

2. 幼生餌料制限

中富 伸幸（創価大学）・山本 修一（創価大学）

2-1. 実施課題について

平成 27 年度から平成 29 年度までの 3 年間にわたり、炭素・窒素安定同位体比分析及び脂質分析を用いてオニヒトデ浮遊幼生期の餌資源と食性に関する研究を行った。各年度に実施した研究課題と概要は以下の通りである（カッコ内は本章の項目番号を示す）：

<平成 27 年度>

- 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（2-2）
- サイズ分画した自然海水中有機物を用いた摂餌実験
- 同位体標識をした有機物を用いた摂餌実験

<平成 28 年度>

- オニヒトデ浮遊幼生期の成長と餌資源の質的評価（2-3、2-4）

<平成 29 年度>

- 脂質組成からみたオニヒトデ幼生のデトリタスの利用と飢餓耐性の検討（2-5）

本報告では、平成 29 年度の成果を含む過去 3 年間の研究成果について取りまとめ、オニヒトデ浮遊幼生期の餌資源や捕食動態について総合的な考察（2-6）を行う。

2-2. 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

2-2-1. 背景と目的

これまでオニヒトデ大量発生メカニズムを説明する仮説がいくつか提唱されているが、その中でも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とする「幼生き残り仮説」が最も有力視されている（e.g. Birkeland 1982）。ナノサイズ（2-20 μm ）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が（Ayukai 1994; Okaji et al. 1997b）、自然環境下ではクロロフィル *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（ $<0.25 \mu\text{g-chl. } a \text{ L}^{-1}$; 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ことができる理由として、主要な餌と考えられている植物プランクトン以外にも、バクテリア等のピコプランクトンや鞭毛虫などのナノプランクトン、さらに生物の死骸や糞などの分解物（総称、デトリタス）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、オニヒトデ幼生が自然環境下において、どの有機物を餌として利用できるのかを明らかにすることは、オニヒトデの餌環境を評価する上で極めて重要である。

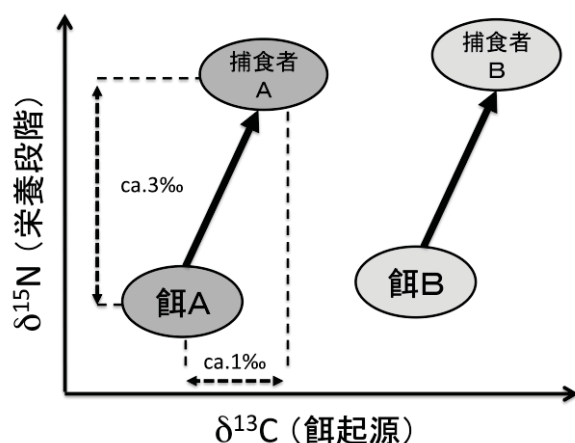
海洋生態学では、有効孔径 0.7 μm のガラスファイバーフィルター（GF/F）を通過する「溶存態有機物（DOM: Dissolved Organic Matter）」と呼ばれる海水中に溶解している物質と対比し

て、海水中に浮遊している粒子状の物質を、懸濁態有機物質 (POM: Particulate Organic Matter: POM) と呼称する。この POM の厳密な定義は明確ではなく、研究によって個別の定義がなされる場合が多いが、一般的には自泳能力を有さない植物プランクトンやバクテリアなどの浮遊性微生物を含む粒径 0.7 μm 以上の海洋を漂う物質のことを指す。本稿ではこの POM の定義を、100 μm のナイロンメッシュを通過し GF/F で捕集可能な「0.7 μm 以上、100 μm 以下の全ての有機物」、すなわち前出のデトリタスや植物プランクトンを含む微小有機物の総称とする。

これまでオニヒトデ幼生の餌起源を推定する研究は、染色法を用いた顕微鏡観察による胃内容物解析以外にほとんどない。しかし、サンゴ礁海域の POM の主成分であるデトリタス (Nakajima et al. 2010) や染色されない非生物態の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ため、餌起源の議論は未だ結論を得ていない。そこで本研究では、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・窒素安定同位体比分析 (図 3-2-1)」を応用し、以下の 2 点を主な目的として、それぞれ異なる実験区を設けてオニヒトデ幼生の飼育実験を行った。

以上のような背景をふまえ、本研究の目的は次の 2 点とした：

- ① 異なるサイズに分画した自然海水中の POM を餌としてオニヒトデ幼生を飼育し、幼生による POM の同化の有無を明らかにする (実験 A)
- ② 重炭素 (^{13}C) と重窒素 (^{15}N) で標識した微小生物 (2 μm および 20 μm 以下の POM) が含まれる条件下でオニヒトデ幼生を飼育し、それらの同化の有無を明らかにする (実験 B)



*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。単純な捕食関係において、捕食者の体を構成する $\delta^{13}\text{C}$ は代謝 (同化) に伴ってその餌に近い値になり、 $\delta^{15}\text{N}$ は餌と捕食者の捕食関係に応じて、3‰程度の差を示すという傾向を応用している。

図3-2-1. 全炭素・窒素安定同位体比*による解析の概念図

2-2-2. 材料と方法

(1) 幼生飼育実験の概要

オニヒトデ幼生の飼育実験は 2015 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 cf. solaris*) 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。飼育実験用の海水は、飼育期間中は毎日午前 7 時に沖縄県本部町大浜の河口付近 (26° 39′ 00″ N, 127° 52′ 48″ E) で採取し、その後速やかに実験室に持ち帰って濾過作業を行った。なお、沖縄本島北部に台風が上陸した 7 月 10

日は採水を行わなかった。この自然海水中に含まれる POM をサイズ分画し、自然環境に近いオニヒトデ幼生の餌として与えて飼育実験を行った。

(2) サイズ分画した POM による飼育実験 (実験 A)

下記に示す実験系列ごとに 2L 広口瓶を 5 本ずつ用意し、1 個体あたりの濾過速度を考慮して個体密度を 1 個体/10 ml になるように調整して飼育した。比較実験区として、培養した植物プランクトン (*Dunaliella* sp.) を単一の餌として幼生を飼育した。飼育期間は媒精 2 日後から後期ピピンナリアもしくは初期ブラキオラリアに成長するまで約 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飼育用海水を 1 日 1 回交換した。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 ($28.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$) に調整して飼育した。

<実験条件：飼育用海水の条件>

- ① 孔径 20 μm のナイロンメッシュで濾過した海水
(20 μm 以下の POM—主に植物プランクトンを含む：POM<20 の実験区と呼ぶ)
- ② 孔径 2 μm のナイロンメッシュで濾過した海水
(2 μm 以下の POM—主にナノ鞭毛虫とバクテリアを含む：POM<2 の実験区と呼ぶ)
- ③ 孔径 0.22 μm のメンブレンフィルターで濾過した海水 (POM なし、コントロール)
- ④ 培養藻類 *Dunaliella* sp. を添加した人工海水 (POM なし、植物プランクトンあり)

(3) 同位体標識した POM による飼育実験 (実験 B)

下記に示す条件で前処理した自然海水を透明なポリカーボネート製広口瓶に分注し、同位体標識試薬 (重炭素： $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ 、重窒素： $\text{Na}^{15}\text{NO}_3$) を添加し、光合成によって POM 画分に含まれる生物 (主に植物プランクトン、ナノ鞭毛虫、バクテリア) に同位体標識化合物を取り込ませるために、屋外の水槽にて十分な太陽光の下で係留培養 (48 時間) を行った。各実験区の海水中に含まれる生物に同位体標識化合物を取り込ませた後、実験 A と同様に 2L 広口瓶にオニヒトデ幼生を入れて飼育し、24 時間後と 48 時間後に幼生を採集した。

POM の比較対象として、サンゴ礁内において POM 以外に豊富に存在する有機物の一つである、サンゴが放出する粘液を餌として与える実験を行った。まず水槽内で馴化させたサンゴ (*Acropora* spp.) を用意し、過去の文献に基づく方法により (Naumann et al. 2010) 水槽内に同位体標識試薬を添加して 48 時間放置してサンゴ自体を同位体標識させた後、サンゴを一時的に大気中に暴露させた時に放出される粘液を回収した。実験 A と同様、2L 広口瓶、5 本の容器にこの粘液を添加し、幼生を同位体標識された粘液が含まれた海水で 24 時間飼育し、その後分析用の試料として幼生を回収した。

<実験条件：飼育用海水の条件>

- ⑤ 前述 (2) の②に重炭酸ナトリウム ($\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$) と硝酸ナトリウム ($\text{Na}^{15}\text{NO}_3$) を添加し、20 μm 以下の同位体標識した生物 (主に植物プランクトン) を含む海水
- ⑥ 前述 (2) の③に重炭酸ナトリウム ($\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$) と硝酸ナトリウム ($\text{Na}^{15}\text{NO}_3$) を添加し、2 μm 以下の同位体標識した生物 (主にナノ鞭毛虫とバクテリア) を含む海水
- ⑦ 重炭酸ナトリウム ($\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$) と硝酸ナトリウム ($\text{Na}^{15}\text{NO}_3$) を添加した水槽内で飼育したサンゴから放出された同位体標識したサンゴ粘液を含む海水

(4) 分析用試料の採集および固定

安定同位体比分析用の試料は、各実験区の発生段階（ビピンナリア期からブラキオラリア期、図3-2-2）ごとに1検体当たりの個体数を100-250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。①～④の実験条件ごとに使用したPOMの安定同位体比分析用試料は、毎日1試料あたり3～10L程度、培養植物プランクトンは実験期間中4日おき計3回1試料あたり10～20ml程度を、それぞれGF/Fに濾過捕集した。

飼育海水の環境指標として採集現場で水温と塩分を測定した。また、バクテリアとナノ鞭毛虫計測用の海水試料は、それぞれ1%ホルマリンおよび2%グルタルで固定した。実験室に海水を輸送した後、chl. 測定用の試料は直ちにメンブレンフィルター（孔径0.22 μm）で捕集し、また、栄養塩測定用試料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。

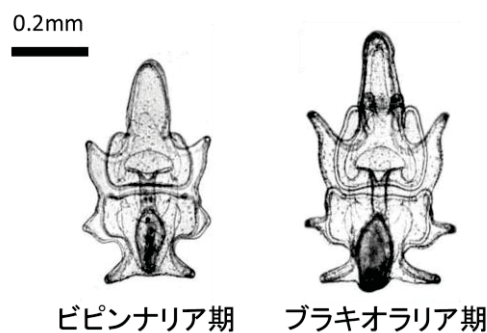


図3-2-2. オニヒトデ幼生のビピンナリア期およびブラキオラリア期の形態

(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量は、オーブンで乾燥（60°C, 24h）後に秤量し、試料採集前後の乾燥重量の差として計算した。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。各試料の同位体比の計算は、同位体比が既知の内部標準と試料との値の差を用いて行い、以下の式に従って求めた：

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

(R_{sample} = 測定試料の同位体存在比、 R_{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)

同位体標識によるトレーサー分析の試料は、自然には存在しえない炭素・窒素安定同位体量を含むため、実験室の分析機器の同位体汚染を起こす可能性がある。そのため、同位体トレーサー試料は委託分析（SI サイエンス社）により EA/IRMS を用いて測定を行った。

(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）をメンブレンフィルター（孔径0.22 μm）上に濾過捕集後、Suzuki & Ishimaru (1990) に準じて DMF（ジメチルホルムアミド）を用いて色素を抽出し、ターナー蛍光光度計（Turner 社）を用いて蛍光を測定した（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）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）は植物プランクトン、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から構成されている。これらは、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（下記詳細）を用いて生物態の有機炭素量（OC）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）から差し引いた残差をデトリタスとして、その炭素量を求めた。

$$OC_{\text{detritus}} \text{ (デトリタス中の有機炭素)} = TOC - OC_{\text{organisms}} \text{ (生物態有機炭素)}$$

$$OC_{\text{organisms}} = B_{\text{phytoplankton}} + B_{\text{nanoflagellate}} + B_{\text{bacteria}}$$

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

植物プランクトン: chl. *a* 濃度 (mg chl. *a* m⁻³) × C:chl. *a* 比 (= 30:1; Persons et al., 1984)

ナノ鞭毛虫: 細胞密度 (cell ml⁻¹) × 細胞当たりの炭素量 (= 183 fg μm⁻³; Caron et al., 1995)

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

chl. *a* 濃度は便宜上単位を測定値の μg-chl. *a* L⁻¹から mg-chl. *a* m⁻³に変換した（単位変換による数値の変化は無い）。ナノ鞭毛虫1個体当たりの体積（μm³）は細胞が紡錘体（楕円体）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。

2-2-3. 結果および考察

（1）各実験区における観察

沖縄県事業に参画する前年（2014年）に、本実験と同様に瀬底実験施設で行ったオニヒトデ幼生の飼育実験（以下、事前実験）では、POMを餌として10日間飼育した結果、ブラキオラリア期に移行する直前のピピンナリア後期まで成長することが確認されたため、本実験では飼育日数を最長18日間まで延長した。また、予備実験では幼生が濾過捕食できる粒子サイズを考慮して、POMのサイズを20 μm以下に設定し、コントロールを孔径0.7 μmのGF/Fを通過した濾液を滅菌海水として使用したが、本実験ではさらにPOMのサイズ分画を細かく分類し、20 μm以下（POM < 20）

と 2 μm 以下 (POM <2) の POM を餌とする実験区と、孔径 0.22 μm のメンブレンフィルターを通過した濾液を滅菌海水で飼育するコントロールを設定した。

逐次行った顕微鏡による観察の結果、事前実験と本実験ともに植物プランクトンで飼育した実験区では飼育 7-10 日目までにはブラキオラリア初期まで成長する幼生を確認した。また、POM <20 の実験区では大半がビピンナリア後期まで成長し、またブラキオラリア期への成長を定義づけるブラキオラリア腕が発生し始めた幼生も一部確認された。さらに、滅菌海水で飼育した対照区ではビピンナリア初期から、体長もある程度大きく成長した後、ビピンナリア後期に達する前に飼育日数に伴って体長が顕著に収縮する様子が観察されたが、POM <2 の実験区では収縮は見られず、ビピンナリア後期まで成長する個体も一部確認された。

(2) オニヒトデ幼生による POM の同化

サイズ分画した POM による飼育実験における安定同位体比測定の結果を、図 3-2-3 (上、予備実験；下、本実験) に示した。予備実験、本実験のどちらにおいても、POM を与えた実験の幼生および POM 試料の窒素安定同位体比 ($\delta^{15}\text{N}$) の測定誤差は $\pm 1.1\%$ とやや大きかったが、これは試料中の窒素量が非常に少なかったためであると考えられる。一方、炭素安定同位体比 ($\delta^{13}\text{C}$) の測定誤差は $\pm 0.2\%$ と小さかった。実験に用いたオニヒトデの雌雄成体および卵巣・精巣 (Adults) の $\delta^{13}\text{C}$ 値は ca. $-15 \sim -12\%$ と大きく、これはオニヒトデが食するサンゴ種の $\delta^{13}\text{C}$ 値 (ca. $-16 \sim -12\%$) を反映している。

予備実験の緑藻類 *Dunaliella* sp. ($\delta^{13}\text{C} = -25.3\%$) と珪藻類 *Chaetoceros* sp. ($\delta^{13}\text{C} = -19.2\%$) の混合液 (細胞密度は不明だが混合比率は体積比で $v:v = 1:1$ 、 $\delta^{13}\text{C} = -21.2\%$) を与えた実験区では、飼育 8 日目までにブラキオラリア期に到達し、最終的に幼生の同位体比は *Dunaliella* sp. に近い値を示した (図 3-2-3)。また、*Dunaliella* sp. の $\delta^{13}\text{C}$ 値はオニヒトデの幼生の $\delta^{13}\text{C}$ 値 ($\sim -15\%$) と大きく異なることから、幼生による同化の指標になることを示している。これらの結果を踏まえて本実験では *Dunaliella* sp. のみを餌として与えた。その結果、幼生の安定同位体比は、飼育日数の経過とともに $\delta^{13}\text{C}$ の値が徐々に小さくなり、実験終了時には *Dunaliella* sp. (ca. $-22 \sim -23.5\%$) の値とほぼ同じ値 (ca. -22%) を示した (図 3-2-3) ことから、オニヒトデ幼生は成長過程で餌の同種を同化していることを示している。

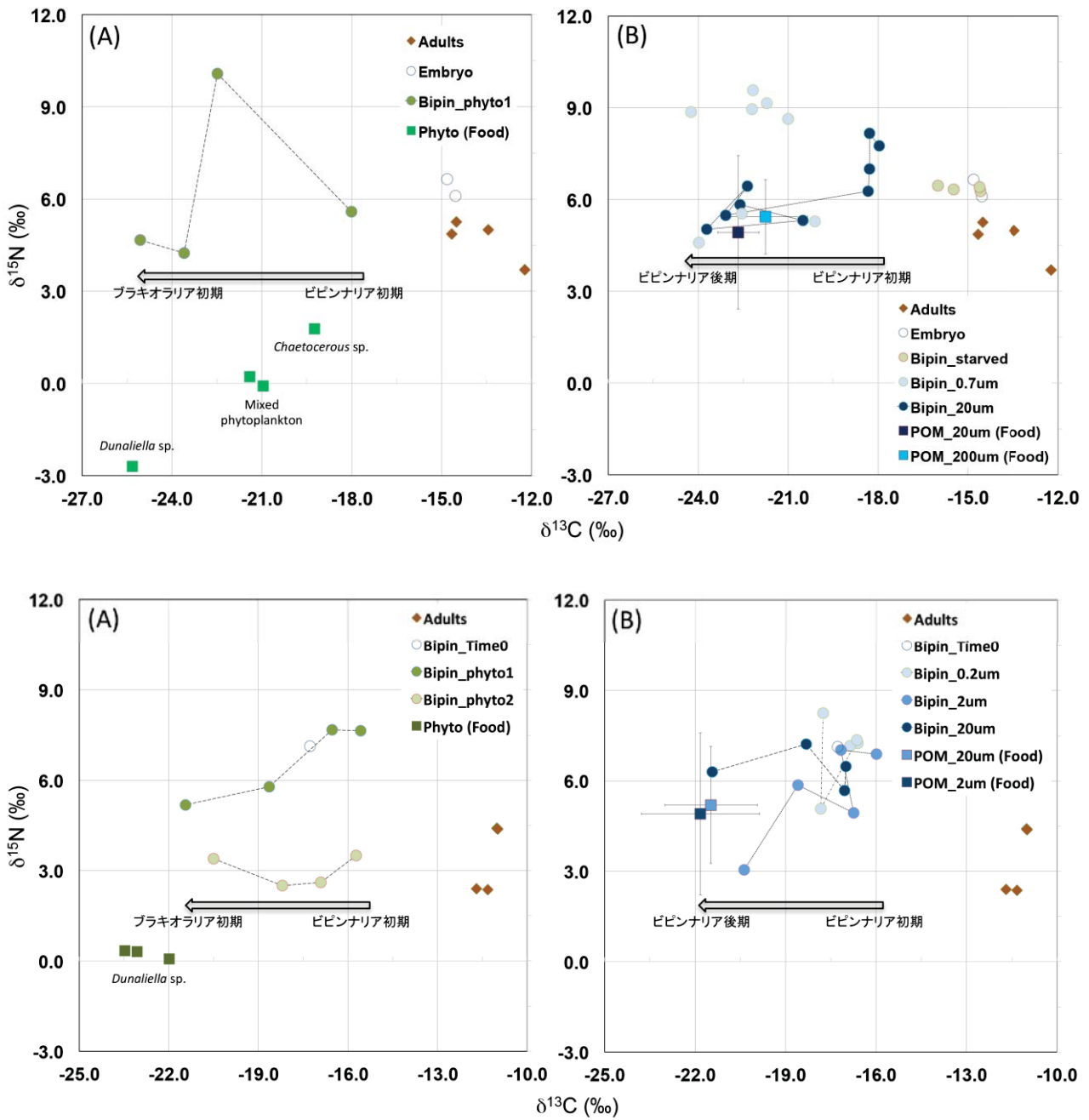


図3-2-3. 事前実験(上)および本実験(下)の、植物プランクトンを餌とした実験区(A)と、POMを餌とした実験区(B)における、オニヒトデ幼生(ビピンナリア: Bipin)及び成体(Adults)と各実験区の餌(Food)の炭素・窒素安定同位体比($\delta^{13}\text{C}$ ・ $\delta^{15}\text{N}$)。

