ幼生は海水中の有機物の構成要素の一つである溶存態有機物 (DOM) を餌としてほとんど利用できないという過去の知見を支持している (Okaji et al., 1996)。次に、POMを用いた実験区である Exp. A-1 (加熱処理なし) と Exp. A-2 (加熱処理あり) を比較する。加熱処理をしていない Exp. A-1 が加熱処理をした Exp. A-2 より幼生の炭素安定同位体比 ( $\delta^{13}\text{C}$ ) が餌の値に近づいていたことがわかった。同様にして、Exp. B-1 (非加熱処理) と Exp. B-2 (加熱処理) でも加熱処理をしていない Exp. B-1の方が幼生の炭素安定同位体比が餌に近づいていた。このことから、幼生は加熱処理をしていない餌 (自然海水中 POM) に比べて加熱処理された有機物は同化できていないことがわかった。前年度の培養実験における安定同位体比の結果より、オニヒトデ幼生は2週間程度で餌の同位体比に近い値をとることがわかっていることから、加熱処理した餌は非加熱処理 POM より同化しにくいことが考えられる。値に非加熱処理の実験区の幼生と餌の炭素安定同位体比の差は約1~2‰に対して、加熱処理をした実験区では3‰程であった。最も幼生が成長した Exp. A-1 では幼生の炭素安定同位体比が最も餌の値に近づいているため、最も同化していたことが示唆された。前述の幼生の成長率を考慮すると、これらの餌の同化の可否が成長に影響をあたえていることが考えられる。さらに、発生直後の幼生に比べて、餌を与えていない Control の幼生の  $^{13}\text{C}$  に変化が見られ、 $^{15}\text{N}$  に顕著な差異がなかったことから、親個体から引き継いだ同位体的に重い (値の大きい) 炭素が初期発生により利用され、幼生の体を構成する炭素が同位体的に軽く (値が小さく) なるが、 $^{15}\text{N}$  は外部から摂取がないと大きく変化しないことが示唆された。この結果は、幼生の卵に含まれる初期栄養を利用した発生メカニズムを考察する上で新たな知見であり、今後の研究課題である。

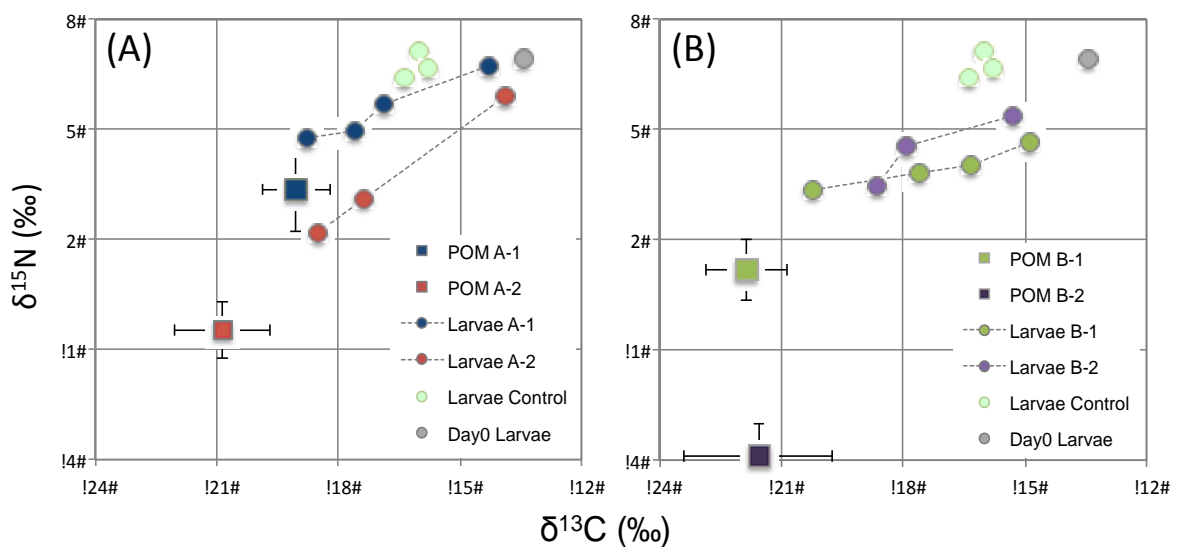


図3-4-10. 各実験区における幼生と餌(POM)の炭素( $\delta^{13}\text{C}$ )と窒素( $\delta^{15}\text{N}$ )安定同位体比の変化。

(A)は Exp. A-1、A-2、Control、(B)は Exp. B-1、B-2、Control の餌(四角形)と幼生(円形)の安定同位体比を示す。破線は同位体比の継時的変化を示す。



### (3) 実験期間中における各実験区の一次生産量 (Chl. a) の変化

培養実験中の各実験区における Chl. a 濃度の継時変化を図 3-4-11 に示した。まず、青色のプロットで示した Exp. A-1 では、平均 Chl. a 濃度が  $0.83 \pm 0.16 \mu\text{g L}^{-1}$  であることから、ほぼコンスタントにオニヒトデ幼生の餌要求量を満たしていることがわかった。次に Exp. A-2 では、平均 Chl. a 濃度が  $0.22 \pm 0.05 \mu\text{g L}^{-1}$  であることから、幼生の餌要求量を下回っており、生存に影響を及ぼす濃度であった。次に、Exp. B-1 は、常に餌要求量を満たす濃度を設定していたため、平均 Chl. a 濃度が  $1.01 \pm 0.15 \mu\text{g L}^{-1}$  であった。最後に、Exp. B-2 の平均 Chl. a 濃度は  $0.14 \pm 0.08 \mu\text{g L}^{-1}$  であったため Exp. A-2 と同様に幼生の餌要求量を下回る濃度となった。