事前実験において $<200\ \mu\text{m}$ と $<20\ \mu\text{m}$ のサイズに分画したPOM(図3-2-3(上B)、POM $_{200\ \mu\text{m}}$ (Food)とPOM $_{20\ \mu\text{m}}$ (Food))と、本実験においてより細かく「 $20\ \mu\text{m}$ 以下」と「 $2\ \mu\text{m}$ 以下」に分画したPOM(図3-2-3(下B)、POM $_{20\ \mu\text{m}}$ (Food)とPOM $_{2\ \mu\text{m}}$ (Food))の安定同位体比は、いずれも $\delta^{15}\text{N}$ 値はca. 5‰、 $\delta^{13}\text{C}$ 値はca. -22.0‰で、サイズによる有意差はなかった。採水日による安定同位体比の変動幅は、 $\delta^{15}\text{N}$ では $\pm 2\sim 3\%$ 、 $\delta^{13}\text{C}$ では $\pm 1\sim 2\%$ で、より小さいサイズのPOMの方が変動は小さかった。炭素安定同位体比の変動要因として考えられることは、より大きな粒子($<20\ \mu\text{m}$)に炭素安定同位体比が低い陸上C3植物由来の粒子($<-25\%$)などが、天候や潮汐によって異なる比率で混入した可能性である。一方、窒素安定同位体比の変動要因は、流入する栄養塩(e.g. 陸水の流入等により影響される海水中の NH_4^+ や NO_3^- など)の同位体比自体が変動することや、またそれを利用して生産される有機物の $\delta^{15}\text{N}$ 値も変動すること、さらに微生物による消化や脱窒作用の程度によっても値が変化することなどが考えられる。またPOM中の窒素含有量が少なく、そのため測定誤差がやや大きくなったことも考えられる。予備実験では自然海水中のPOMを与えて飼育したが、幼生の安定同位体比($\delta^{13}\text{C}$ 値および $\delta^{15}\text{N}$ 値)はともに低下し、ビピンナリア後期に達する飼育7日目にはPOMとほぼ同じ値に変化した(図3-2-3)。一方、GF/Fフィルター(孔径 $0.7\ \mu\text{m}$)に捕集される有機物粒子をPOMとして定義し、これを通過した溶存態画分には幼生が捕食できる粒子がほとんど存在しないことを考慮して本実験の対照区として設定したが、 $0.7\sim 20\ \mu\text{m}$ のPOMを与えた実験区と同様、POMを与えずに飼育したオニヒトデ幼生の $\delta^{13}\text{C}$ 値は低下していく傾向が示された(図3-2-3)。個別の飼育容器による実験と並行して、中型の水槽を用いて、餌となる有機粒子を全く与えず、水を数日おきに交換したのみの幼生(Bipin-starved)の同位体比は、孵化後から最低でも7日間はその安定同位体比はほとんど変化しなかったことから、この場合、幼生は外部から栄養素を取り入れることがなく、孵化時点でもっていた栄養素を消費して生きていたことを示唆している。したがって、POMを与えずに飼育したオニヒトデ幼生の $\delta^{13}\text{C}$ 値が低下したことは、 $0.7\ \mu\text{m}$ 以下の濾過海水にも微小なバクテリアや有機粒子が存在しており、それらがオニヒトデ幼生の餌資源として利用されたために幼生の同位体比が変化した可能性がある。

本実験のPOM <20 の実験区およびPOM <2 の実験区では、両実験区ともに幼生の $\delta^{13}\text{C}$ 値は徐々に低下し、実験終了時前までにPOMに近い値へと変化した。既報の研究では、オニヒトデ幼生は濾過捕食する際に機能する繊毛の間隔や口の大きさから $2\ \mu\text{m}$ 以下の粒子(シアノバクテリアなど)は物理的に捕食しづらいため、幼生の餌としての寄与は小さいと考えられていたが(Ayukai 1994)、本研究の結果はオニヒトデ幼生が $2\ \mu\text{m}$ 以下のPOMも同化していることを示している。POMを与えていない条件では実験開始後一週間ほどで幼生の体が収縮を始め、死滅していく個体が観察されたのに対して、 $2\ \mu\text{m}$ 以下のPOMを与えた幼生は実験終了時までにはビピンナリア後期まで成長し、コントロール区のような体の萎縮は見られなかったことから、 $2\ \mu\text{m}$ 以下のPOMも幼生の餌資源としてある程度貢献している可能性が示された。しかしながら、 $20\ \mu\text{m}$ 以下のPOMを与えた幼生はブラキオラリア初期まで成長する個体が多数確認されたのに対して、 $2\ \mu\text{m}$ 以下の実験区ではブラキオラリア期へ成長した個体が見られなかったことから、幼生の健全な成長にはPOMに含まれる有機物の質や量が関与していることを示唆している(詳細は(5)「餌としてのPOMの量的・質的評価」に後述)。

(3) 安定同位体標識した餌の捕食・同化実験 (実験 B)

オニヒトデ幼生による POM の同化についてより詳細な知見を得るために、重炭素 (^{13}C) と重窒素 (^{15}N) で同位体標識した栄養塩を取り込んだ微小生物 (2 μm および 20 μm 以下の POM) が含まれる条件下でオニヒトデ幼生を飼育し、それらの同化の有無を明らかにするために行った実験の結果を表 3-2-1 に示す。自然界では生物を構成する有機物の $\delta^{13}\text{C}$ 値は -30 ~ -5 ‰程度、 $\delta^{15}\text{N}$ 値は 0 ~ 15 ‰程度であることから、標識された栄養塩を取り込んだ試料との区別が可能である。同位体標識した栄養塩を取り込んだ微小生物を含む餌資源である POM (デトリタス) とサンゴ粘液の $\delta^{13}\text{C}$ 値および $\delta^{15}\text{N}$ 値はいずれも顕著に増加したことから (デトリタス、 $\delta^{13}\text{C}$ 値: 1240 ‰、 $\delta^{15}\text{N}$ 値: 50560 ‰; サンゴ粘液、 $\delta^{13}\text{C}$ 値: 359 ‰、 $\delta^{15}\text{N}$ 値: 1683 ‰)、POM やサンゴ粘液には同位体標識した栄養塩が取り込まれていることを示している。さらに、これらを餌として与えたオニヒトデ幼生の同位体比の値も同様に増加した (デトリタスを餌、 $\delta^{13}\text{C}$ 値: 47.3 ~ 337 ‰、 $\delta^{15}\text{N}$ 値: 1162 ~ 5734 ‰; サンゴ粘液を餌、 $\delta^{13}\text{C}$ 値: 69.7 ‰、 $\delta^{15}\text{N}$ 値: 181 ‰) ことから、幼生が POM に含まれている同位体標識された微小生物やサンゴ粘液を同化したことを明らかに示している。POM が含まれていない系列 (without POM) で飼育した幼生の同位体比も増加した ($\delta^{13}\text{C}$ 値: 25.5 ‰、 $\delta^{15}\text{N}$ 値: 756 ‰)。これは、飼育海水中に溶存態として存在する標識試薬由来の炭素や窒素が幼生の細胞膜を通して取り込んだ可能性が考えられた。または、容器内に微量に存在していたバクテリア等が係留培養時に増殖し、その際に標識された有機粒子を餌として同化した可能性もある。いずれにしても、本実験によって POM 中の微小生物も幼生の餌として寄与していることを示している。

表3-2-1. 同位体標識をした POM 及びサンゴ粘液で飼育した幼生 (実験 B) と未標識の POM で飼育した幼生 (実験 A) と餌有機物の炭素・窒素含有量, C:N 比、炭素窒素安定同位体比. アスタリスク(*)は委託分析ではなく、本研究室による分析. n/d は not determined を示す.

	n	TOC (%)	TN (%)	C/N	^{13}C (Atom%)	^{15}N (Atom%)	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)
With isotope label (Exp. B)								
Late bipinnaria								
without POM (<0.2 μm)	2	n/d	n/d	n/d	1.13	0.64	25	756
with POM (<2 μm)	2	n/d	n/d	n/d	1.16	0.79	47	1162
with POM (<20 μm)	2	n/d	n/d	n/d	1.47	2.39	337	5734
with labeled-coral mucus	3	n/d	n/d	n/d	1.18	0.43	70	181
Food source								
Detritus (0.2-20 μm)	1	6.89	0.65	10.6	2.45	15.9	1243	50561
Coral mucus	3	0.15	0.02	7.22	1.50	0.98	359	1683
Without isotope label								
Late bipinnaria								
Control	2	n/d	n/d	n/d	1.09	0.38	-13.2	38.9
without POM (<0.2 μm)*	5	15.5	1.71	10.6	n/d	n/d	-17.1	7.02
with POM (<2 μm)*	5	10.3	1.78	7.41	n/d	n/d	-17.6	5.71
with POM (<20 μm)*	5	28.0	3.92	6.93	n/d	n/d	-18.4	6.47
Food source								
POM (<2 μm)*	10	25.9	3.64	6.93	n/d	n/d	-22.3	8.51
POM (<20 μm)*	10	12.4	1.73	6.99	n/d	n/d	-21.0	7.58

(4) 海水中の各栄養塩濃度と微小生物の現存量

実験期間中の栄養塩濃度は、台風上陸による降雨量の一時的な増大により陸域から沿岸域に栄養塩が流れ込んだために一時的に急激な増加が見られたが、それ以外ではアンモニア態窒素は $0.85\sim 1.41\ \mu\text{mol L}^{-1}$ 、リン酸塩は $0.03\sim 0.18\ \mu\text{mol L}^{-1}$ 、硝酸・亜硝酸態窒素は $0.8\sim >10\ \mu\text{mol L}^{-1}$ (検出上限を超えたため濃度不明)、ケイ酸塩は $1.6\sim 22.5\ \mu\text{mol L}^{-1}$ の値で推移した (図 3-2-4)。この栄養塩の増加に対応するように、まずバクテリアの密度が増加した後に chl. *a* 濃度が上昇する様子が確認された (図 3-2-5)。また、バクテリアの細胞密度のピークが見られた直後に、それらを捕食する鞭毛虫の細胞密度が増加する傾向も見られた。

既報の研究により、オニヒトデ幼生は周辺海水の chl. *a* 濃度が $0.25\ \mu\text{g L}^{-1}$ だと餌不足で大半が死滅し、 $0.25\sim 0.80\ \mu\text{g L}^{-1}$ だと生存率が半分程度まで低下することが知られている (Fabricius et al. 2010)。飼育実験の期間中、自然海水の chl. *a* 濃度は POM <2 (Fig. 1.6 ; $0.2\sim 2\ \mu\text{m}$) の実験区と POM <20 ($0.2\sim 20\ \mu\text{m}$) の実験区で、それぞれ $0.08\sim 0.22$ 、 $0.16\sim 0.40\ \mu\text{g L}^{-1}$ の値で推移し (図 3-2-5)、ほとんど幼生が健全に成長できる chl. *a* 濃度 ($>0.80\ \mu\text{g L}^{-1}$) 以下で、特に POM <2 の実験区では、大半が死滅するとされる濃度 ($<0.25\ \mu\text{g L}^{-1}$) を常に下回っていた。バクテリア (従属栄養細菌とシアノバクテリア) とナノ鞭毛虫 (従属栄養・独立栄養ナノ鞭毛虫) の細胞密度はそれぞれ $2.9\sim 7.6\times 10^8\ \text{cell L}^{-1}$ 、 $6.1\sim 16.1\times 10^5\ \text{cells L}^{-1}$ で推移しており (図 3-2-5)、これは過去に宮古島沿岸域で報告されている値と同程度の範囲であった (Casareto et al. 2000)。chl. *a* 濃度の変動と比較してみると、植物プランクトンが少ない時にバクテリアや鞭毛虫の細胞密度が高い傾向があり、少ない植物プランクトンだけでなく、これらの微生物もオニヒトデ幼生の餌資源として貢献し得る可能性が考えられた。

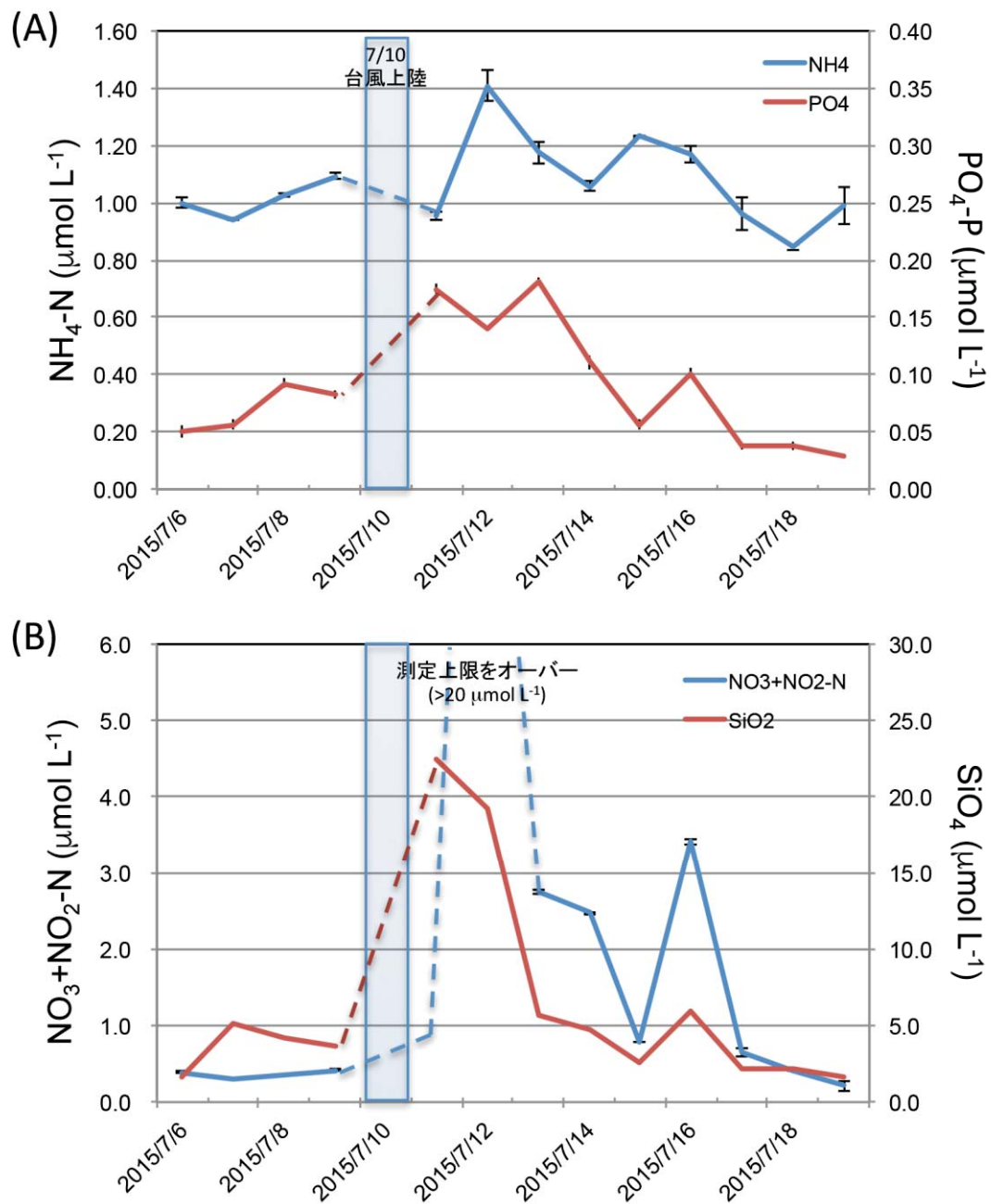


図3-2-4. 実験期間中の飼育に用いた自然界水中の栄養塩濃度. (A)アンモニア態窒素とリン酸塩, (B) 硝酸・亜硝酸態窒素とケイ酸塩. 青枠は台風上陸時.

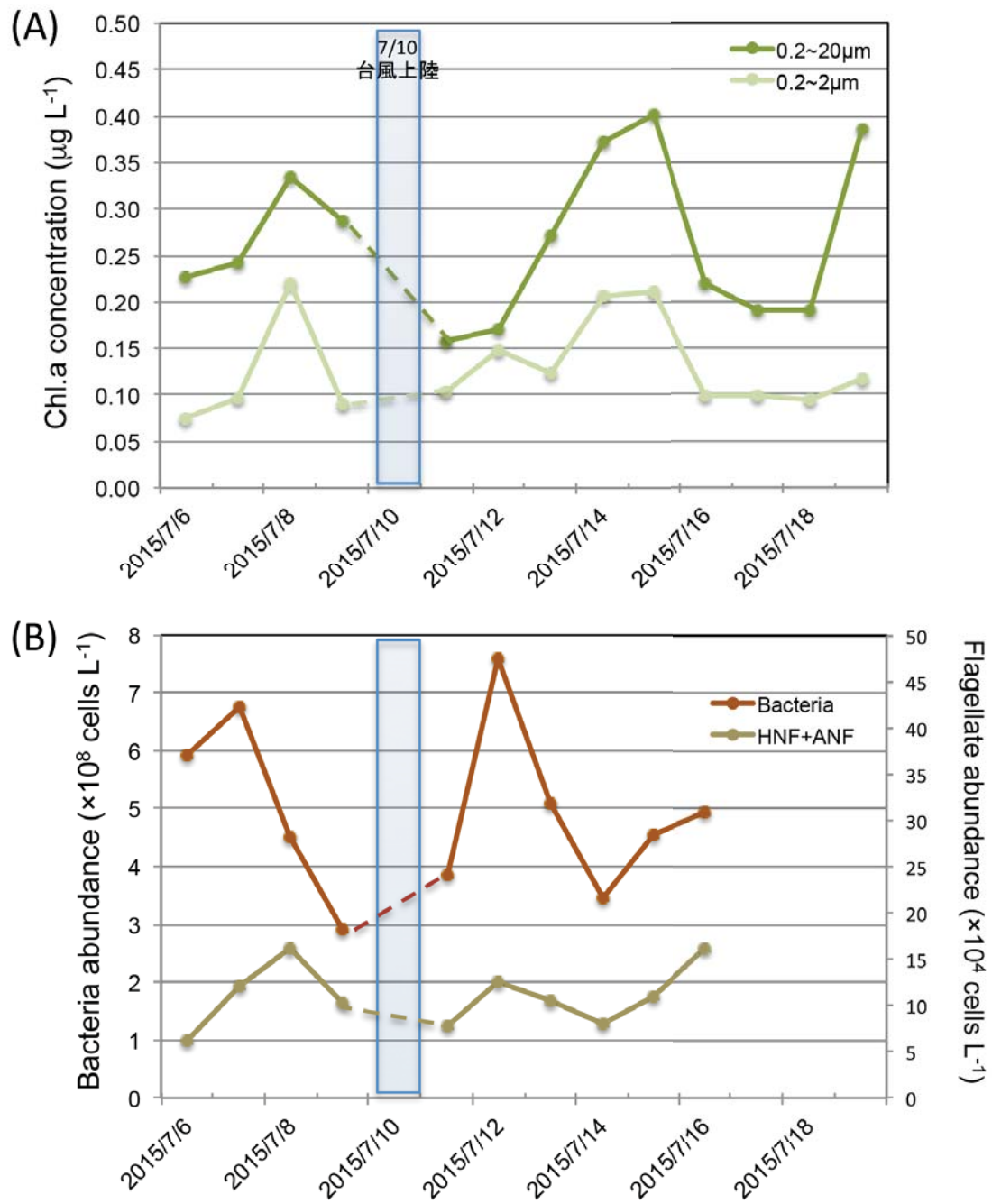


図3-2-5. 実験期間中の飼育に用いた自然界水中の微小生物の細胞密度. (A) 各サイズ画分の chl.a 濃度, (B) バクテリアとナノ鞭毛虫の細胞密度. 青枠は台風上陸時.