成長率の結果と連動するように成長率が低かった Exp. A-2 と B-2 では餌要求量以下であり、高い成長率を維持していた Exp. A-1 と B-1 は餌要求量を満たしている濃度であった。このことから、加熱処理の有無による Chl. a 濃度の変化は顕著であり、成長率にも大きな影響があると考えられる。ここで、非加熱処理海水である Exp. A-1 と B-1 の結果に着目する。平均 Chl. a 濃度と成長率を比較すると、平均 Chl. a 濃度が低い Exp. A-1 において成長率が高かった。一方で、餌要求量を満たしていない加熱処理をした自然海水である Exp. A-2 では、一部の幼生がブラキオラリア幼生初期に成長していたことから、餌としての寄与は否定できないことが示唆された。

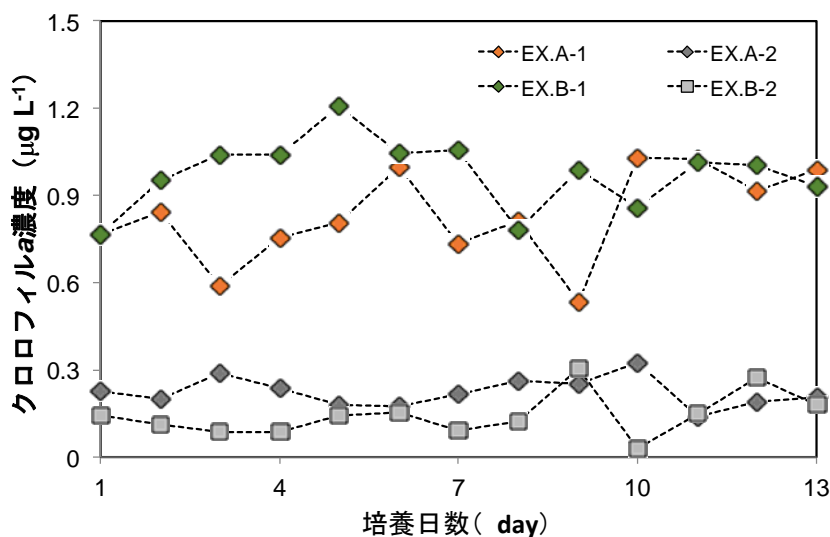


図3-4-11. 各培養日数における自然海水および藻類添加海水の Chl. a 濃度と熱処理による変化.

各シンボルは Exp.A-1(自然海水)、Exp.A-2(加熱処理自然海水)、Exp.B-1(培養藻類添加海水)、Exp.B-2(加熱処理培養藻類添加海水)の値を示す。

#### 4-2-4 まとめと今後の課題

本年度の実験結果の成長率と安定同位体比を比較すると、生物態有機物を含んだ自然海水で培養した幼生の方が加熱処理をした海水で培養した幼生より成長し、餌を同化していたことがわかった。これにより、非生物態の有機物（デトリタス）よりも生物態有機物がオニヒトデ幼生の成長および生存により貢献していることが明らかとなった。また、幼生にとってデトリタスは利用しづらい、または積極的に捕食しない有機物であるが、同位体比の変化よりその同化は可能であることがわかった。さらに、自然海水と培養藻類を添加した海水では、自然海水の方が平均 Chl. *a* 濃度が低いにも関わらずより高い成長率を示していたことから、単一の餌（培養藻類）よりも多様な餌（藻類、鞭毛虫、バクテリアなど）を含む自然海水の方が餌としての質が高いことが明らかとなった。

今後の課題として、自然海水中における生物態有機物（浮遊性微細藻類、鞭毛虫、バクテリアなど）について、江里陽性の化合物レベルの分析によって POM の各構成要素の餌としての寄与をさらに検討することで、オニヒトデの浮遊幼生期の餌資源に関する詳細な知見を得られる可能性が示唆された。本実験において、非生物態（デトリタス）化した POM を含む海水を加熱処理によって再現をしたが、自然環境下では有りえない温度と圧力で生成されたものであり、自然海水中に含まれるデトリタスと同一の有機物ではないということには留意すべきであり、より適した再現方法の検討も必要であると考えられる。