(5) 餌資源としての POM の量的・質的評価

前項で示した POM を構成する各成分を有機炭素量に換算し、実験期間中におけるそれらの構成比とそれらの合計値の推移を図 3-2-6 に示す（ナノ鞭毛虫は POM <2 の実験区では除外）。各成分の相対存在比をみると、POM <20 の実験区ではデトリタス由来の炭素が常に 50 %以上と最も多く、最大で 93.1%を占める場合もあった（図 3-2-6 a）。一方、POM <2 の実験区では、バクテリア由来の炭素が大きな割合（18.3~73.3%）を占めており、次いでデトリタス由来の炭素が大きく貢献していた（図 3-2-6 b）。また、植物プランクトン由来の炭素が占める割合は最大でも POM <20 の実験区で 20.7%、POM <2 の実験区で 30.8%であり、ナノ鞭毛虫の相対存在比は小さかった。この結果は、オニヒトデ幼生が周囲の有機物粒子を非選択的に濾過捕食していると仮定すると、POM <20 の実験区ではデトリタスを、POM <2 の実験区ではバクテリア（シアノバクテリアを含む）を主な炭素源としていることを意味している。

POM <20 の実験区および POM <2 の実験区の炭素濃度は $47.5 \sim 225.9 \text{ mgC L}^{-1}$ および $13.1 \sim 30.5 \text{ mgC L}^{-1}$ で推移し、最大で 17 倍の差が見られた（図 3-2-6 c, d）。この差は、バクテリアと植物プランクトン由来の炭素量は POM の各画分の間で顕著な差がないことから、デトリタス由来の炭素量の違いに由来していることを示している。

幼生の餌要求量の指標としてよく用いられる $C:chl. a = 30:1$ (Parsons et al. 1984) の比を用いて $chl. a$ 濃度を炭素量換算し、餌要求量を満たす濃度 ($0.80 \mu\text{g-chl. a L}^{-1}$) と餌が欠乏する POM 中の炭素濃度 ($0.25 \mu\text{g L}^{-1}$) をそれぞれ「Compensating level」と「Critical level」として図中に示し、その濃度の比較を行った。両画分を比較すると、POM <20 の実験区では $chl. a$ だけで Critical level は概ね超えており、バクテリアとナノ鞭毛虫を合算した生物態有機炭素で Compensating level の 9 割近くに達している。しかしながら、POM <2 の実験区では $chl. a$ だけでは Critical level を超えず、デトリタスを含めた全有機炭素量でも Compensating level に達していなかった。本研究の実験では、POM <20 の実験区と POM <2 の実験区ともに、実験終了時の 14 日目までオニヒトデ幼生の生存率は 80%以上あったことから、植物プランクトンだけで Critical level を超えていない POM <2 の実験区では POM に含まれるバクテリアやデトリタスなどを主な炭素源として生存していたことを示唆している。

さらに本研究では、POM <20 と POM <2 の両実験区において、幼生の炭素安定同位体比の推移からどちらも POM を利用しているという結果が得られたが、幼生の発生段階の到達度には顕著な違いが見られた。すなわち、POM <20 の実験区では実験終了時まで多くの幼生がブラキオラリア初期に到達したのに対して、POM <2 の実験区ではブラキオラリア期に到達する個体はほとんどなかった。これは POM <2 の実験区における有機炭素の総量がオニヒトデ幼生の健全な成長に必要な量に達していなかったことが原因の一つであることを示唆している。

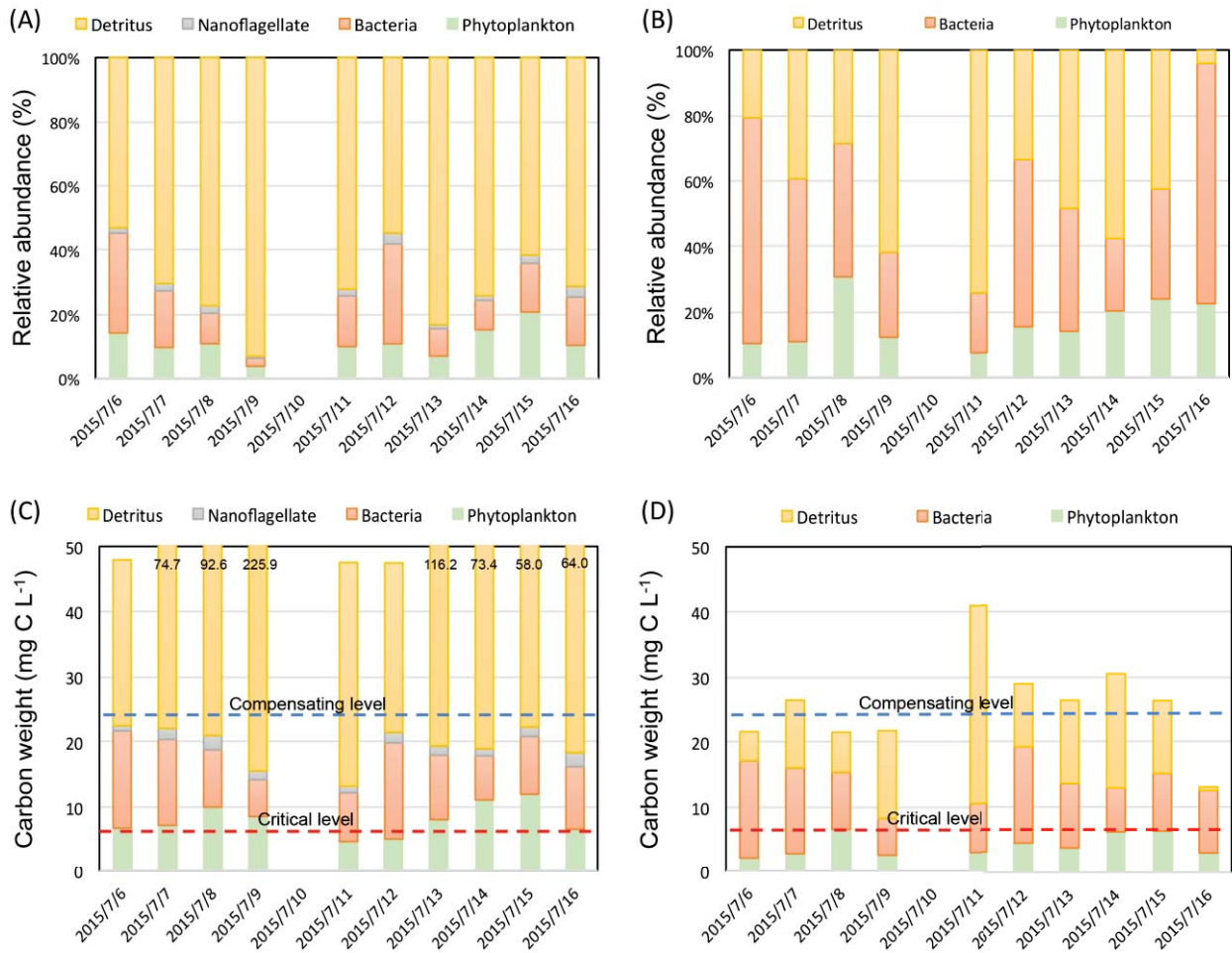


図3-2-6. 炭素量換算した POM 中を構成する植物プランクトン、バクテリア、ナノ鞭毛虫、デトリタスの相対存在比と濃度。(A)POM < 20 μm の実験区と(B)POM < 2 μm の実験区中の相対存在比;(C)POM < 20 μm と(D)POM < 2 μm 中の濃度。図中の赤点線は餌欠乏状態の濃度 (chl.a = 0.25 μg L⁻¹ を炭素量換算), 青点線は幼生の餌要求量を満たす濃度 (chl.a = 0.80 μg L⁻¹ を炭素量換算)を示す。

生存可能性の観点では、植物プランクトン由来の炭素量が少なくてもデトリタスやバクテリア由来の炭素量が餌要求量を満たしていれば、オニヒトデ幼生は生存が可能であると言える。しかし成長段階の観点から見ると、十分な炭素源が存在していたとしても、ブラキオラリア期やその後の成長には、餌の質的な要求を満たす必要があることを示唆している。たとえば窒素を比較的豊富に含む植物プランクトンやバクテリアなどの生物態有機物に比べ、生物の死骸や糞などの分解産物であるデトリタスは窒素に乏しいため（C/N比：10.6、表3-2-1）、必要栄養素の一つであるタンパク質は少ないことや分解産物であることから質的にも悪いタンパク質であることも考えられるからである。したがって、炭素量だけでなく、タンパク質や脂質など必須栄養素の観点からの評価が必要であることを示唆している。

2-2-4. まとめ

- POM を餌としてオニヒトデ幼生を飼育する実験において、オニヒトデ幼生の炭素・窒素安定同位体比は次第に POM の安定同位体比に接近していくことから、オニヒトデ幼生は POM を摂餌し、同化していることが明らかとなった。
- これまでは $2\ \mu\text{m}$ 以下の微小生物の餌資源としての寄与は低いと考えられていたが、バクテリアやデトリタスが炭素量として一定程度存在していれば、オニヒトデ幼生はそれらも餌資源としてビピンナリア後期までは成長し、少なくとも 2 週間は生存できることも明らかとなった。
- 植物プランクトン由来の炭素量が少なくてもデトリタスやバクテリア由来の炭素量が餌要求量を満たしていれば、オニヒトデ幼生は生存が可能であるが、十分な炭素源が存在していたとしても、ブラキオラリア期やその後の成長には、餌の質的な要求を満たす必要があることがわかった。

2-3. オニヒトデ浮遊幼生期の成長と餌資源の質的評価

2-3-1. 背景と目的

平成 27 年度（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法を応用してオニヒトデ幼生の培養実験を行った。その結果、POM を含まないコントロールでは、ビピンナリア中期まで成長した後に退化（収縮）；植物プランクトンで培養した実験区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.）の値に近似していく傾向を確認；POM を含む実験区ではビピンナリア後期まで成長し、植物プランクトンを餌とした時と同様に安定同位体比は POM の値に近似した。このことから、少なくともオニヒトデ幼生は POM を餌として同化し、ある程度の栄養を獲得していることが明らかになった。さらに、これまでは自然環境下の幼生の餌として微小生物（ $< 2 \mu\text{m}$ ）の寄与率は低いと考えられていたが、この実験で $2 \mu\text{m}$ 以下の POM（POM <2 、バクテリアや生物の死骸などのデトリタスを含む有機粒子）も餌として同化していることが示され、オニヒトデ幼生はそれらの POM だけで少なくとも 2 週間は生存できることも明らかになった。

さらに、幼生が同化した POM を質的・量的に評価するために、実験期間中の飼育海水に含まれる POM の構成と炭素量を概算した結果、 $20 \mu\text{m}$ 以下の POM を餌とした実験区（POM <20 の実験区）では常にデトリタス由来の炭素が最も多く、50%以上（最大で 93.1%）を占めること、POM <2 の実験区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示された。これらの結果から、オニヒトデ幼生は必ずしも植物プランクトンだけでなく、デトリタスを利用している可能性があることが示唆された。デトリタスは生物の死骸や糞などの分解生成物であることから、炭素が多く窒素が少ない有機物（タンパク質よりも炭水化物が多い栄養価の低い餌）である可能性が高く、デトリタスだけを餌とした場合に植物プランクトンと同等の栄養を獲得していることは考えにくい。この点を明らかにすることでデトリタスの質的評価が期待できるが、自然海水中の有機物からデトリタスだけを分取することは技術的に非常に困難であることもあり、デトリタスをオニヒトデ幼生の餌として考慮した研究はごくわずかで十分な議論がされていない（Olson 1987）。

以上を踏まえ、本研究では擬似的にデトリタス様有機物を作成してオニヒトデ幼生に給餌する飼育実験を行い、その同化の有無や成長の度合いを解析することで、餌の質と成長の関係性を明らかにすることを目的とした。

2-3-2. 材料と方法

（1）幼生培養実験の概要

オニヒトデ幼生の培養実験は、平成 27 年度の研究と同様に 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。同年 6 月末に瀬底島付近で採集されたオニヒトデ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、事前調査により chl. *a* 濃度が他の採水可能地点より高かった沖縄県本部町山川港付近（ $26^{\circ} 40' 33.4'' \text{N}$ 、 $127^{\circ} 53' 00'' \text{E}$ ）で採取し、その後速やかに実験室に持ち帰って濾過を行った。

(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 3-2-7 (上) に示した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^{-1}) になるように調整するために培養瓶 (2,000 mL) あたり 200 個体の条件で培養した。実験区は、餌資源の異なる海水として図 3-2-7 (下) に示した 5 系列の条件で培養実験を行った。

<実験条件>

Exp. A-1 : 孔径 20 μm のナイロンメッシュで濾過した海水 (生物態 POM+デトリタス)

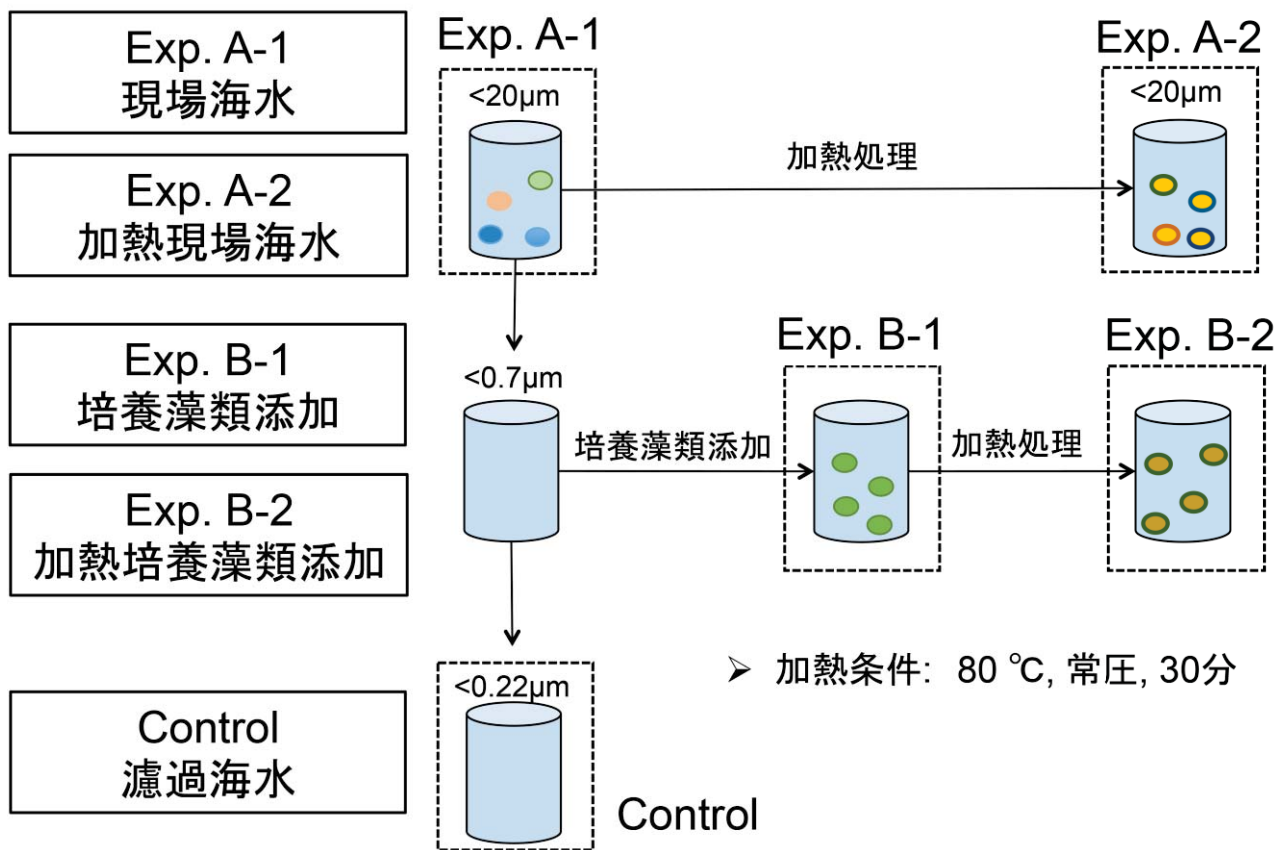
Exp. A-2 : Exp. A-1 の海水を加熱処理した海水 (非生物態 POM+デトリタス)

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 μm 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 3-2-2) 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 ($28.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$) に調整して飼育培養した。



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3-2-7. 各実験系列の設定条件の概要(上)と飼育用海水に含まれる主な有機物(下)

(3) 加熱処理によるデトリタス様有機物の作成

Exp. A-2 と B-2 の実験条件の餌として用いるデトリタス様有機物を擬似的に作成するために、前項に示す方法で採取された自然海水と、藻類を適当な濃度に調整して添加した飼育用海水をそれぞれ耐熱容器に分注し、オートクレーブを用いて加熱処理 (80° C、30 min) を行なった。毎日行なった海水交換の際に間に合う様にこれらの処理を行い、処理水の水温を幼生の至適生育温度まで調節して実験に使用した。

(4) 成長度測定

各実験系列の Day 4、7、10、13 において幼生の採集と共に成長度測定を行った。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。また、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。成長段階は、着底部位へと変化する個体上部の腕の形状やブラキオラリア幼生に特有の個体上部に発生する突起 (ブラキオラリア腕) の有無などから成長段階 (初期・後期ビピンナリア、初期・中期ブラキオラリア、退化および奇形) を判別した。オニヒトデ幼生は、図 3-2-2 で示したようにビピンナリア期からブラキオラリア期へと成長するに伴い、体の伸長と同時に凹凸がより明確になる傾向にある。しかし、後期ビピンナリアやブラキオラリア期へと成長した後に十分な栄養を獲得できない状態が続くと、個体によっては急激に歪んだ形状に変化して明らかな成長不全が認められる場合と、徐々に体が収縮しながら凹凸が浅くなる場合がある。前者の場合は、異常な形状や著しい体の収縮 (凹凸がほとんど無い粒状にまで矮小化) を観察することで判別が可能である。しかし後者の場合、幼生個体は一度成長した後に初期ビピンナリアに似た体型になると成長段階が戻ったように見えることがあるため、本稿ではこれを「後退」または「退化」と呼称する。成長度測定の際には、「奇形・退化・後退」にあたる健常個体以外の幼生を総称して Abnormal (異常個体) として扱った。

(5) 安定同位体比分析用試料の採集および固定

安定同位体比分析用の試料は、各実験系列の Day 0、4、7、10、13 において 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 1~3 L 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。