#### 参考文献

- Ayukai T. (1994) Ingestion of ultraplankton by the planktonic larvae of the crown-of-thorns starfish, *Acanthaster planci*. *Biological Bulletin*. 186:90-100.
- Birkeland C. (1982) Terrestrial runoff as a cause of outbreaks of *Acanthaster planci* (Echinodermata: Asteroidea). *Marine Biology*. 69:175-185.
- Caron D. A., Dam H. G., Kremer P., Lessard E. J., Madin L. P., Malone T. C., Napp Q. J. M., Peele E. R., Roman M. R., Youngbluth M. J. (1995) The contribution of microorganisms to particulate carbon and nitrogen in surface waters of the Sargasso Sea near Bermuda. *Deep-Sea Res.* 42:943-972.
- Faburicius K. E., Okaji K., De' ath G. (2010) Three lines of evidence to link outbreaks of the crown-of-thorns seastar *Acanthaster planci* to the release of larval food limitation. *Coral Reefs*. 29:593-605.
- Lucas J. S. (1982) Quantitative studies of feeding and nutrition during larval development of the coral reef asteroid *Acanthaster planci* (L.). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 65:173-193.
- Olson R. R. (1987) *In situ* culturing as a test of the larval starvation hypothesis for the crown-of-thorns starfish, *Acanthaster planci*. *Limnology and Oceanography*. 32:895-904.
- Parsons T. R., Y. Maita and C. M. Lalli (1984): *A Manual of Chemical and Biological Methods for Seawater Analysis*. Pergamon Press, Oxford, 173 pp.

- Suzuki R., Ishimaru T. (1990) An improved method for the determination of phytoplankton chlorophyll using n, n-dimethylformamide. *Journal of Oceanography*. 46:190-194. DOI: 10.1007/BF02125580.
- Welschmeyer N.A. (1994) Fluorometric analysis of chlorophyll a in the presence of chlorophyll b and pheopigments. *Limnology and Oceanography*, 39:1985-1992.

## 4-3. オニヒトデ幼生初期の餌濃度と必須脂肪酸の同化に関する研究

### 4-3-1. 背景

オニヒトデ (*Acanthaster planci*) の成体は造礁性サンゴを主な餌としており、1960年代後半より本種の大量発生が報告され、食害によるサンゴ礁の消滅は世界規模でしばしば深刻な状況をもたらしている (Chesher, 1969)。オニヒトデの大量発生は、海洋生態系の破壊、人的被害、駆除における経済的負担など多方面に大きな影響を与える問題であるが、その大量発生の原因とメカニズムは未だに明らかになっていないため直接的な成体の駆除以外の効果的な対応ができていない。

これまで提唱されている最も有力な大量発生メカニズムは、幼生期において生存率が高まる環境条件が揃う時に起こるという「幼生生き残り仮説」である (Birkeland, 1982)。オニヒトデは孵化した後に、ビピンナリア期とブラキオラリア期の浮遊幼生期を経て、海底に着底し、数年かけて成体へと成長していく。培養実験と染色法による顕微鏡観察によって、オニヒトデ幼生は直径 20  $\mu\text{m}$  以下の緑藻や珪藻などの植物プランクトンを主要な餌として利用することが知られている (Okaji et al., 1996)。しかしながら、沖縄周辺の自然海水のモニタリングでは植物プランクトン量の指標であるクロロフィル *a* (Chl. *a*) 濃度がビピンナリア幼生期の餌要求量より下回る濃度でも、オニヒトデの大量発生が報告されている (Birkeland, 1982) ことから、植物プランクトンだけが制限因子ではないことを示唆している。

そこで本研究では、①オニヒトデ幼生のビピンナリア期 (初期・中期・後期) に経験する餌濃度の違いが、その後の幼生の成長にどのような影響を与えるのかを明らかにする。また、オニヒトデ幼生は餌がない環境下でも 1 週間程度生存できることが観察されており、これは卵に含まれる栄養を用いて発生・成長することを示唆している。そのため、従属栄養生物が合成できない  $\omega$ -3 あるいは  $\omega$ -6 系列の必須脂肪酸を指標にすれば、卵から受け継いだ必須脂肪酸の組成から、その後餌として与えた植物プランクトンを食することにより植物プランクトンに由来する必須脂肪酸に置換される過程がトレースできると期待される。そこでこの必須脂肪酸に注目し、②幼生の成長に伴う卵由来と植物プランクトン由来の必須脂肪酸の組成変化の有無を明らかにすることを本研究の目的とした。

#### 4-3-2. 試料および方法

前述の飼育実験と同様に、2016年7月に沖縄県琉球大学熱帯生物圏研究センター瀬底実験所において、オニヒトデ浮遊幼生が経験する餌濃度の変化が幼生の成長に与える影響を評価するために培養実験を行った。実験条件の概要を表3-6-2に示す。

培養には瀬底実験所前の沿岸からポンプで汲み上げられる海水を、有効濾過孔径 $1.0\ \mu\text{m}$ のカートリッジフィルターによって濾過し、至適生育温度に調整して培養海水として用いた。実験条件は、培養濾過した海水に単離培養した植物プランクトン (*Dunaliella* sp.) をそれぞれ高濃度と低濃度で添加した。植物プランクトン濃度は Chl. *a* 濃度を指標として、高濃度は $1.0\ \mu\text{g L}^{-1}$ 、低濃度は $0.2\sim 0.25\ \mu\text{g L}^{-1}$ とした。この Chl. *a* 濃度は、オニヒトデ幼生が生存できないとされる濃度 ( $<0.25\ \mu\text{g L}^{-1}$ ) と成長に十分な濃度 ( $>0.80\ \mu\text{g L}^{-1}$ ) を基準にして設定した (Okaji et al., 1996)。実験区は、標準区として常に成長に十分な餌濃度を保った Control A (高餌濃度)、成長に不十分な濃度に維持された Control B (低餌濃度)、ビピンナリア幼生初期の3日間 (開始日~3日目まで) を高濃度で培養する Condition A (初期のみ高濃度)、ビピンナリア幼生中期の3日間 (4~6日目まで) を高濃度で培養する Condition B (中期のみ高濃度)、ビピンナリア幼生後期の3日間 (7日~9日目まで) を高濃度で培養する Condition C (後期のみ高濃度) の5系列で行った。