(6) Chl. *a* 濃度、全炭素・窒素安定同位体比測定方法

Chl. *a* と安定同位体比の測定は、前述の実験と同様の方法で行った (2-2-2. (5)、(6) 参照)。

(7) 幼生の餌の同化による炭素・窒素置換率 (同化率) の計算

餌の $\delta^{13}\text{C}$ 値および $\delta^{15}\text{N}$ 値と孵化直後のオニヒトデ幼生の $\delta^{13}\text{C}$ 値および $\delta^{15}\text{N}$ 値をエンドメンバーとして、各実験系列におけるオニヒトデ幼生の $\delta^{13}\text{C}$ 値および $\delta^{15}\text{N}$ 値の変化から、幼生を構成する炭素と窒素が、餌として外部から取り込んだ炭素・窒素に置換された割合を求めた。置換率は、以下の式によって求めた。なお置換率の計算は、幼生によって摂取された餌の炭素・窒素同位体比が幼生体内にそのまま反映されると仮定し、その同化の際に起こり得る同位体分別効果は考慮していない。同位体分別効果は生物体内の酵素反応などにより、通常同位体的に軽い炭

素・窒素がより早く反応することによって起こるが、その同位体分別係数の値がオニヒトデでは不明なためである。

$$\text{炭素あるいは窒素の置換率 (\%)} = \{(\delta X_{\text{幼生}} - \delta X_{\text{幼生_孵化後}}) / (\delta X_{\text{餌}} - \delta X_{\text{幼生_孵化後}})\}$$

ここで、 δX は $\delta^{13}\text{C}$ 値または $\delta^{15}\text{N}$ 値を、 $\delta^{13}\text{C}$ または $\delta^{15}\text{N}_{\text{幼生}}$ は各実験系列における幼生の安定同位体比を、 $\delta^{13}\text{C}$ または $\delta^{15}\text{N}_{\text{幼生_孵化後}}$ は孵化直後の幼生の安定同位体比を、 $\delta^{13}\text{C}$ または $\delta^{15}\text{N}_{\text{餌}}$ は餌の平均安定同位体比の値を表す。

2-3-3. 結果および考察

(1) 実験期間中における各実験系列の chl. a 量の変化

培養実験中の各実験系列における chl. a 濃度の継時変化を図 3-2-8 に示す。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、ほぼオニヒトデ幼生の餌要求量を満たす量の餌が存在していた。Exp. A-2 では、平均 chl. a 濃度が $0.22 \pm 0.05 \mu\text{g L}^{-1}$ で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。一方、Exp. B-1 では常に餌要求量を満たす濃度に設定（平均 chl. a 濃度： $1.01 \pm 0.15 \mu\text{g L}^{-1}$ ）し、加熱処理をした餌を含む Exp. B-2 では平均 chl. a 濃度は $0.14 \pm 0.08 \mu\text{g L}^{-1}$ で Exp. A-2 と同様に幼生の餌要求量を下回る濃度であった。

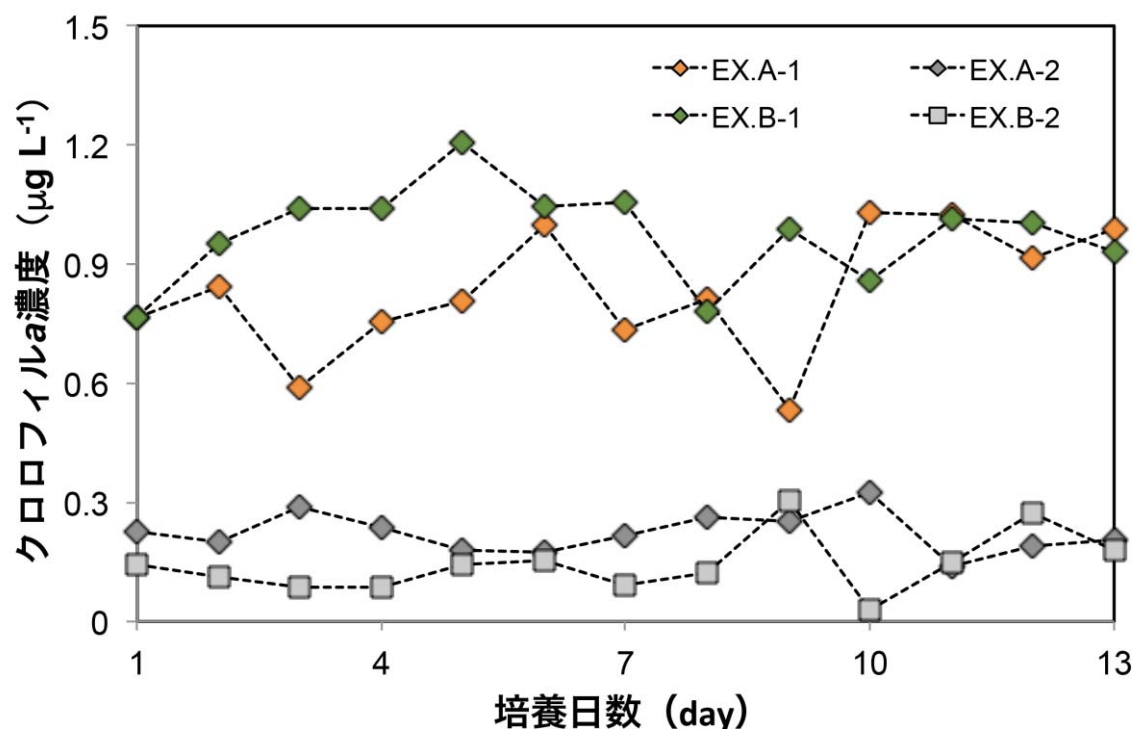


図3-2-8. 各培養日数における自然海水および藻類添加海水と、その海水を熱処理した後の chl. a 濃度. 各点は Exp.A-1(自然海水), Exp.A-2(加熱処理自然海水), Exp.B-1(藻類添加海水), Exp.B-2(加熱処理藻類)を示す.

成長率が低かった Exp. A-2 と Exp. B-2 では平均 chl. *a* 濃度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 Exp. B-1 は餌要求量を満たす濃度であったことから、加熱処理による顕著な chl. *a* 濃度の低下は成長率に大きな影響を与えたことを示唆している。Exp. A-1 と Exp. B-1 を比較すると、平均 chl. *a* 濃度が低い Exp. A-1 の方が成長率は高かった。平均 chl. *a* 濃度としての餌要求量を満たしていない Exp. A-2 でも一部の幼生がブラキオラリア幼生初期まで成長したことから、加熱処理をした場合でも POM が餌としてある程度有効であることが示唆された。これらのことは、chl. *a* 濃度が幼生の餌要求量の指標として有用かどうか、検討する必要があることを示している。

(2) 各実験系列における成長率

本実験において適時行った成長段階の測定結果を図 3-2-9 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 3-2-10 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 および植物プランクトンを含まない Control では、約 10% 弱程度がビピンナリア後期まで成長した。その後は各実験系列において次第に違いが大きくなった。

実験系列 Exp. A-1 では、ビピンナリア後期以降までの成長の割合が Day 4、7、10、13 でそれぞれ 31、89、98、99% 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、89、54、53% と Day 10 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、70、86、84% 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 でも同じくビピンナリア後期以降までの成長の割合が 6、13、71、65% と概ね高くなっていったが、ブラキオラリアまで成長した個体はみられず、むしろ退化するものが確認された。一方、Control では 8、1、17、15% とビピンナ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。

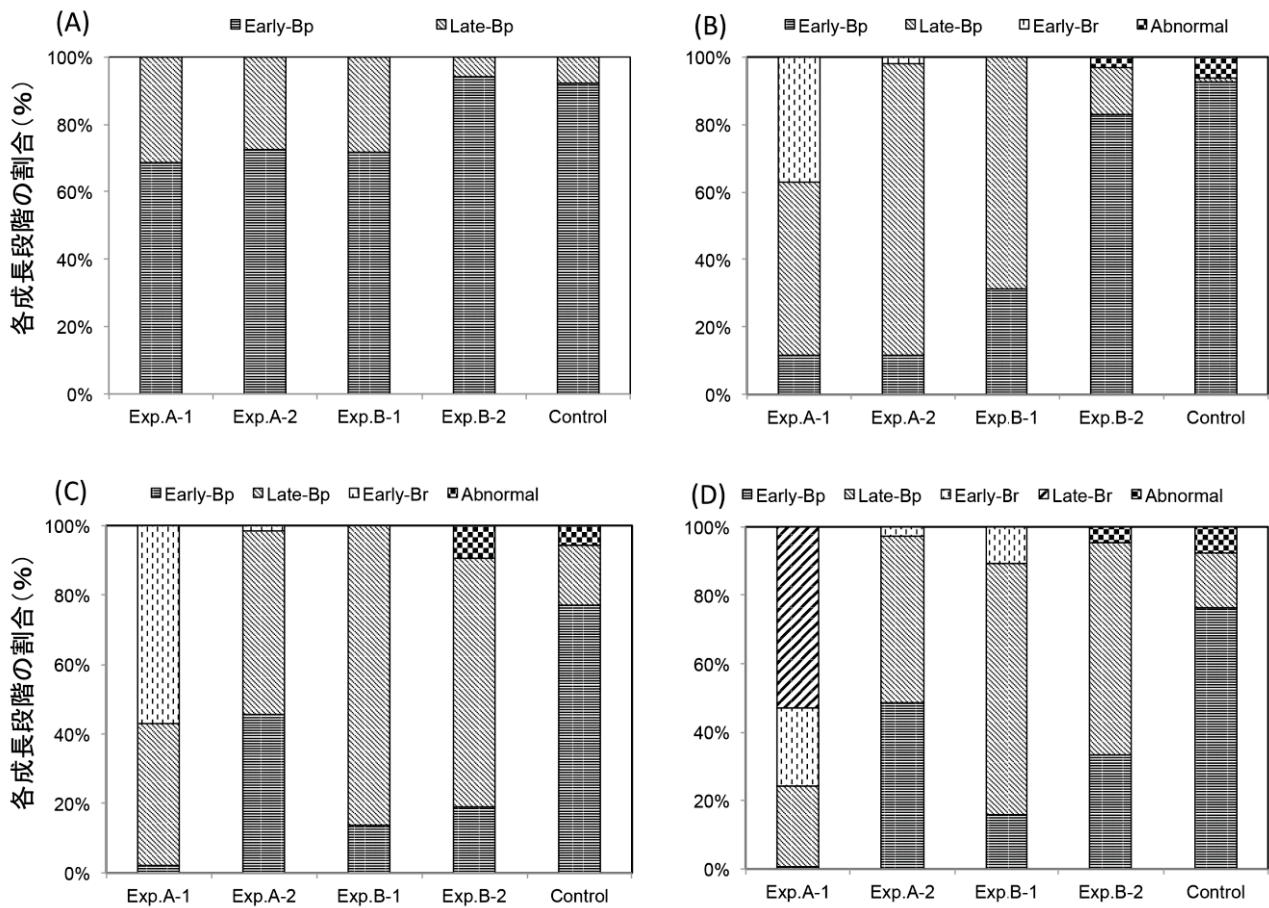


図3-2-9. Day 4 (A), Day 7 (B), Day 10 (C), Day 13 (D)における幼生の各成長段階の割合. ビピンナリア期は Bp(Bipinnaria), ブラキオラリア期は Br(Brachiolaria)として表記.

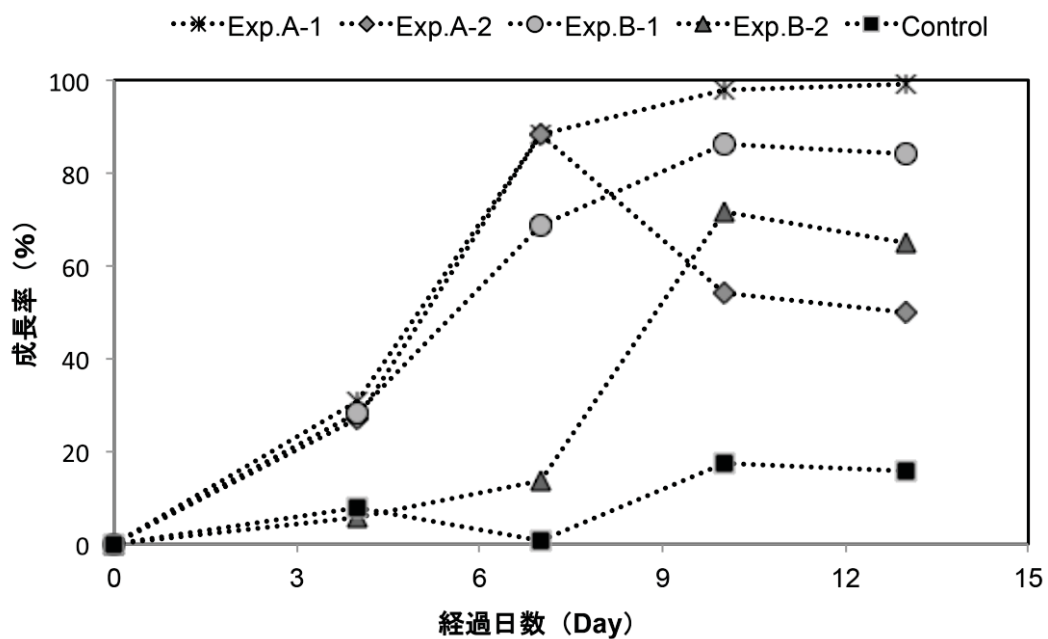


図3-2-10. 各実験系列におけるビピンナリア後期以降まで成長した幼生の割合の継時変化

実験結果の解釈における概念図を図3-2-11に示す。ビピンナリア後期以上の成長率がDay 7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、ブラキオラリア後期までの成長が見られたExp. A-1の餌が、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、*Dunaliella* sp.を添加したExp. B-1であった。ブラキオラリア初期までの成長はDay 13で12%とExp. A-1と比べて遅いが、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Day 7まではExp. A-1とほぼ同程度の成長をしているが、Day 10になると急激に成長が悪くなった。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た。

これらの結果は、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が餌資源としてより有用であること、また幼生は自然海水中のPOMに比べると加熱処理された有機物を同化しにくいことを示唆した。その理由としては、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消化吸收を妨げていることが考えられる。加熱処理した実験系列では幼生の成長率が顕著に低下していることから、今回の方法では実際の海水中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おり、幼生はそれらの有機物のある程度は利用可能であることも示している。前年度の実験により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認められ、本実験結果はそれを支持したが、今回の加熱処理による擬似的なデトリタス様有機物の作成では、餌が同化（代謝）しにくい性質に変性し、幼生の成長を阻害していることが示唆された。デトリタスの質的評価を試みるためには、より自然界水中の有機物に近い擬似デトリタスの作成方法を検討することが必要である。

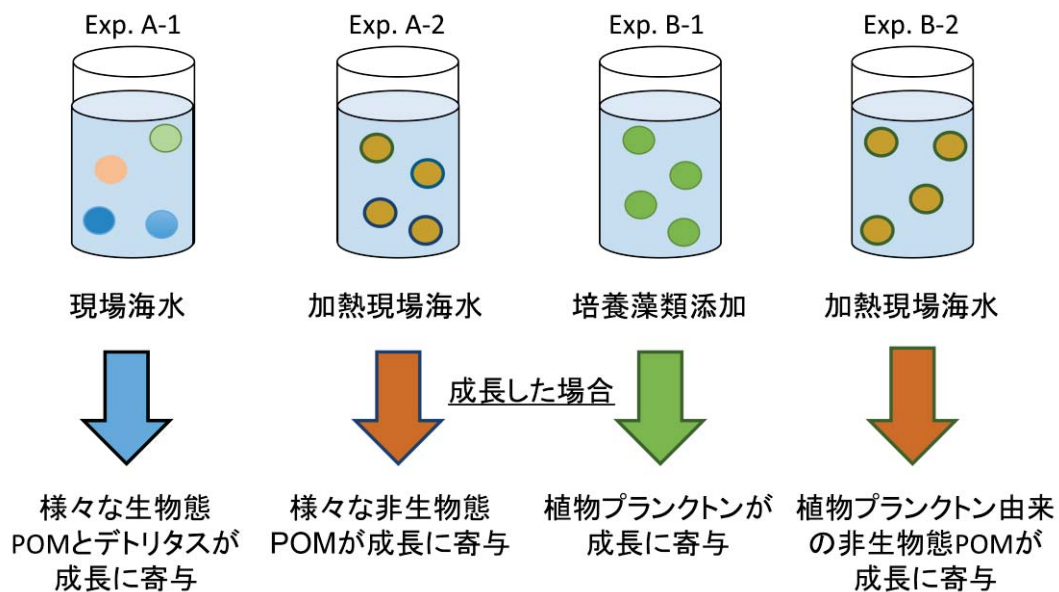


図3-2-11. 各実験系列におけるオニヒトデ幼生の成長に寄与し得る主な餌資源

(3) 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系列におけるオニヒトデ幼生と餌の炭素・窒素安定同位体比の変化を図3-2-12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、溶存態有機物(DOM)は幼生の餌としてほとんど寄与しないという過去の知見を支持している(Okaji et al. 1997a)。海水中POMを用いた実験系列のExp. A-1(加熱処理なし)とExp. A-2(加熱処理あり)を比較すると、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 $\delta^{13}\text{C}$ 値が餌の値に近づいていたことがわかった。同様に、培養藻類を含む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 $\delta^{13}\text{C}$ 値が餌に近づいていたことから、幼生は加熱処理をしていない餌(自然海水中POMや培養藻類)に比べて、加熱処理された有機物を同化できていないことが確認された。

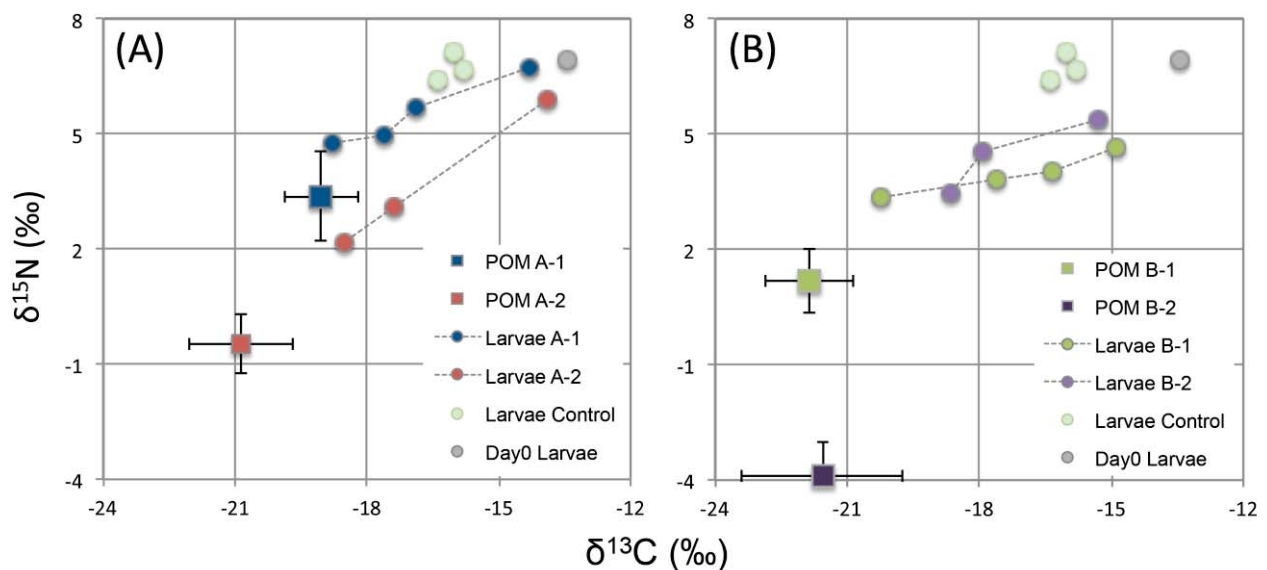


図3-2-12. 各実験系列における幼生と餌(POM)の炭素($\delta^{13}\text{C}$)と窒素($\delta^{15}\text{N}$)安定同位体比の変化。(A)はExp. A-1, A-2, Controlを、(B)はExp. B-1, B-2, Controlの餌(四角形)と幼生(円形)の安定同位体比を示す。破線は同位体比の継時的変化を示す。

(4) 安定同位体比の変化から推定した炭素・窒素置換率

実験期間中の幼生の炭素・窒素置換率の変化を図3-2-13に示した。実験最終日（媒精後13日目）における炭素置換率は、Exp. A-1およびExp. B-1で、それぞれ95.5%、80.9%と高かったのに対し、加熱処理を施したExp. A-2およびExp. B-2ではそれぞれ68.2%と63.8%であった。したがって、加熱処理により15~30%の置換率の低下が生じたことから、前項でも述べたように、加熱処理によって餌の同化を阻害するような有機物の変化が生じたことを示唆している。一方、実験最終日における窒素置換率は、Exp. A-1、Exp. B-1、Exp. A-2の3つの実験系列で大きな差はなかった（約60%）のに対し、Exp. B-2では32.1%と低かった。

実験最終日における成長段階の割合の結果からみると、概ねExp. A-1 > Exp. A-2, Exp. B-1 > Exp. B-2の順であったが、これは炭素の置換率に良く反映されていることを示している。また、4つの実験系列の中で唯一ブラキオラリア期が観察されなかったExp. B-2の窒素置換率が顕著に低かったことから、高い成長段階を維持するためには一定の窒素置換率が必要であることも示している。

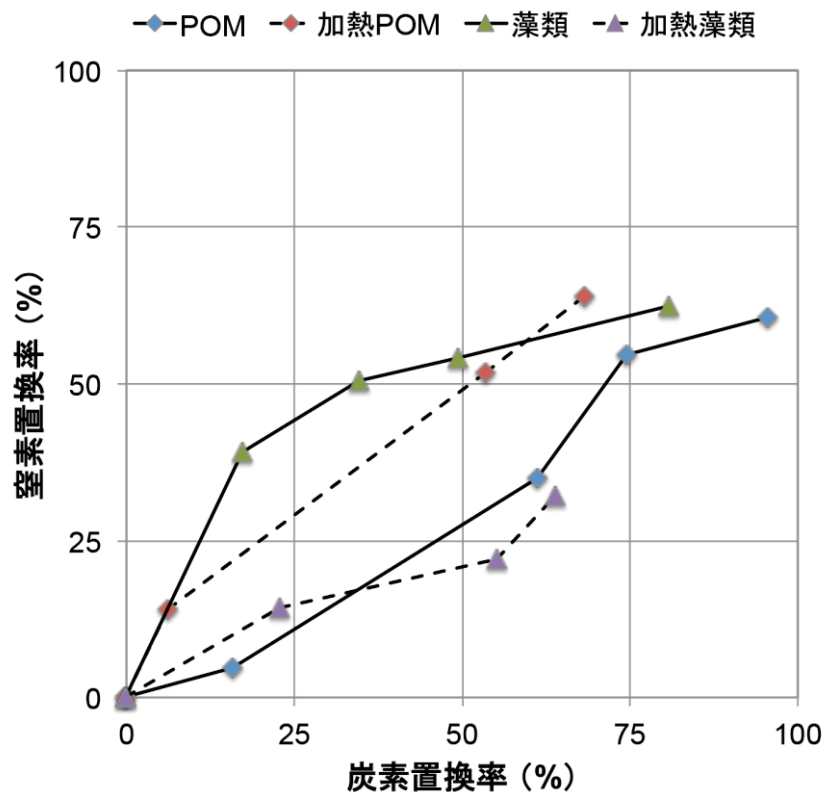


図3-2-13. 異なる餌を与えた実験区における安定同位体比から算出した幼生の炭素と窒素の置換率. 各点は左下から Day 0, 4, 8, 13 に採取された試料で破線は継時的変化を示す.

(5) 全有機炭素量 (TOC) ・ 全窒素量 (TN) ・ C/N 比の変化

各実験系列における幼生一匹当たりの全有機炭素量 (TOC)、全窒素量 (TN) と全有機炭素と全窒素の比 (C/N) の変化を図 3-2-14 に示す。TOC は、Exp. A-1 と Exp. B-1 では実験開始直後の幼生であるよりも実験期間中常に高い含有炭素量を示していた (図 3-2-14A)。一方、Control、Exp. A-2 および Exp. B-2 では実験開始直後の幼生より常に低い炭素量であった。また、Exp. A-1 では、TOC 量が次第に増加したのに対して、他の系列では大きな変化がない (Exp. B-1) か、あるいは減少した (Control、Exp. A-2、Exp. B-2)。これらの傾向は、全窒素量の変化においても概ね同様であることが認められた (図 3-2-14B)。

C : N 比の変化では、Exp. A-1 では実験期間を通して TOC や TN が次第に増加しにもかかわらず C/N 比は安定した値 (3.5 ± 0.1) を維持していたが、その他の実験系列では変動や低下が見られた (図 3-2-14C)。

特に、Exp. A-1 はブラキオラリア期への成長が進んだ個体の割合と体長サイズにおいて他の実験系列よりも明らかに高い値を示したが、このことは元素組成にも反映されている。すなわち、Exp. A-1 では摂取・同化した炭素や窒素が次第に多くなっていること、またその一方で C/N 比は一定に保たれていることから、成長に必要な有機物が十分に摂取され、さらに生理的にも健全さが保たれていることを示唆している。

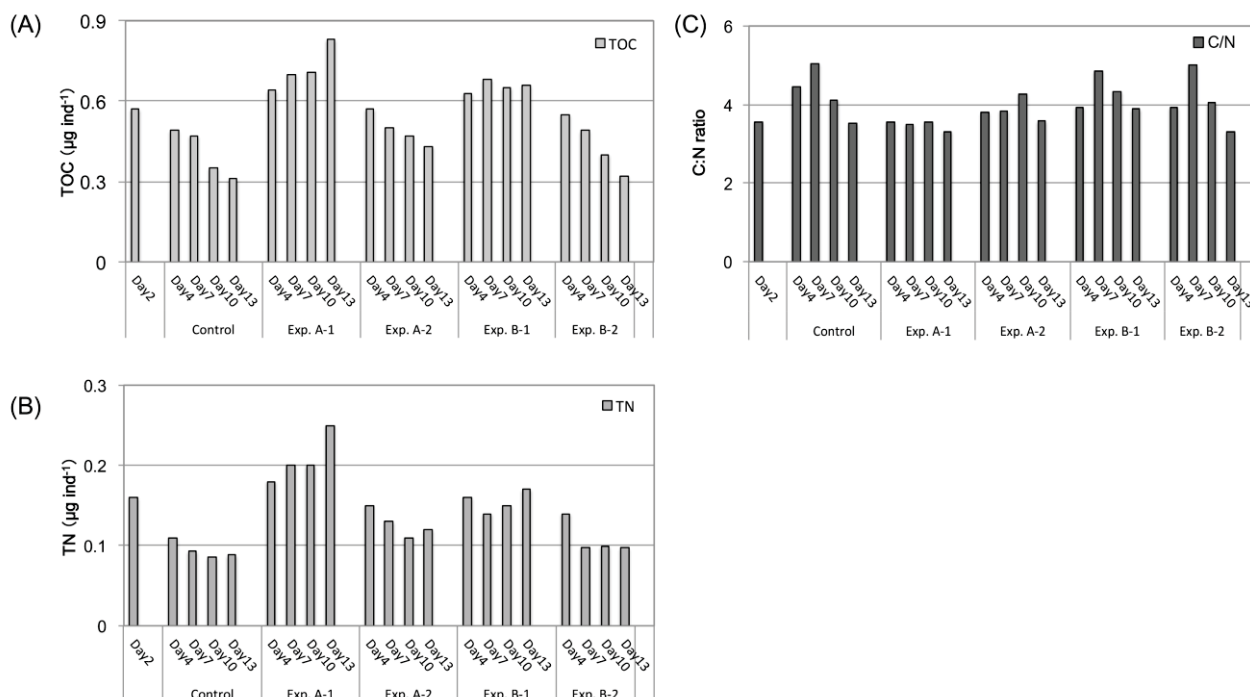


図3-2-14. 孵化直後の幼生 (Day2) と各採取日 (Day4, 7, 10, 13) における幼生 1 個体あたりの (A) 総有機炭素量: TOC, (B) 総窒素量: TN, (C) C/N 比.

2-3-4. まとめ

- Exp. A-1 (生物態 POM+デトリタスを餌) と Exp. B-1 (培養植物プランクトンを餌) では、ほとんど (前者は 99%、後者は 84%) はビピンナリア後期以降まで成長し、そのうち前者では約半分がブラキオラリア後期まで成長したが、後者ではブラキオラリア後期まで成長しなかった。一方、Exp. A-2 (非生物態 POM+デトリタス) では、ほとんど (89%) はビピンナリア後期以降まで成長した後、約半分まで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-2 (加熱培養植物プランクトン) では、65~71%はビピンナリア後期まで成長したが、ブラキオラリアまでは成長しなかった。
- 培養した単一の植物プランクトンよりも、生物態有機物とデトリタスを含む POM を餌とした方が幼生の成長が良いことから、多様な有機物を餌とした方が幼生の成長がよいこと、また、非加熱と加熱処理された有機物を比較すると、実験系列 A および B のいずれでも、加熱した系では成長が悪く、加熱処理によって同化しにくくなったことがわかった。このことは幼生の炭素・窒素安定同位体比の変化でも、非加熱の餌を与えた幼生の方が餌の同位体比に近くなったことにおいても認められた。また、加熱処理の影響として、タンパク質や脂質有機物が変性などを起こして消化吸収を妨げていることが考えられた。さらに、加熱処理した実験系列では幼生の成長率が明らかに低下していることから、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も考えられた。
- Exp. A-1 と Exp. B-1 を chl. *a* 濃度の観点から比較すると、平均 chl. *a* 濃度が低い Exp. A-1 の方が幼生の成長率が高かったことや、chl. *a* 濃度としての餌要求量を満たしていない Exp. A-2 でも一部の幼生がブラキオラリア幼生初期まで成長していたことから、幼生の餌要求量の指標として chl. *a* 濃度だけで十分かどうか、検討する必要があることを示している。
- 安定同位体比の変化から炭素・窒素の置換率を求めると、炭素置換率は Exp. A-1 > Exp. B-1 > Exp. A-2、Exp. B-2 であり、窒素置換率は Exp. A-1、Exp. B-1、Exp. A-2、Exp. B-2 の順に高くなった。このことは、成長段階の割合における結果に概ね反映されていることがわかった。
- 成長段階の割合と体長サイズにおいて明らかに高い値を示した Exp. A-1 では、摂取・同化した炭素や窒素が次第に多くなっていること、またその一方で C/N 比は一定に保たれていることから、成長に必要な有機物が十分に摂取され、さらに生理的にも健全さが保たれていることが示唆された。

2-4. オニヒトデ幼生初期の餌濃度の影響と必須脂肪酸の同化

2-4-1. 背景と目的

これまで指摘した通り、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 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ことから (Nakamura et al. 2016)、植物プランクトン量だけが大量発生の制限因子ではないことを示唆している。オニヒトデ幼生は餌がない環境下でも 1 週間程度は成長が進む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・成長することが可能であることを示している。そのため、従属栄養生物が合成できない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と餌に含まれる必須脂肪酸の組成をもとに、孵化後、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。そこで本研究は、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与える影響と、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目的とした。

2-4-2. 材料と方法

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 3-2-2 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 μm 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、濾過した培養海水に緑藻類 *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 0.2~0.25 $\mu\text{g L}^{-1}$ とした。実験区は次の 5 系列で行った。

- 1) 対照区として常に成長に十分な高濃度で培養：Control A（高餌濃度）
- 2) 対照区として常に成長に不十分な低濃度で培養：Control B（低餌濃度）
- 3) ビピンナリア幼生初期の開始日～3 日目までを高濃度で培養：Condition A（初期のみ高濃度）
- 4) ビピンナリア幼生中期の 4～6 日目までを高濃度で培養：Condition B（中期のみ高濃度）
- 5) ビピンナリア幼生後期の 7 日～9 日目までを高濃度で培養：Condition C（後期のみ高濃度）

培養は 2 L 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約 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 28.0 ± 0.5 $^{\circ}\text{C}$ 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 3-2-2 に示すように Day 5、8、11、14 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、肝盲囊）、受精卵、桑実胚、孵化後の幼生、餌の藻類、成長後の幼生をそれぞれ採取した。これらの試料は、多量の試料を簡便かつ短時間に分析できる py-GC/MS（熱分解-ガスクロマトグラフィー/質量分析計；Agilent Technology 社）を用いた 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。

表3-2-2. ビピンナリア期における餌濃度の条件変化と成長段階の測定日

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													
Condition.A	高			低										
Condition.B	低			高			低							
Condition.C	低						高			低				

2-4-3. 結果および考察

(1) 餌濃度の変化による幼生の生存・成長率への影響

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、全測定個体のなかで最も成長が進んだ成長段階として Day 5 および 8 では中期または後期ビピンナリア、また Day 11 および 14 では後期ビピンナリアと初期ブラキオラリアの個体数から存在割合を算出し、生存・成長の割合として表した。図 3-2-15 に各実験系列におけるオニヒトデ幼生の生存・成長の割合の推移を、表 3-2-3 に実験を終了した 14 日目における生存・成長の割合を示す。成長に十分な餌濃度が保たれた Control A では、生存・成長率はほぼ 100% の高い生存・成長率が保たれ、Day 14 でも 95% であった。これは常に十分な餌が存在する環境下では既報の通りオニヒトデ幼生は生存し、成長することが可能であることを示している。

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 の生存・成長率はほぼ同様で、Day 11 までは約 90% の高い生存・成長率を維持したが、Day 14 には約 42% に低下した。一方、それぞれ Day 4~Day 6、Day 7~Day 9 まで餌を高濃度に保った Condition B と Condition C も類似した経過を示し、Day 8 までは 90% 以上の高い生存・成長率であったが、Day 14 には 10% 以下へと急激に低下した。

後期ビピンナリア幼生の割合の変化（図 3-2-16A）をみると、Control A では Day 8 を過ぎた頃に後期ビピンナリアへと成長（約 90%）し、その後はその状態を維持している。一方、その他の実験系列では後期ビピンナリア幼生の割合は Day 9-10 前後にピーク（80-90%）になり、その後は低下する傾向を示した。一方、成長不全個体の割合（図 3-2-16B）をみると、Control A では実験終了時まで 5% 程度の最も低い値であった。Control B や Condition A の成長不全個体の割合の変化は概ね同様の傾向を示し、Day 11 までは約 10% であるが、Day 14 では約 60% と大きくなった。Condition B や Condition C の成長不全個体の割合も概ね同様の傾向を示し、Day 11 までに約 30% へと緩やかに増加し、Day 14 には 90% 以上へと急激に大きくなった。

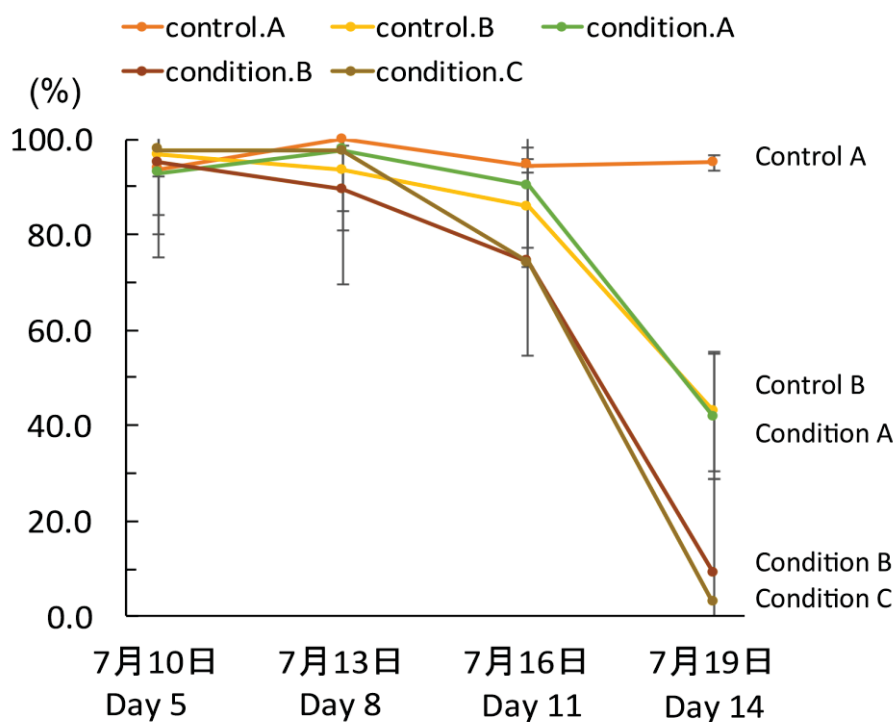


図3-2-15. 各実験系列におけるオニヒトデ幼生の生存・成長率. 生存・成長率は, Day 5・Day 8 では中期または後期ビピンナリア, Day 11・Day 14 では後期ビピンナリアと初期ブラキオラリアの全個体数中の割合として算出した.

表3-2-3. 実験最終日(14日目)のオニヒトデ幼生の生存・成長率

実験系列	成長・生存率
Control A	95.0
Control B	42.9
Condition A	41.8
Condition B	9.1
Condition C	2.9

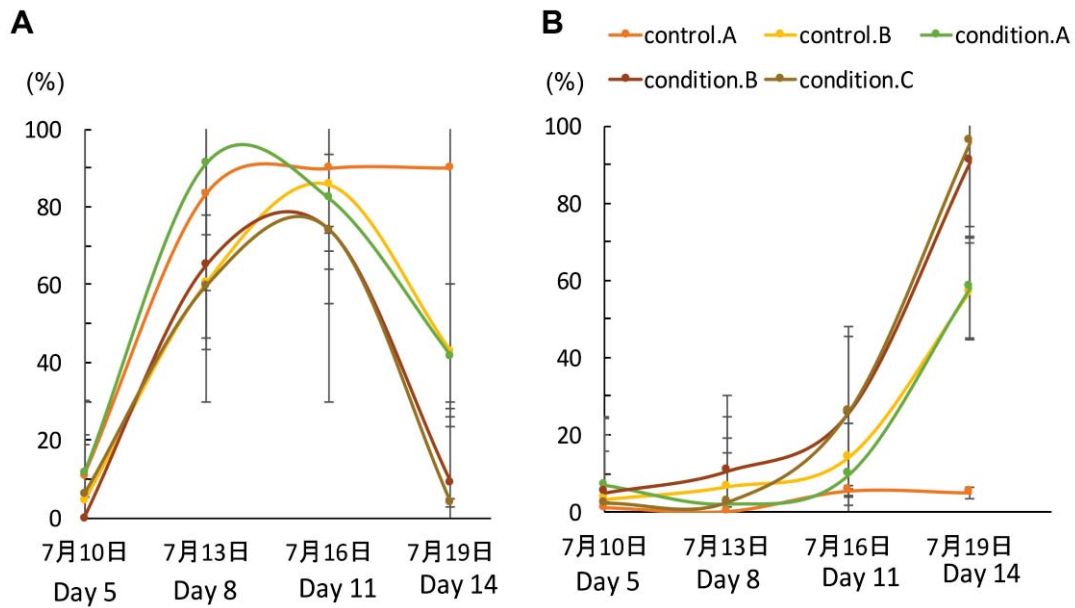


図3-2-16. 各実験区における, (A)後期ビピンナリア幼生まで成長した幼生の割合(%)と, (B)成長不全の割合(%).