培養は2Lポリカーボネート製の飼育容器に各濃度で藻類を添加した培養海水と100匹の幼生を入れ、いずれの実験区も3連で実施した。飼育容器中の海水は水温が常に $27.0\pm 1.0\ ^\circ\text{C}$ になるように管理し、培養期間中は回転装置を用いて常時攪拌した。培養期間は同年7月6日から7月19日の14日間で、その期間は毎日午前中に培養海水を交換し、その都度、餌濃度を設定条件に従って調整した。

成長段階の測定は、表3-6-2に示すように day5、day8、day11、day14の4回、各ボトルから幼生60匹をランダムに採取し、実体顕微鏡にて測定した。体長変化は1系列あたり15匹の幼生を写真撮影し、Image Jの画像解析ソフトを用いて行った。成長段階測定最終日に、生存個体と死滅・退化した個体に分け、それぞれGF/Fガラスファイバーフィルターを用いて捕集し、分析用の試料として保存した。

必須脂肪酸の組成変化を比較するため、オニヒトデ成体の雌雄の臓器 (卵巣、精巣、管足、肝盲嚢)、受精卵、桑実胚、孵化後の幼生、餌である藻類、成長後の幼生をそれぞれ採取した。これらの試料はpy-GC/MS (熱分解-ガスクロマトグラフィー/質量分析計; 型番、Agilent Technology社) を用いてonline-TMAH-GC/MS法によって測定し、各脂肪酸の同定および定量を行って組成解析を行った。

### 4-3-3. 結果および考察

#### (1) 餌濃度の変化による幼生の成長段階への影響

餌濃度の変化が幼生の成長に与える影響を評価するため、測定個体の全数に対して、最も成長が進んだ個体の成長段階（Day5・8は中期または後期ビピンナリア、Day11・14では後期ビピンナリアと初期ブラキオラリア）の存在比を算出し、本実験における成長率として表した。図3-4-12に各実験系列におけるオニヒトデ幼生の成長率の推移と表3-6-3に実験終了時点の14日目における成長率を示す。成長に十分な餌濃度が保たれたControl Aでは、成長率はほぼ100%の高い生存率が保たれ、Day14でも95%が保たれた。これは常に十分な餌が存在する環境下において、既報の通りオニヒトデ幼生は徐々に成長を進めるかその状態を維持することが可能であったことを示す結果であった。

表3-6-2. ビピンナリア幼生期における餌濃度変化実験の条件変化と測定時期.

| 条件 \ Day    | 1 | 2 | 3 | 4 | 5      | 6 | 7 | 8      | 9 | 10 | 11     | 12 | 13 | 14     |
|-------------|---|---|---|---|--------|---|---|--------|---|----|--------|----|----|--------|
| Control.A   | 高 |   |   |   | 成長段階測定 |   |   | 成長段階測定 |   |    | 成長段階測定 |    |    | 成長段階測定 |
| Control.B   | 低 |   |   |   | 成長段階測定 |   |   | 成長段階測定 |   |    | 成長段階測定 |    |    | 成長段階測定 |
| Condition.A | 高 |   |   | 低 | 成長段階測定 |   |   | 成長段階測定 |   |    | 成長段階測定 |    |    | 成長段階測定 |
| Condition.B | 低 |   |   | 高 | 成長段階測定 |   | 低 | 成長段階測定 |   |    | 成長段階測定 |    |    | 成長段階測定 |
| Condition.C | 低 |   |   |   | 成長段階測定 |   | 高 | 成長段階測定 |   | 低  | 成長段階測定 |    |    | 成長段階測定 |

成長に不十分な餌濃度に維持された Control B と、培養開始 3 日間餌を高濃度に保った Condition A の成長率はほぼ同様の経過を示しており、Day11 までは 90 % 程度の高い成長率を維持していた、Day14 には 40 % 程度 (Control B: 42.9 %、Condition A: 41.8 %) まで低下した。一方、Day4~Day6 まで餌を高濃度に保った Condition B と Day7~Day9 まで高濃度に保った Condition C は類似した経過を示し、Day8 までは 90 % 以上の高い成長率であったが、Day11 には 80 % 以下になり、Day14 には 10 % 以下 (Condition B: 9.1 %、Condition C: 2.9 %) へと急激に低下した。これらの結果は、ビピンナリア幼生の成長に影響を及ぼす餌濃度として報告されている過去の知見を支持し、Chl. *a* 濃度が常時  $0.80 \mu\text{g L}^{-1}$  以上であれば高い成長率が保たれること、また  $0.25 \mu\text{g L}^{-1}$  以下の環境下では成長が大きく阻害されることがわかった。

培養の途中で餌濃度を変化させた実験区に注目すると、予想に反して Condition A (初期 3 日間のみ高い餌濃度) と Control B (常に低濃度) の成長率の推移に大きな差異が認められなかった。オニヒトデ幼生は孵化後 3 日程度で口と胃の器官が発生してビピンナリア幼生初期に変態するが、消化器官が発生した直後には積極的に摂食および同化が起きておらず、この時期の周辺環境の餌濃度は成長に大きく影響しない可能性が示唆された。さらに、Condition A の実験終了時の幼生生存率に比べて Condition B (中期 3 日間のみ) や Condition C (後期 3 日間のみ) は顕著に低く、低濃度の餌を常に与え続けた Control B の結果よりも低い値を示した。これは、幼生はビピンナリア中期以降まで発生・成長が進んだ頃 (孵化後 10 日前後) には摂食行動を積極的に開始しており、この時期に餌環境下が低濃度から高濃度へと急激に変化すると、摂食や消化不良が起きて幼生の成長と生存を大きく阻害したことが原因として考えられる。

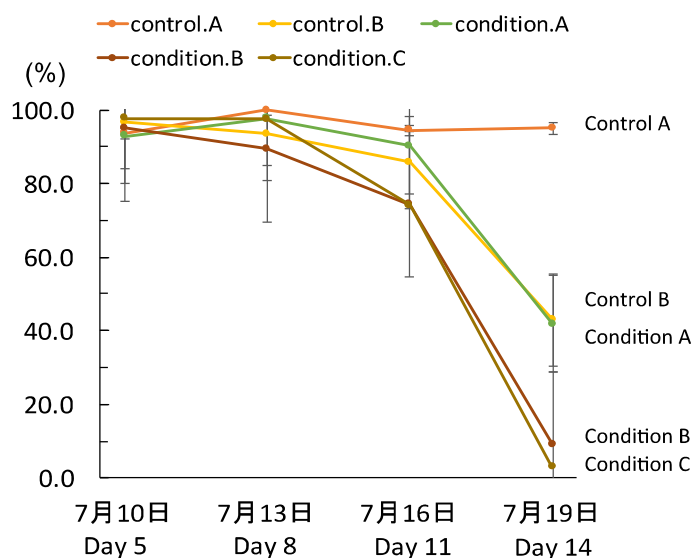


表3-6-3. 実験最終日(14日目)の生存率.

| 実験系列        | 生存率 (%) |
|-------------|---------|
| Control-A   | 95.0    |
| Control-B   | 42.9    |
| Condition-A | 41.8    |
| Condition-B | 9.1     |
| Condition-C | 2.9     |

図3-4-12. 各実験区におけるオニヒトデ幼生の成長率.

オニヒトデの大量発生がしばしば観察されている沖縄島沿岸域を例に挙げると、本対策事業で行われている水環境情報の広域モニタリングに明らかなように、沿岸域全体の年間平均 Chl. *a* 濃度は  $0.30 \pm 0.02 \mu\text{g L}^{-1}$  と低い値で推移しているが、台風や風雨などの気候状況によって陸域からの栄養塩類の流入に起因する一次生産の増加が局部的または一時的に観察されている（事業報告書, 2013）。これまでの知見では、このようにオニヒトデの生息域周辺が一時的に良い餌環境になる時期とオニヒトデの産卵時期が重なることが大量発生の原因の一つとなり得るという見解があるが、本実験結果が示すように幼生が急激な環境変化への耐性を持たないとすると議論の見直しが必要となる。この点は非常に重要な問題であるため、幼生の飢餓耐性や餌環境の変化に対する応答については、水温や水質などにも敏感であるオニヒトデ幼生の飼育実験の性質に留意し、様々な外的要因の影響を最小限にして行うことが求められる。幼生の生存・成長が安定する着底期に至るまで、媒精から初期発生、孵化、変態という浮遊幼生期の成長過程において非常に繊細な操作が求められるうえ、親個体の健康状態や卵巣・精巣の熟度なども幼生の成長に影響することも近年報告されているため、本実験結果が得られた原因が単に餌濃度の変化だけに依存するかどうかについて、実験系列や操作過程を改善した追実験による再検討が必要である。

次に図3-4-13に示す後期ビピンナリア幼生の存在比に注目すると、Control A では day8 を過ぎた頃に成長のピークを迎え、一度後期ビピンナリア幼生に成長した個体はその成長を維持していることが分かる。一方、その他の実験区においては Day10 前後にピークを示し、その後は後期ビピンナリアの存在比が低下する傾向を示した。成長不全個体の割合をみると、Control A で最も低く、実験終了時まで5%程度の低い値で推移している。Control B や Condition A の成長不全固体の割合は、Day11 までは 10 %程度であるが、Day11 から Day14 にかけて共に 60 %程度と大きくなった。Condition B や Condition C の成長不全固体の割合は概ね同様の傾向を示しており、Day11 までに 30 %程度へと緩やかに増加し、その後 Day14 には 90 %以上へと急激に大きくなっている。