Day 14における各実験系列の幼生の詳細な成長段階の割合(%)を示す(図3-2-17)。図3-2-15にも明らかだったようにControl Aのみ約90%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、また初期ビピンナリアまで退化したのもわずかに約5%であったことは、他の実験系列と明確な違いを示している。他の実験系列ではいずれもブラキオラリア期まで成長した個体は観察されなかったことや、Control B、Condition Aでは約58%、またCondition BやCondition Cでは90%以上が初期ビピンナリアまで退化したことが特徴的であった。

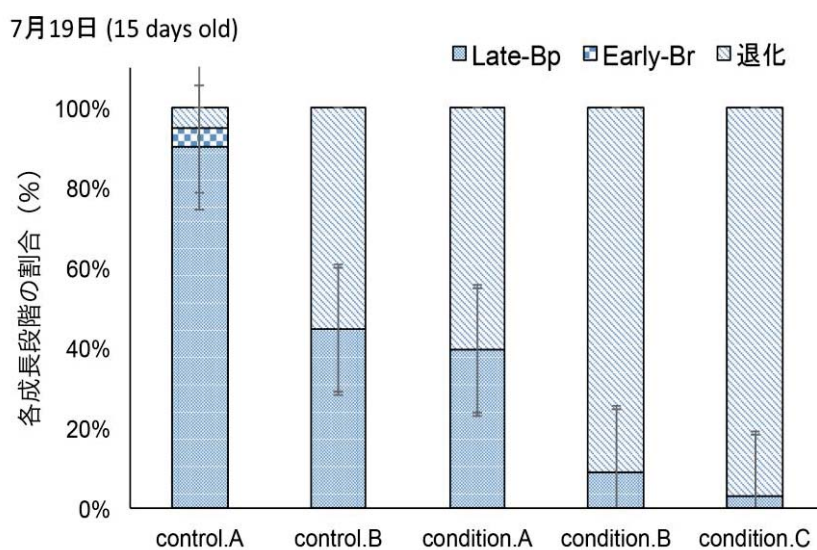


図3-2-17. 各実験系列における実験終了時のオニトデ幼生の成長段階の割合. Late-Bp は後期ビピンナリアを, Early-Br は初期ブラキオラリアを示す.

表3-2-4. 実験結果のまとめ

給餌条件	生存・成長の割合	後期ビピンナリア幼生の割合	成長不全個体の割合	成長段階の割合
Control A (常に高濃度)	ほぼ100%維持 Day 14で約95%	Day 8以後、約90%維持	Day 11までに約5%	後期ビピンナリア幼生: 約90% ブラキオラリア期: 約5%
Control B (常に低濃度)	Day 11まで約90%	Day 10-11でピークの80-90%、 その後低下	Day 11までに約10%	後期ビピンナリア: 約42% 後退した幼生: 約58% ブラキオラリア期なし
Condition A (Day 1-3 高濃度)	Day 14で約42%に低下		Day 14では約60%	
Condition B (Day 4-6 高濃度)	Day 11まで約90%	Day 9-10でピークの80-90%、 その後低下	Day 11までに約30%	後期ビピンナリア: 10%以下 後退した幼生: 90%以上 ブラキオラリア期なし
Condition C (Day 7-9 高濃度)	Day 14で10%以下に低下		Day 14では約90%	

図3-2-15~17および表3-2-3に示したように、生存・成長の割合、後期ビピンナリア幼生の割合、成長不全個体の割合、成長段階の割合の4つの観点から結果をまとめると、表3-2-4に示したように、3つのグループに分けられる。Control Aの結果では、後期ビピンナリア幼生が90%、ブラキオラリア期までの成長が見られるなど、いずれの項目からみても最も成長が著しく、これは常に十分な餌が存在する環境下ではオニヒトデ幼生は生存・成長することが可能であることを示している。Control BとCondition Aの結果では、後期ビピンナリア幼生の割合がday9-10以後大きく低下(約42%まで)し、不全個体も約60%に増加し、ブラキオラリア期まで成長しなかったところに特徴がある。

一方、Condition BおよびCondition Cの結果では、後期ビピンナリア幼生の割合がday9-10以後大きく低下(約10%まで)し、不全個体も約90%に増加し、ブラキオラリア期まで成長しなかったことから、基本的にはControl BおよびCondition Aと傾向は類似しており、後期ビピンナリア幼生の割合の低下がより大きいこと、また不全個体の割合が著しく大きい点が異なるのみである。この違いの一つは高濃度の餌を与えるタイミングの違いで、そのタイミングが幼生の体力の維持と幼生の口や胃の器官の成長が十分に確保された以後であれば、一定の成長が期待されるであろう。オニヒトデ幼生は孵化後2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へと成長することが知られていることから、Condition BやCondition Cでは卵から受け継いだ栄養だけである程度の器官の成長が確保されていたと仮定すれば、生存・成長のピークがDay 9-10にあったものの、餌を与えたタイミングがDay 6以後のためその後の成長を十分に担保できる栄養が得られなかったことがその後の成長が著しく低下したことの要因として考えられる。

他方、Condition AではCondition BやCondition Cと異なり、成長に必要な高濃度の餌がDay 1-3に与えられたことから、十分な器官の成長を確保でき、そのためDay 9の早い時期に生存・成長のピークを迎えた(図3-2-16A)ことが考えられる。しかしながら、その後は餌が与えられなかったことから、その後の成長ができなかったことが考えられる。Control Bの場合、成長にとって十分ではない餌が常に与えられたが、器官の成長が十分な速度で得られず、そのため生存・成長のピークがDay 11と遅くなった(図3-2-16A)こと、さらにその後の成長は餌の量が十分でなかったことから退化していったことを示唆している。以上のことから、幼生の生存・成長の因子として、器官の成長や体力の維持と、餌を与えるタイミングが重要であることを示している。今後、餌を与えるタイミングを複数回にした実験を実施することによって、一層明らかにできると考えられる。

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、沖縄本島西海岸では chl. a 濃度が低い値（全体の年間平均 chl. a 濃度は $0.30 \pm 0.02 \mu\text{g L}^{-1}$ ）で推移しているにもかかわらず、恩納村沿岸域でオニヒトデの大量発生がしばしば観察されている。平均的な chl. a 濃度が低いなかで、台風や風雨などによって陸域から栄養塩類が大量に流入することで一次生産の増加が局地的または一時的に起こることも観察されている（沖縄県自然保護・緑化推進課 2015）ことから、オニヒトデの産卵時期と生存・成長にとって良い環境になる時期が重なることが大量発生の要因になり得るという考え方を本研究の結果は支持している。しかしながら、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（Caballes et al. 2017）、本実験結果で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もさらなる検討が必要である。

（２）植物プランクトン、オニヒトデ組織およびオニヒトデの各発生段階の脂肪酸組成

図 3-2-18 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-TMAH-GC/MS 法による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。*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) と不飽和度が一価の不飽和脂肪酸 (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 3-2-18 A)。一方、受精直後の受精卵とその後発生が進んだ桑実胚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を示している (図 3-2-18 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 3-2-18 D、E、F) ことから、初期発生からビピンナリア期までの成長に利用・代謝されていることを示している。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す、または TMAH 以外の誘導体化試薬を用いるなど分析条件を再検討した上で実験を行う必要があると考えられる。

本研究の当初の目標として、卵に含まれる主要栄養素の一つである必須脂肪酸と、孵化後に植物プランクトンから得た必須脂肪酸が組成としてどのように変化するかをトレースすることを目指したが、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、必須脂肪酸の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。

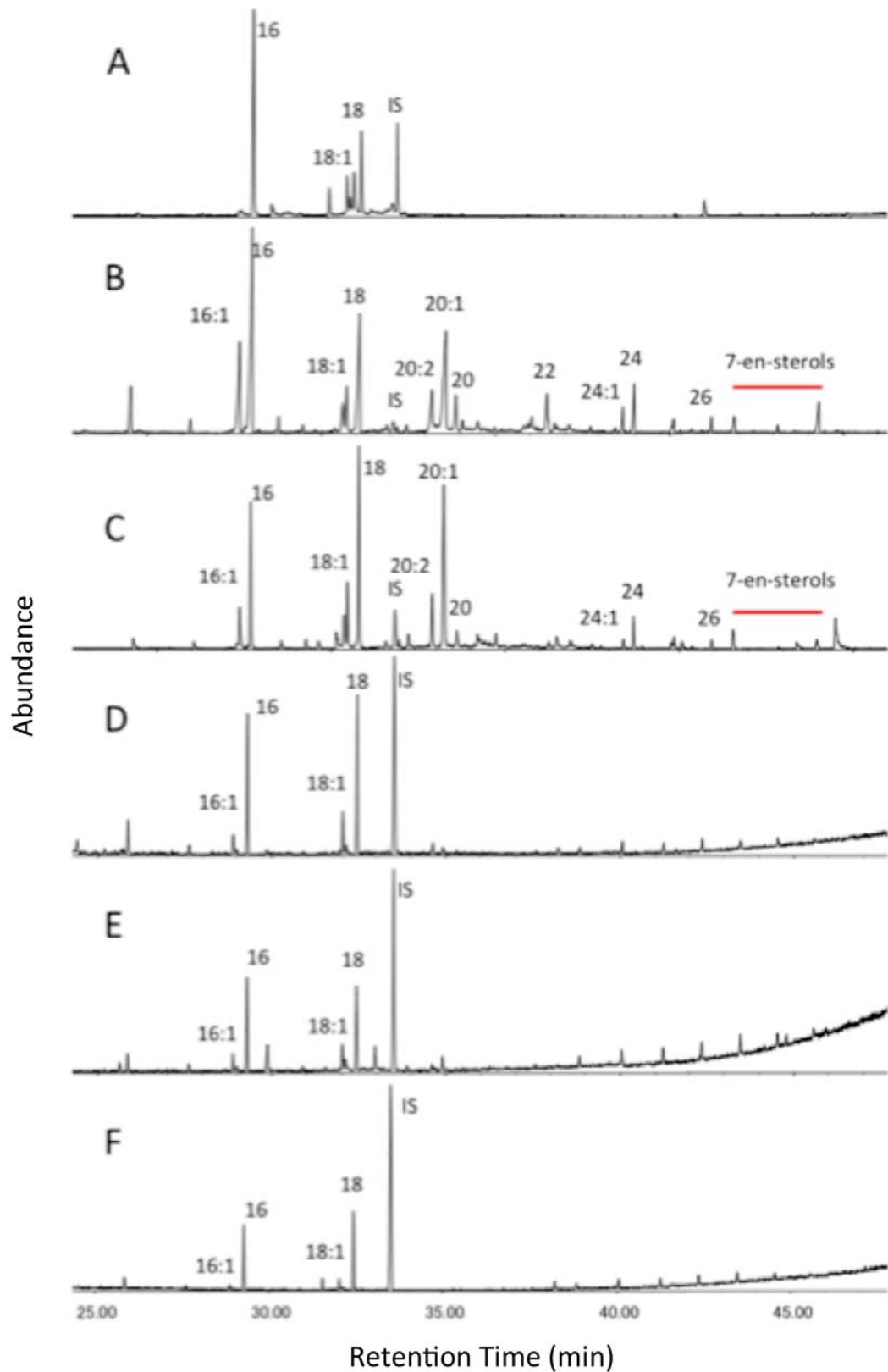


図3-2-18. 餌と各発生段階のオニヒトデ幼生に含まれる各種脂肪酸. A: 植物プランクトン (*Dunaliella* sp.), B: 受精卵, C: 桑実胚, D: 初期ビピンナリア幼生, E: 後期ビピンナリア幼生, F: 初期ブラキオラリア幼生のトータルイオンクロマトグラフ(TIC)を示し, 図中の数字は代表的な脂肪酸, IS は内部標準を表す.

2-4-4. まとめ

本研究では、TMAH 試薬を用いた online-TMAH-GC/MS 分析法によって検出を期待した必須脂肪酸を解析することが出来なかったため、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場合にその後の成長に阻害が起きるのかを明らかにすることは出来なかった。さらに、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は、幼生の栄養状態が一定期間内に改善すると次の成長段階への変態が可能であるか、あるいは不可逆的に成長が制限されるかを検討する必要があると考えられた。

本実験を行うにあたり、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であったか、TMAH 試薬を用いた分析が必須脂肪酸分析に不向きであったことにより、詳細な食性解析が困難であった。今後は分析に供する試料量や抽出方法および分析条件を再検討し、再度飢餓耐性実験を行うことで、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。

2-5. 脂質組成からみたオニヒトデ幼生によるデトリタスの利用と飢餓耐性の検討

2-5-1. 背景と目的

前述の通り、沖縄県周辺海域ではオニヒトデ幼生の生残率を高く維持できる chl. *a* 濃度は一時的にしか観察されないことから、幼生には一定の飢餓耐性があると推測されるが、どの発生段階に餌濃度がクリティカルに影響するか、その耐性期間は明らかになっていない。一方、chl. *a* 濃度が低い自然環境においても幼生が高い生残率および成長率を示す要因として、植物プランクトン以外の有機物（懸濁態有機物：POM）も餌として利用する可能性が指摘されている点に注目し、幼生が自然環境下において利用している可能性がある POM について、その量的および質的評価を試みてきた。

これまでの一連の研究によって、植物プランクトン量が少ない自然海水中でも、幼生は主にデトリタスで構成される POM を同化して一定程度の成長が可能であることを明らかにした。卵に元々含まれる栄養と、孵化後の摂食に伴い獲得する外部的栄養が、オニヒトデ幼生体内でどのように同化・置換されるかをトレースする摂餌実験と脂質分析も実施した。しかしながら、煩雑な前処理過程を要する脂質分析の欠点を克服するために簡便かつ少量の試料で分析可能な TMAH 試薬を用いた熱分解 GC/MS 法を試みた結果、必須脂肪酸の検出には同分析法は不向きであることが判明した。

そこで本研究は、1) オニヒトデ浮遊幼生期（ビピンナリア期・ブラキオラリア期）の飢餓耐性と、2) 必須脂肪酸の獲得の有無とオニヒトデ幼生の成長との関係を明らかにすることを目的として、浮遊幼生期を通して異なる時期に飢餓状態を経験させる飼育実験を行った。その評価は、各飼育条件の幼生の体長および発生段階の測定と、異なる餌と濃度で飼育した幼生の脂肪酸組成及び安定同位体比によって比較した。付随して、オニヒトデ幼生の必須脂肪酸の検出に適した熱分解 GC/MS 法の検討を行った。

2-5-2. 材料と方法

(1) デトリタス様有機物の作成

前年度の結果を踏まえ、デトリタス様有機物粒子の定義を「細胞膜を破壊して失活した生物由来の有機物粒子」とし、異なる物理的な細胞膜の破碎方法を検討した。藻類2種 (*Dunaliella* sp. と *Chaetoceros* sp.) を用いて細胞膜の破碎の検討として (a) 超音波処理、(b) 遠心分離と曝気、(c) 低温・短時間 (60° C、2 min) の加熱処理、の3条件で行い、処理前後の chl. *a* 濃度の変化と電子顕微鏡写真を比較した。

(a) 超音波処理は超音波 (20 kHz) を実質 5 分間あるいは 15 分間当てて処理した。この処理は連続して超音波を当てると溶液が発熱してしまうため、処理中は氷で冷やして温度の上昇を抑制しながら、1 秒あたり 0.5 秒を処理時間、0.5 秒を停止時間とした。(b) 遠心分離処理は 3000rpm、20°C、30 min で行った。(c) 加熱処理は比較的低温・短時間の 60° C、2 min の条件で行い、その後水管 (20 L) に処理後の藻類を入れ、エアレーションによる曝気を 24 時間行った。

(2) 必須脂肪酸の GC/MS による分析条件の検討

昨年度実施した online-TMAH 法では目的の必須脂肪酸が検出できなかったことから、分析方法の検討を行った。現在行われている脂肪酸の分析は 2 つに大別され、一つは溶媒抽出、誘導体化、GC/MS 分析の過程を経るものと、熱分解と誘導体化の同時処理—GC/MS 分析の過程を経るものがある。必須脂肪酸を効率的に分析可能な方法を採用するために、同一の植物プランクトンを用いて、主に溶媒抽出法 2 種と熱分解法 2 種の方法で検討した。

分析方法の検討には、試料として海産性植物プランクトン *Thalassiosira* sp. を用いた。

溶媒抽出法では、クロロホルム：メタノール：水 (v:v:v = 2:2:1.8) の混合溶媒で抽出した後に BF₃-MeOH でメチル化 (トランスメチレーション) を行う方法 (以後 BF₃ 法と表記、Bligh and Dyer 1959) と、メタノール：ジクロロメタンの混合溶媒で 3 回抽出し、ケン化後、トリメチルシリル化剤によって TMS (トリメチルシリル) 誘導体化する方法 (以後 TMS 法と表記) で比較を行った。

熱分解法では、TMAH (水酸化テトラメチルアンモニウム) および TMSH (水酸化トリメチルスルホニウム、Ishida et al. 1999) の 2 種の試薬をメチル誘導体化試薬として検討した。また、この熱分解法には、熱分解装置 (パイロライザー(Py)) と GC/MS を直接接続した装置を用いて熱分解と誘導体化をパイロライザー中で行い、メチル化された生成物を直接 GC/MS 装置に導入する online 法と、熱分解および誘導体化を密閉したアンプル管内で別途行って (300° C、30 分間) から、生成物の抽出および GC/MS 分析を行う offline 法を比較した。TMAH を試薬に用いた online 法は、315° C の熱分解温度にて行い、以後この方法は Online-TMAH 法と表記する。また、TMAH 試薬を用いた Offline 法を Offline-TMAH 法と表記する。一方、試薬として TMSH を用いた Online 法では 280° C、315° C、358° C、445° C にて行ったので、Online-TMSH 法に対応する温度を付して表記する。また、TMSH 試薬を用いた Offline 法は、Offline-TMSH 法と表記する。

熱分解装置には日本分析工業社製 JHP3 型 Curie Point Pyrolyzer、GC/MS には Agilent Technologies 社製 6850 GC・5975 MS を用いて脂肪酸の同定及び定量を行った。GC/MS 分析の詳細な条件は、カラムに Agilent Technologies 社製 HP-5MS、30m、0.25mmφ、フィルム厚：0.25 μm を使用し、オーブンの昇温条件：50° C (5min) - 310° C (6° C/min) - 310° C (20min)、試料導入部温度：310° C、イオン源温度：230° C に設定した。試料導入法はスプリットレス、キャリアーガス及び流量はヘリウムガスをコンスタントフロー (1.0 mL min⁻¹) とした。