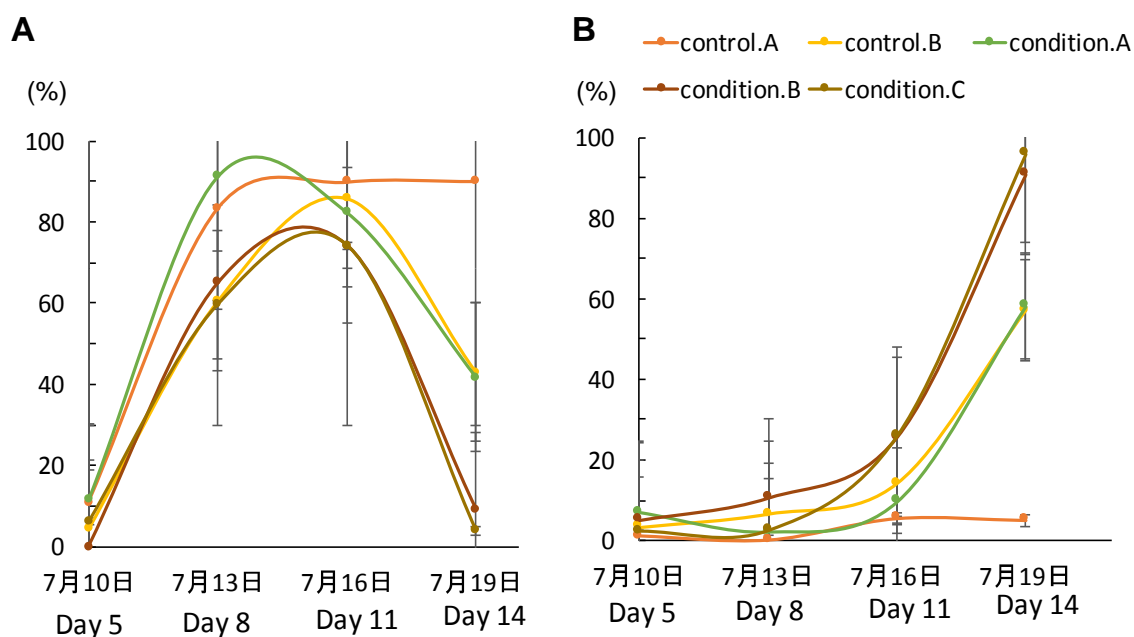


図3-4-13. 各実験区における後期ビピンナリア幼生まで成長した幼生と成長不全の割合の変化。



Condition BやCondition Cの実験結果は、孵化後しばらく卵に含まれる初期栄養分を主に利用した後に、Day8～11程度までにはその栄養分は枯渇し、外部栄養を十分に獲得できなければ幼生の成長が阻害され、その後は急激に成長が停止または退化が進行したことが窺える。Condition Aでは培養開始の初期に十分な栄養が与えられたため、当初はControl Aのような高い成長率が観察されたが、高い餌濃度の環境下に晒されたのが3日間のみであったため、その後1週間ほど低濃度の餌を与えられた環境下で成長阻害を受け、Day14には生存率が42%まで大きく減少したと考えられる。これらのことは先に述べたように、孵化後の早い時期に餌濃度が十分に保たれていることが重要であることを示唆している。しかしながら、実験開始時から終了時まで低濃度の餌を与え続けたControl Bにおいて、一時的に高濃度の餌環境を経験したCondition Aの幼生と同様な成長率を示した明確な理由はわからなかった。

図3-4-14にDay14の各実験区の幼生のより詳細な成長度合いを示す。前述の図3-4-13にも明らかなように、成長に十分な餌濃度が十分量保たれたControl Aのみ90%程度が後期ビピンナリア幼生で占められ、5%とわずかではあるがブラキオラリア期まで成長したこと、またビピンナリア初期まで退化したのはわずかに5%程度であったことは、その他の実験区と明確な違いを示している。他の実験区ではいずれもブラキオラリア期まで成長する個体は観察されず、Control B、Condition Aでは58%程度、またCondition BやCondition Cでは90%以上がビピンナリア初期まで退化した。この点においても先に述べたように、より高次の成長段階へと変態が進むためには、孵化後の早い時期に餌濃度が十分に保たれていることが重要であることを示唆する結果となった。さらに、常に低い餌濃度のControl BよりもCondition BとCondition Cにおいて退化した個体が多かったこととを先の結果と合わせて考察すると、培養容器の中に存在した個体群のうち、先天的に健康状態が良い個体は外部栄養に依存せずに後期ビピンナリアまで成長することが可能であるが、比較的状態が良くない個体（初期の成長不全により摂食・同化する能力が乏しい個体）は濾過捕食によって体内に取り込む有機物が急激に増加するなど、急な餌環境の変化に対応できずに消化不良を起こして退化した可能性が考えられた。

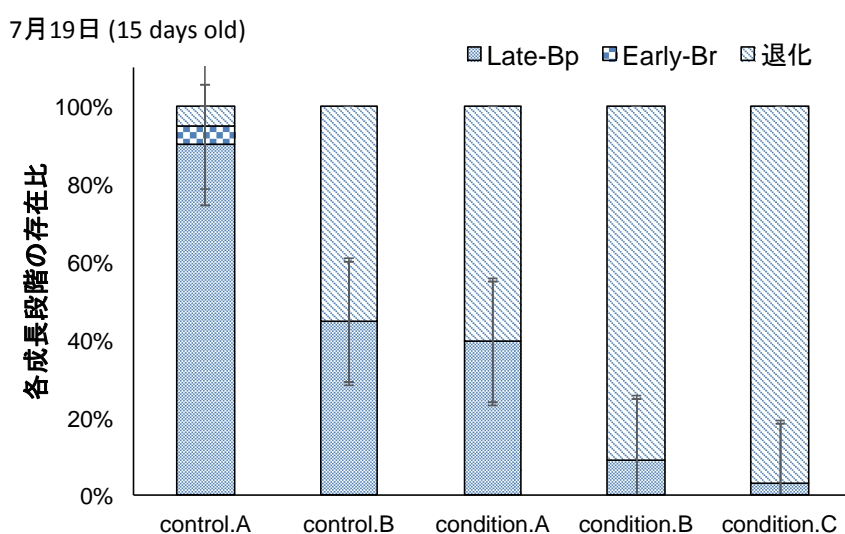


図3-4-14. 各実験区における実験終了時のオニヒトデ幼生の成長度合い（後期ビピンナリアをLate-Bp、初期ブラキオラリアをEarly-Brとして示した）。

## (2) 成長度合いと必須脂肪酸の組成変化

図3-4-15に餌として与えた植物プランクトン (*Dunaliella* sp.) と、受精卵から初期ブラキオラリア幼生の online-GC/MS の分析結果をトータルイオンクロマトグラフ (TIC) として示す。本実験で与えた餌である *Dunaliella* sp. を構成する主な脂肪酸は生物一般に豊富に存在する非必須飽和脂肪酸 (16:0, 18:0) と一価不飽和脂肪酸 (18:1) が顕著に存在し、目的の必須脂肪酸は同定できる濃度で確認することができなかった (図3-4-15 A)。一方、受精直後の受精卵と孵化直後の幼生の脂肪酸組成は極めて類似しており、長鎖脂肪酸やステロール類が豊富に存在することが明らかとなった (図3-4-15 B, C)。また、これらの脂肪酸存在比はビピンナリア幼生とブラキオラリア幼生で顕著に小さくなった (図3-4-15 D, E, F) ことから、初期発生の際に利用され代謝されていることが明らかとなった。目的の必須脂肪酸については、本実験では200匹前後の幼生個体を試料として扱ったが、試料中の脂肪酸量が少なく測定限界の閾値を超えずに検出が不可能であったか、試料中に存在していなかったかについては判断が困難であった。今後抽出方法を再検討して濃縮するか、分析に供する試料量を増やして再分析する必要があると考えられる。

本研究の当初の目標として、卵から受け継いだ栄養素の一つである必須脂肪酸と新たに与えられた植物プランクトンから得た必須脂肪酸がどのように組成としてどのように置きかわっていくのかをトレースすることを期待したが、前述の通り卵からは多様な脂肪酸が検出された一方で、餌として与えた植物プランクトンには必須脂肪酸が確認できなかった。オニヒトデ幼生の餌として *Dunaliella* sp. が有効な餌であることは広く知られており、経験的にも過去の捕食実験で同位体比の変化が認められたため本実験でも採用したが、必須脂肪酸をトレースするためには予め目的の化合物を豊富に含む餌を与えて実験をすることが好ましいことがわかった。また小規模で丁寧な操作を伴う実験の性質上、同一試料数を増やすには実験規模を大きくする必要があるため、その操作には限界がある。そこで、今後の発展研究として、量的に検出が困難な試料であってもその存在さえ確認することが可能であれば、分子レベル安定同位体比を測定することにより、それらの脂肪酸が卵内に含まれる親から得た栄養に由来するのか、外部栄養から得たものに由来するのかを判別することが可能であると考えられる。

低い餌環境下でも成長が認められた後期ビピンナリアと、さらに変態が進行した初期ブラキオラリアの幼生に含まれる脂肪酸について解析した結果、その組成に顕著な差異は認められなかった (図3-4-15 D, E, F) ことから、オニヒトデ幼生の成長を制限している要因は脂肪酸ではなく、アミノ酸やその他の必須化合物が制限している可能性が示唆された。過去の研究により、カイアシ類の動物プランクトン (*Acartia steueri*) の親個体 (雌雄) とそれらの受精卵に含まれる必須アミノ酸の分子レベル安定同位体比の分析によって、プランクトンの卵生産による代謝メカニズムを考察されている (Nakatomi et al., 2013)。本実験の過程で、予備試料として幼生試料を確保することができたため、効率的な抽出方法と分析方法を検討の上、アミノ酸組成を解析することによってオニヒトデ幼生の代謝と成長に関する新たな知見が得られると期待される。