(3) 飢餓耐性実験における飼育条件と試料採集

本研究は 2017 年 7 月、これまでと同様に琉球大学熱帯生物圏研究センターで飼育実験を行った。デトリタス様有機物の作成には、前述の 3 つの方法 (2-5-2 (1)) を参照) を比較検討した結果、後述 (2-5-3 (1)) を参照) したように加熱処理および曝気の方法を採用した。まず、細胞密度の高い藻類培養液を適量エッペンドルフチューブに分取し、恒温槽にて 80° C、1 分間加熱した後に、幼生の飼育水を作成する 20 L の容器に高濃度の加熱藻類溶液を適量入れて希釈し、十分に攪拌を行なった。さらにこの飼育用海水を、エアーポンプを用いて 24 時間暗所にて曝気したものをデトリタス用有機物として、幼生の飼育に用いた。

飼育海水は、実験場前の沿岸から海水を汲み上げるポンプから得られた海水を、有効孔径 1 μm のフィルターで濾過した濾過海水 (FSW: Filtered Sea Water) を用いた。飼育実験は、植物プランクトン 2 種 (*Dulaliella* sp. と *Chaetoceros* sp.) を chl. a 比として 1:1 の割合で混合し、

合計約 $1.5 \mu\text{g L}^{-1}$ の濃度で飼育海水に添加した混合飼育海水 (FSW + *Dulaliella* sp. + *Chaetoceros* sp. の生き餌混合) と、擬似的に作成したデトリタス様有機物 (熱処理前の chl. *a* 濃度が約 $1.5 \mu\text{g L}^{-1}$) を含む飼育海水 (FSW+デトリタス混合) を作成して実施した。オニヒトデ幼生は、後述するように媒精後一定期間経過したものからビピンナリアと初期ブラキオラリアまで成長した個体を用いて、3 日間の間隔を置いて餌を添加し、飢餓状態を経験させる実験を行った (表 3-2-5)。実験容器内の餌濃度は、給餌後 24 時間以内に幼生の摂食により餌濃度の低下が起こることを想定し、毎日行う換水の度に上記の濃度になるように餌を添加して十分量の餌が含まれる状態を維持した。餌を添加する際は、培養藻類の chl. *a* 濃度が日々変化するため、各藻類の培養液中の chl. *a* 濃度を測定してから混合した。

ビピンナリア期の実験に用いた幼生は、孵化後 24 時間後に飼育容器内を遊泳している健全個体を選別して用いた。初期ブラキオラリア期の実験 2 に用いた幼生は、実験 1 とは別途用意した。孵化直後から実験開始までオニヒトデ幼生を大型容器で十分な餌 (chl. *a* 量で ca. $2.0 \mu\text{g L}^{-1}$) を常に与えて飼育し、孵化後 12 日目に初期ブラキオラリアに達した個体を選別して各飼育容器に移動させ、胃内容物を除去するために 24 時間給餌を止めた後の個体を用いた。実験期間中は飼育海水を 1 日 1 回交換し、常時攪拌しながら室温を至適生育温度 ($28.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$) に調整して、実験系列ごとに 3 連で幼生を飼育した。

幼生の成長度と体長測定用に、飼育期間中 3 日おきに各実験系列の幼生を抜き取り、実体顕微鏡による写真撮影を行った。化学分析用の幼生は発生段階ごとに 1 検体当たり 100-150 匹を、餌試料は適量を濾過によってガラスファイバーフィルター (GF/F、孔径 $0.7 \mu\text{m}$) 上に捕集して試料とした。電子顕微鏡観察用に、各成長段階の幼生を数個体抜き取り、グルタルアルデヒド 2% で固定した。

表3-2-5. 各実験系列における飼育条件

実験1 (ビピンナリア期)	Control	添加なし (FSWのみ)
	Exp. A	媒精後2日目から添加 (FSW+生き餌混合)
	Exp. B	媒精後5日目から添加 (FSW+生き餌混合)
	Exp. C	媒精後8日目から添加 (FSW+生き餌混合)
	Exp. D	媒精後2日目から添加 (FSW+デトリタス混合)
実験2 (初期ブラキオラリア)	Control	添加なし (FSWのみ)
	Exp. A	媒精後12日目から添加 (FSW+生き餌混合)
	Exp. B	媒精後15日目から添加 (FSW+生き餌混合)
	Exp. C	媒精後18日目から添加 (FSW+生き餌混合)
	Exp. D	媒精後12日目から添加 (FSW+デトリタス混合)

(4) 成長度および体長測定

幼生の成長段階は、飼育容器からランダムに抽出された 20 個体を実体顕微鏡に接続したカメラを用いて画像を撮影し、画像解析ソフト Image-J を用いて成長段階を判別した。本実験では、前項 2-3-2 (4) で詳説した方法と同様に「奇形・退化 (収縮)」の幼生を「Abnormal (異常個体)」として扱った。後期ビピンナリアまたはブラキオラリア期へ成長した個体が、何らかの理由で成長不全が起きてゆるやかに体が収縮した場合、初期ビピンナリア期に類似した形状へと変化するため、見かけ上は成長段階が後退したように見える場合がある。観察された幼生が次の成長段階へと成長した後に、それ以前の成長段階へと「後退」したのか、該当の成長段階から変化していないのかを判別することは困難であるが、本研究では「奇形・退化 (Abnormal)」の幼生と「初期ビピンナリア」を区別して扱った。幼生の体長は、同じ実験系列から得られた 20 個体の画像を用いて、等倍率で撮影した基準 (マイクロメーター) との比較によって、幼生の突起物の頂点から肛門部位までの長さの平均値を算出して求めた。

2-5-3. 結果と考察

(1) デトリタス様有機物の作成方法の検討

藻類 2 種 (*Dunaliella* sp. と *Chaetoceros* sp.) を用いたデトリタス用有機物の作成を 1) 超音波処理、2) 遠心分離処理、3) 加熱処理および曝気の 3 条件で検討した。その評価を chl. a 濃度の変化 (図 3-2-19) と細胞膜表面の電子顕微鏡 (SEM) 撮影画像により行った (図 3-2-20)。超音波破碎では処理時間の長短 (5 分および 15 分) に関わらず chl. a 濃度の顕著な減少は認められなかった。これは今回実験で用いた藻類の細胞粒径が 5 μm 程度と比較的小さい種を用いたため、20 kHz の低周波の超音波では細胞の破壊を十分に行えなかったこと、また電子顕微鏡の写真映像からも破碎は十分でないことを示している。遠心分離による処理では電子顕微鏡による観察で細胞膜が効果的に破碎されている様子が確認されたが、超音波処理と同様に chl. a 濃度の顕著な減少は認められなかった。低温・短時間の加熱処理および曝気処理を組み合わせた場合、chl. a の顕著な減少と細胞表面の効果的な破碎が認められた。以上の結果から、デトリタス様有機物の作成には低音・短時間の加熱処理および曝気を採用した。

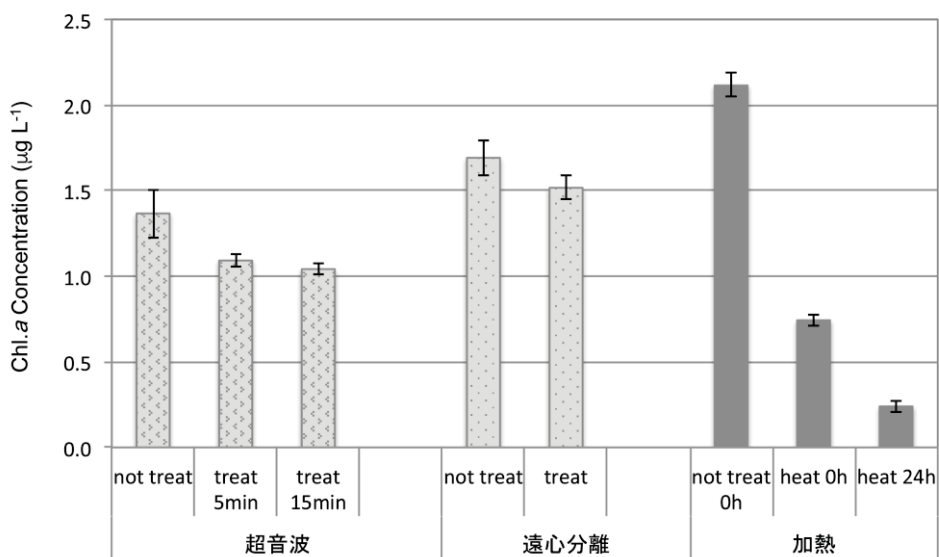


図3-2-19. 超音波, 遠心分離, 加熱処理と曝気による Chl. a 濃度の変化.

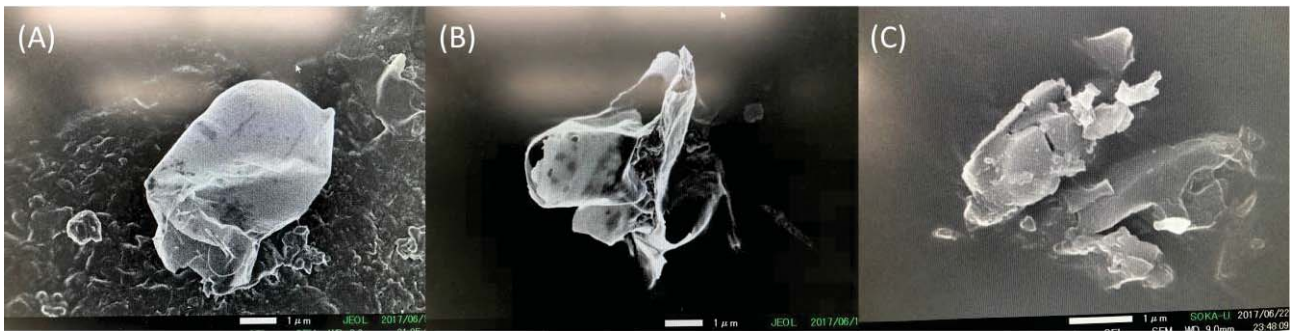


図3-2-20. (A)超音波処理, (B)遠心分離(15分), (C)低温・短時間の加熱処理と曝気を行った後の藻類細胞の電子顕微鏡写真.

(2) 必須脂肪酸の分析方法の検討

検討した必須脂肪酸の分析方法は、同一試料 (*Thalassiosira* sp.) を用いて、2種の溶媒抽出法 (BF₃法およびTMS法) と2種の試薬 (TMAHとTMSH) とonline法とoffline法の組み合わせを用いた熱分解法 (Online-TMAH法、Offline-TMAH法、Online-TMAH法の280°C、315°C、358°C、445°C、Offline-TMSH法) の9種の条件である。

図3-2-21に検出された全脂肪酸量に対する不飽和脂肪酸の相対組成の割合 (%) を示す。また図3-2-22に、検出された総脂肪酸量が最も多かったBF₃法による脂肪酸量を100としたときの各種方法による多価不飽和脂肪酸 (2価以上の不飽和) と他の脂肪酸 (飽和および一価不飽和) の割合を示す。必須脂肪酸は ω -3および ω -6系列の2価以上の不飽和脂肪酸であることから、図3-2-21に示したC18:2、C18:3、C20:4、C20:5およびC20:6の多価不飽和脂肪酸が相当する。したがって、これら多価不飽和脂肪酸が多く検出されたOnline-TMSH法が適していることを示している。図3-2-22に示したように、脂肪酸の総量としてはBF₃法が最も多いが、多価不飽和脂肪酸の割合は、特にOnline-TMSH法の280°Cあるいは358°Cが最も適していることを示している。

図3-2-23に、オニヒトデ幼生の脂肪酸分析を溶媒抽出法 (TMS法) とOnline分析法 (Online-TMAH法およびOnline-TMSH法280°C) で行った結果の代表的な例としてのトータルイオンクロマトグラム (TIC) を示す。図に明らかなように、Online-TMSH法では6価のPUFAが検出され、 ω -3系列の必須脂肪酸の一種であるエイコサペンタエン酸 (EPA; 20:5 FA) とドコサヘキサエン酸 (DHA; 22:6 FA) が検出された。したがって、本研究の必須脂肪酸分析にはOnline-TMSH 280°Cの分析法を採用することにした。

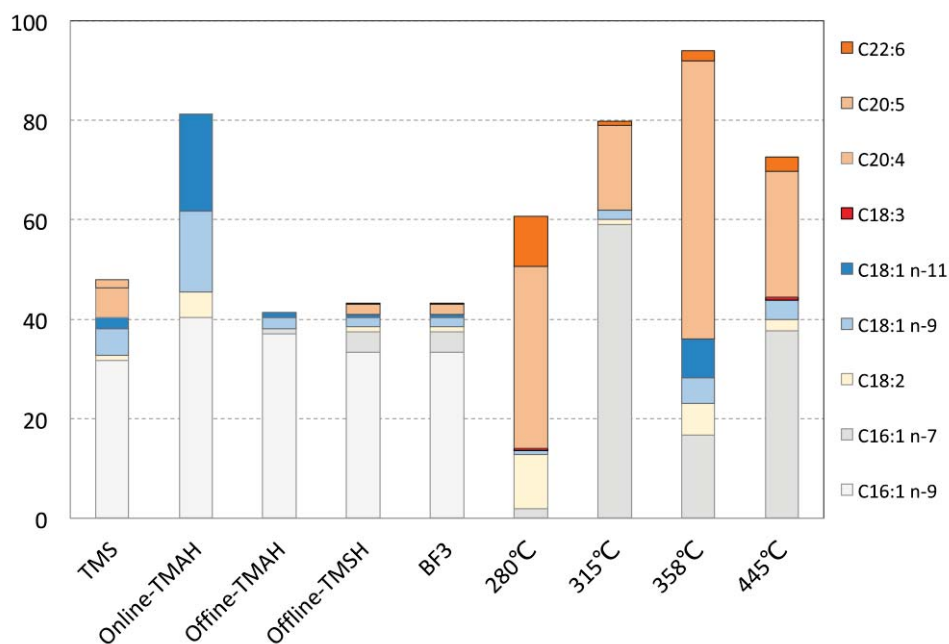


図3-2-21. 種々の脂肪酸分析法によって検出された全脂肪酸あたりの各種不飽和脂肪酸の割合. 分析方法は本文中に記載した.

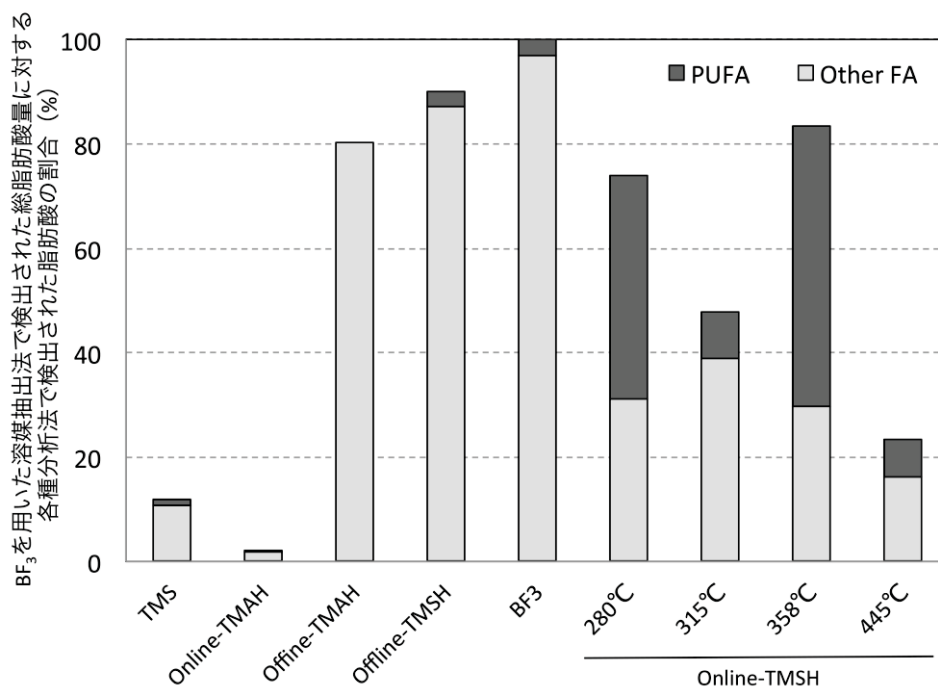


図3-2-22. BF_3 法を用いた抽出法で検出された総脂肪酸量を100とした時のその他の抽出および誘導體化試薬を用いた方法で検出された各種脂肪酸の割合. それぞれの分析方法は, 本文中に記載した. 図中の PUFA は不飽和度が2以上の多価不飽和脂肪酸, Other FAはその他の飽和脂肪酸と1価の不飽和脂肪酸の合計を示す.

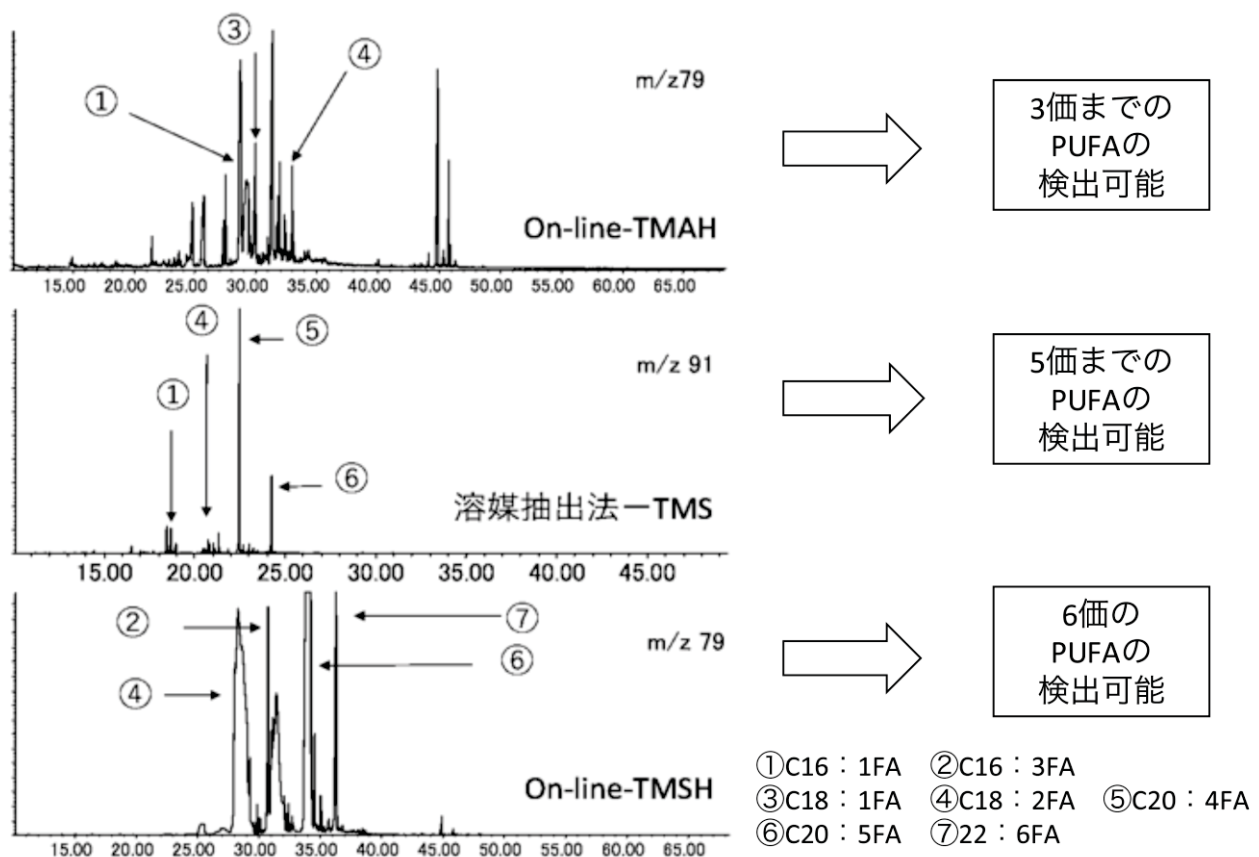


図3-2-23. 溶媒抽出法(TMS法)とonline分析法(Online-TMAH法およびOnline-TMSH法280°C)で検出されたオニヒトデ幼生の脂肪酸のTIC.