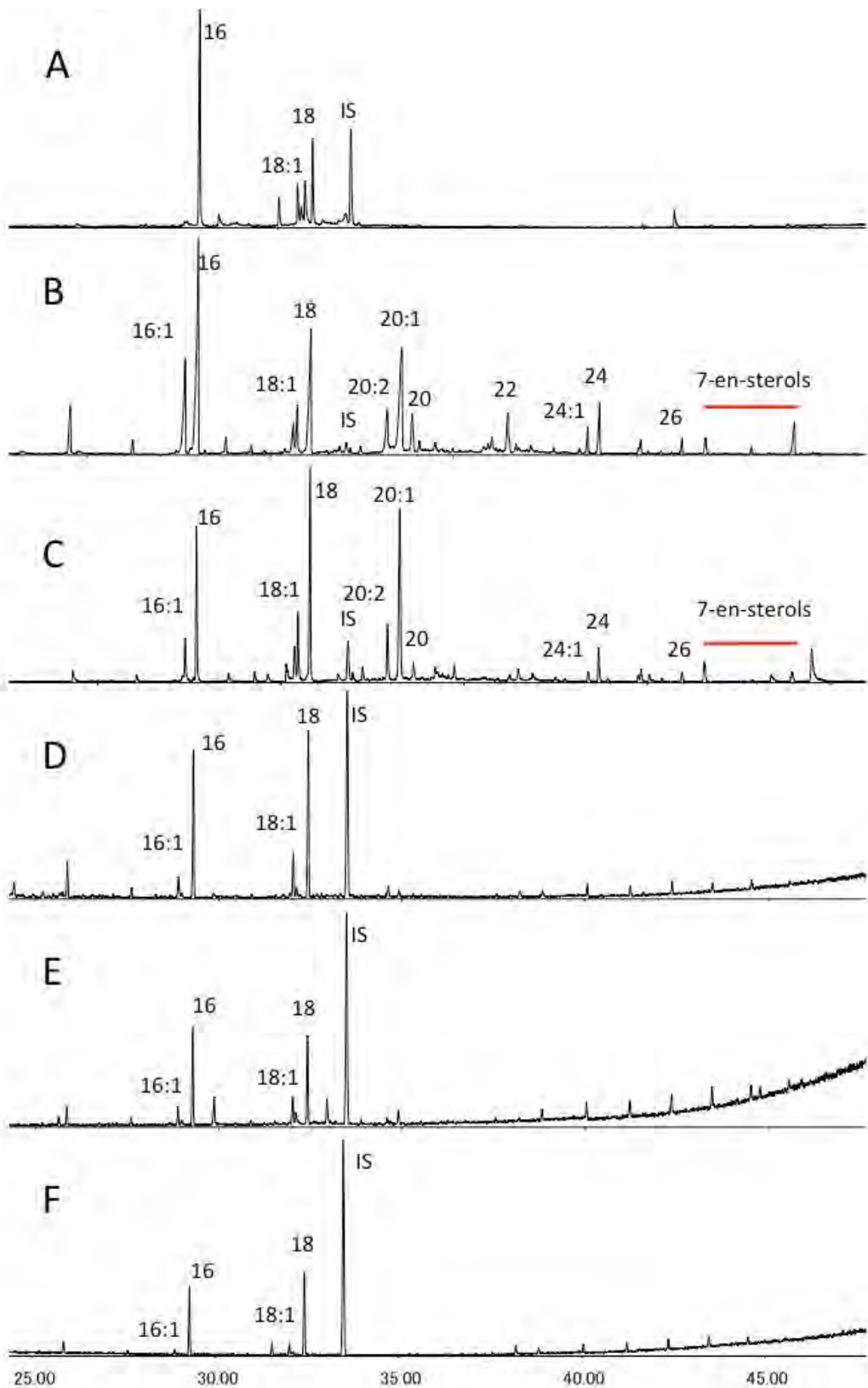


図3-4-15. 餌と各発生段階のオニヒトデ幼生に含まれる各種脂肪酸。A: 植物プランクトン (*Dunaliella* sp.)、B: 受精卵、C: 孵化直後幼生、D: 初期ビピンナリア幼生、E: 後期ビピンナリア幼生、F: 初期ブラキオラリア幼生のトータルイオンクロマトグラフ (TIC) を示し、図中の数字は代表的な脂肪酸を表している。

#### 4-3-4. 今後の課題

今後の課題として、栄養摂取の条件が Control A のように十分な栄養が培養初期から継続的に栄養が与えられないとその後の成長を継続できないのか、それとも Condition A のように培養初期に十分な栄養が与えられた場合や、また Condition B や Condition C のように培養初期には十分な栄養がなくてもある程度の成長を維持して生存している場合に、栄養状態が復活した場合には成長が復活するのか、あるいは復活することはないのかを明らかにする必要がある。本実験では分析のために必要な試料量を予め予測し検討した上で実験を行ったが、必須脂肪酸量は予想よりも少量あるいは検出限界以下の濃度で存在していたため、より詳細な解析が困難であった。今後は抽出方法や分析条件を再検討し、分子レベルの脂肪酸およびアミノ酸組成に焦点を当てて実験・分析を行うことで、オニヒトデ幼生の成長に与える餌濃度や餌の種類の影響がより明らかになると期待される。

#### 参考文献

- Birkeland C. (1982) Terrestrial runoff as a cause of outbreaks of *Acanthaster planci* (Echinodermata: Asteroidea). *Marine Biology*, 69:175-185.
- Chesher R.H. (1969) Destruction of Pacific Corals by the Sea Star *Acanthaster planci*. *Science*, 165: 280-283.
- Faburicius K.E., Okaji K., De' ath G. (2010) Three lines of evidence to link outbreaks of the crown-of-thorns seastar *Acanthaster planci* to the release of larval food limitation. *Coral Reefs*, 29:593-605.
- Nakatomi N., Hirahara M., Natori N., Toda T., Yamamoto S. (2013) Change in metabolism and nitrogen isotopic composition of amino acids through egg production of the calanoid copepod *Acartiastoeuri*. *Res. Org. Geochem.*, 29: 61-64.
- Okaji K., Ayukai T., Lucas J.S. (1997) Selective feeding by larvae of the crown-of-thorns starfish *Acanthaster planci* (L.). *Coral Reefs*, 16:47-50.