(3) ビピンナリア期の飢餓耐性実験

ビピンナリア期とブラキオラリア期の飢餓耐性実験における画像解析による体長と成長度の経時変化を図3-2-24、25、26に示す。ビピンナリア期における幼生の体長変化(図3-2-24)に注目すると、各実験系列の間に顕著な差異が認められた。口が形成され始める発生後2日目から常に十分量の餌と接触しているExp. Aにおいて最も大きい体長の増大が認められ、ついでExp. B(5日目から摂餌)、Exp. C(8日目から摂餌)の順に大きくなる傾向が見られた。また、加熱処理によるデトリタス餌を与えたExp. Dにおいては、媒精後2日目から餌との接触を開始し、顕微鏡観察によって胃内への取り込みは確認できたが、餌を全く与えなかったコントロール(Control)よりも体長が短くなっていた。Exp. Dにおいてコントロールよりも成長が悪かったが、これは退化した個体の収縮が著しく、そのため体長の平均値が小さくなったためと考えられるが、平成28年度の加熱処理によるデトリタス餌の摂餌実験においても生餌を与えた系列よりも成長が悪かったことから、加熱処理によってタンパク質などの有機物が摂取・消化しにくい状態に変性したことで、多くの幼生で成長不全が起きたと考えられる。

媒精後2、5、8、11、14日目における幼生の成長段階の組成から、給餌の有無に関わらず、いずれの実験系列においても媒精後5日目までに初期ビピンナリアから後期ビピンナリアへの成長が認められた(図3-2-25)。Exp. Aでは口が形成され始める2日目から餌を与えていたため、いくらかは餌をとりれている可能性があるが、ビピンナリアまでは外部栄養に依存せず、

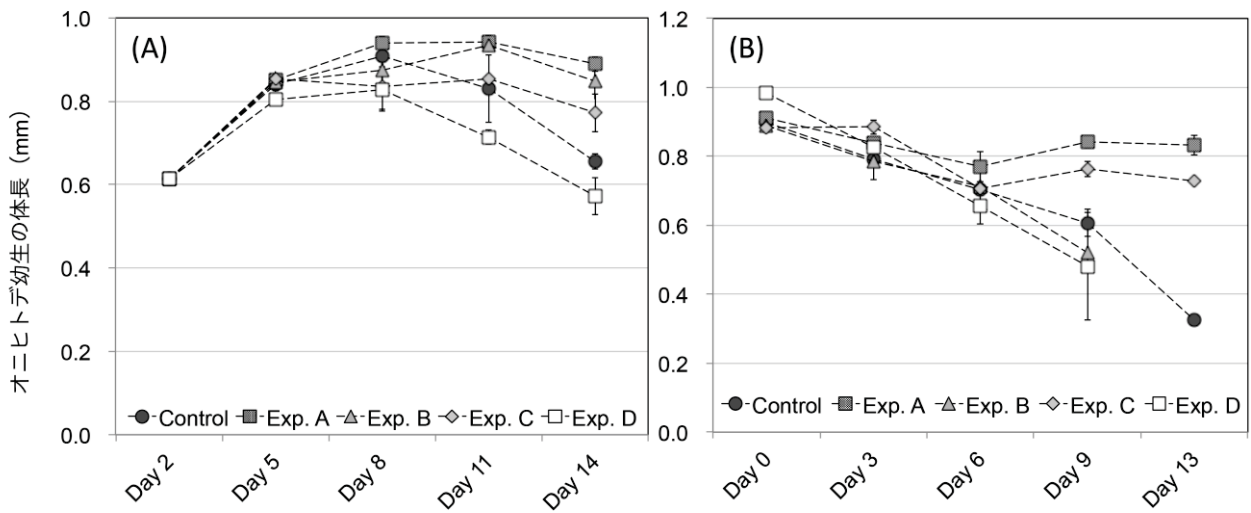


図3-2-24. 各飼育条件における(A)ビピンナリア期(実験1)および(B)ブラキオラリア期(実験2)の幼生の体長変化.

先天的な初期栄養で変態が進むことを示している。実験開始時から餌と接触している Exp. A においては、媒精後 11 日目には 20%以上の個体が初期ブラキオラリアに、14 日目には半数以上がブラキオラリア幼生へ変態し、14 日目には中期ブラキオラリアに到達した個体が約 10%程度確認された。Exp. A からそれぞれ 3 日、6 日遅れて給餌を開始した Exp. B と Exp. C では体長に顕著な差異が認められ、発生段階については Exp. B の方がブラキオラリア期に達する個体が平均で約 5%多かった。さらに、Control とデトリタス餌を給餌した Exp. D を比較すると、Control では 14 日目には 90%以上の個体に奇形または退化 (Abnormal) が見られた一方で、Exp. D ではビピンナリア後期を維持した個体と、奇形化・退化した個体やビピンナリア初期へ後退した個体 (成長不全による収縮が認められる個体) がほぼ同じ割合で存在していた。このことからデトリタスを摂餌および消化について個体差がある可能性を示唆している。

(4) ブラキオラリア期の飢餓耐性実験

ブラキオラリア期の平均体長の変化 (図 3-2-24) に注目すると、実験開始時の選別により平均体長に多少の誤差はあるが、Day 18 (実験開始後 6 日目) まではどの実験系列においても体長の減少が認められた。この減少の理由は明らかではないが、初期及び中期ブラキオラリアへ成長が進まない不健全個体が収縮した影響と、ブラキオラリア幼生が刺激によって収縮しやすく、撮影された画像データに一定程度の過小評価が含まれている可能性がある。Day 18-21 (実験開始後 6~9 日目) にかけて、既に給餌が開始された Exp. A と Exp. B では体長の増加が、Exp. C と Control では体長の減少が確認され、有意な差異が認められた。また、原因を特定することは出来なかったが Exp. C は Day 22 に飼育容器内の個体数が顕著に減少したため、分析に供する試料を確保するためにその時点で飼育実験を終了した。

他方、成長段階を比較すると Exp. A では Day 15 (実験 3 日目) に中期ブラキオラリアへ成長し、Day 21 までに 9 割近くの個体が中期ブラキオラリアへの成長が確認された (図 3-2-26)。Exp. A よりも 3 日遅れて給餌を開始した Exp. B では Day 18 に中期ブラキオラリアへの成長が認められ、

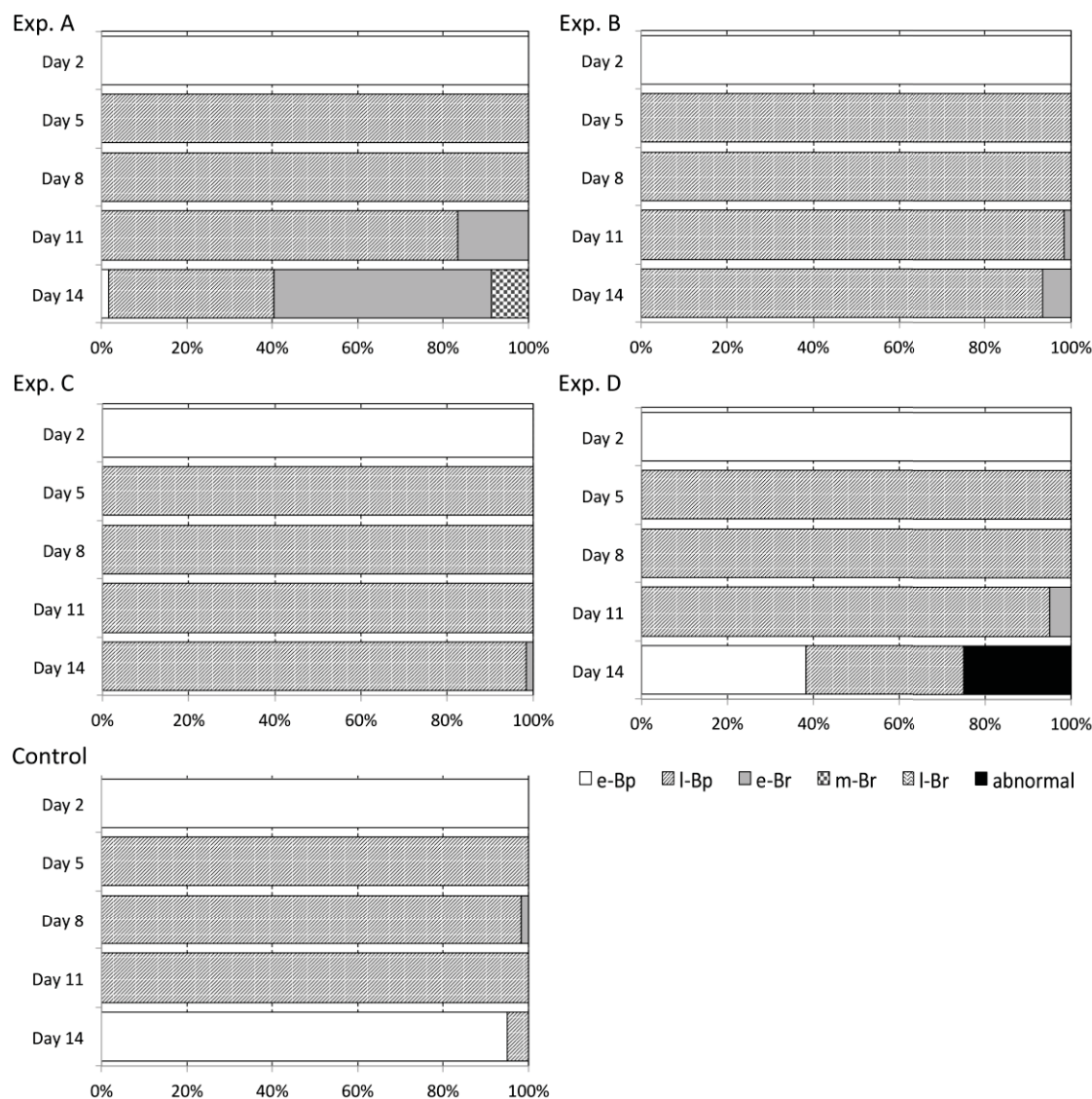


図3-2-25. ビピンナリア期の飢餓耐性実験の各条件における幼生の成長段階の組成変化. 省略記号はそれぞれ e-Bp:初期ビピンナリア, l-Bp:後期ビピンナリア, e-Br:初期ブラキオラリア, m-Br:中期ブラキオラリア, abnormal:奇形または退化を示す.

徐々にその割合は増える傾向を示した。6日間飢餓状態にさらされた Exp. C と全く給餌されない Control では、Day 18 までは成長段階の組成に顕著な変化は見られず、その後退化する個体が増え始めた。

ビピンナリア期とブラキオラリア期の両方に共通して、常に十分な餌を与えた Exp. A と 3日間飢餓を経験した Exp. B の間には成長速度に差が確認され、Exp. B の個体群が Exp. A に遅れて健全に成長が進む個体が見られたことから、オニヒトデ幼生は餌が全くない環境下に置かれても 3日間の飢餓状態には耐性があることが明らかになった。また、飢餓状態に置かれた後に 3日以内に餌環境が改善され、十分な餌を獲得できるようになると、初期ビピンナリアでは約 10%、初期ブラキオラリアでは約 30%の個体は正常に成長できることが明らかになった。また、Exp. B (飢餓状態 3日間) と Exp. C (飢餓状態 6日間) を比較すると、実験終了時の Day 25 には体長

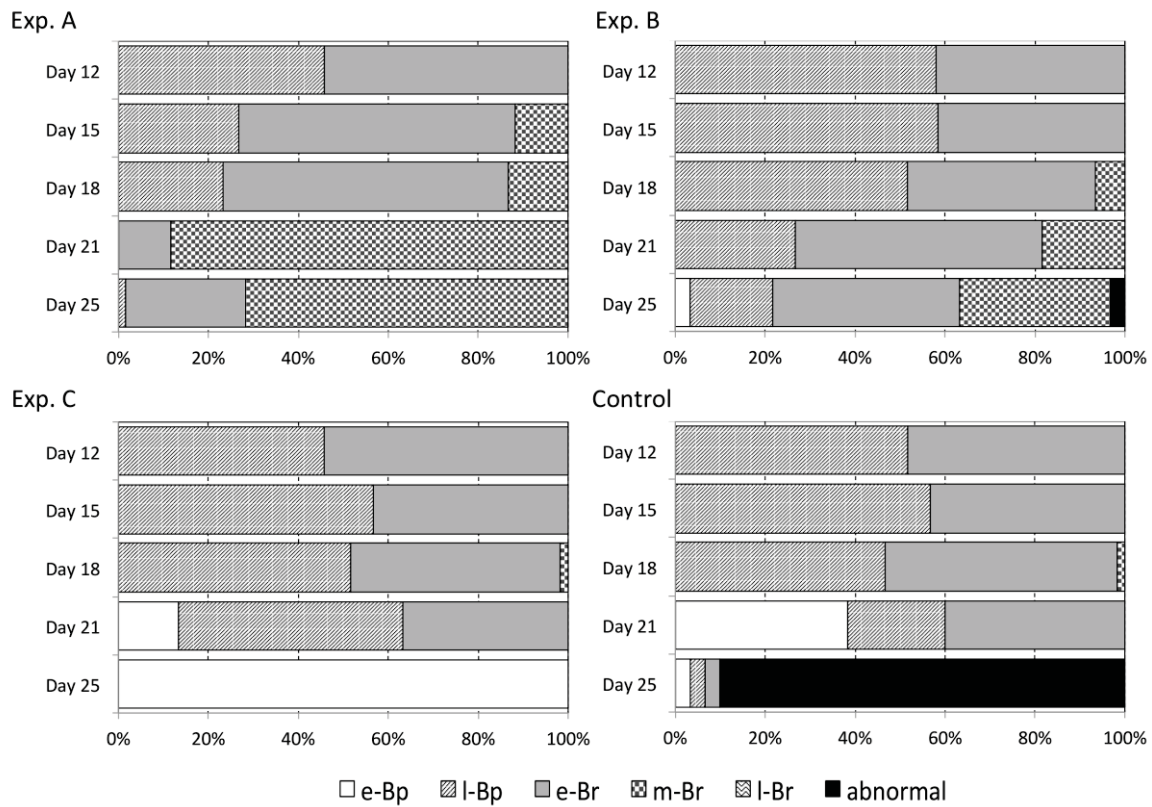


図3-2-26. ブラキオラリア期の飢餓耐性実験の各条件における幼生の成長段階の組成変化. 省略記号はそれぞれ e-Bp: 初期ビピンナリア, l-Bp: 後期ビピンナリア, e-Br: 初期ブラキオラリア, m-Br: 中期ブラキオラリア, abnormal: 奇形または退化を示す. Exp.C は Day 22 で実験を終了したため, Day 25 は no data (n.d.) とした.

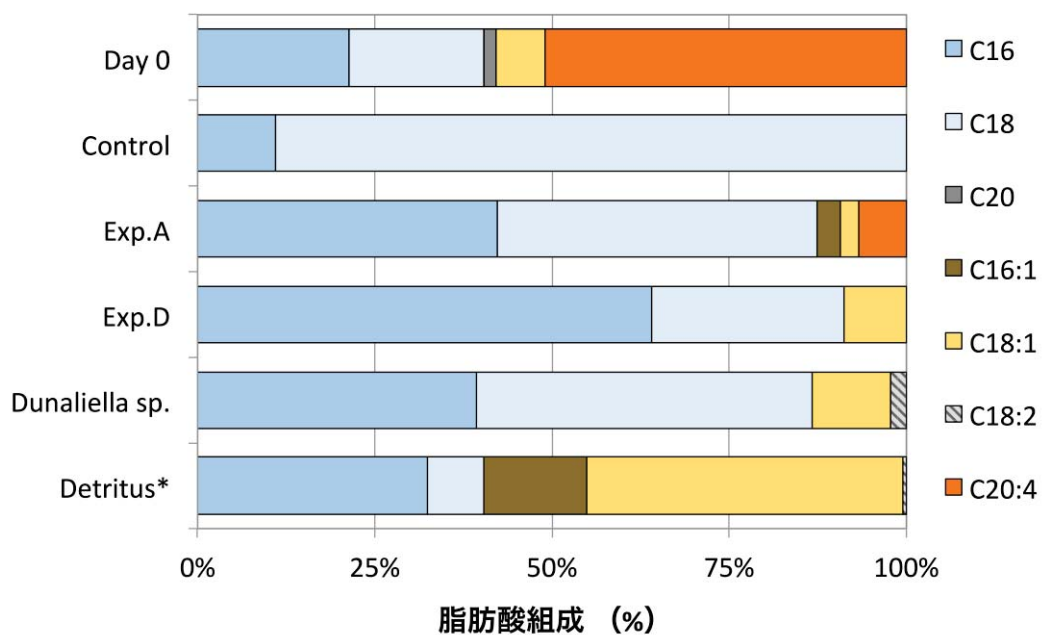


図3-2-27. 孵化直後と飢餓耐性実験終了時における幼生と餌の脂肪酸組成. 各種脂肪酸の表記は「C(炭素数):(不飽和度)」を示す. Detritus は Exp.D の餌に用いた藻類を加熱処理したデトリタス様有機物を指す.

と成長段階に有意な差が認められ、Exp. C に退化する個体が多く観察されたことから、飢餓状態が3日間以上続くと、オニヒトデ幼生の健全な成長が顕著に阻害されることが示された。

(5) 脂肪酸組成の比較

TMSH 誘導体化試薬を用いた Online-TMSH 法の 280°C による、孵化直後の幼生およびビピンナリア期の実験終了時における幼生と餌の脂肪酸分析の結果を示す (図 3-2-27)。孵化直後の個体 (Day 0) と餌を常時給餌した幼生 (Exp. A) には、多価不飽和脂肪酸 (PUFA) で必須脂肪酸の一種である C20:4 脂肪酸が検出された。一方、成長不全を起こした Control の幼生からとデトリタスを与えた Exp. D の幼生からは PUFA が全く検出されなかった。孵化直後の幼生は卵に含まれる親個体からの必須脂肪酸を有するが、初期成長にそれらが利用 (代謝) されていることを示している。また、給餌の有無 (Exp. A と Control) と両実験系列のオニヒトデ幼生に含まれる必須脂肪酸の有無と一致しており、オニヒトデが摂餌によって外部から必要な必須脂肪酸を獲得していたことが窺える。孵化直後 (Day 0) と Exp. A の幼生から PUFA の一種で細胞膜中のリン脂質中に存在する C20:4 (アラキドン酸) が検出されたが、これは一般的に植物が生合成できない脂肪酸であることから、幼生はその前駆体である必須脂肪酸のリノール酸 (C18:2 ω -6) を摂取し、自ら合成する能力を有する可能性が示唆された。本実験に与えた餌である *Dunaliella* sp. にはリノール酸が含まれることが確認されており (図 3-2-27)、これがオニヒトデ幼生の健全な成長には不可欠な要素の一つである可能性が高い。したがって、オニヒトデ幼生の餌環境の評価には chl. *a* を基準に見積もられる植物プランクトンの量的な議論だけでなく、このような個別の化合物に注目した餌の質も重要であることが示された。

2-5-4. まとめ

本実験の結果によりオニヒトデ幼生には、ビピンナリア期とブラキラリア期共に 3~6 日程度の飢餓耐性があることが明らかになった。さらに今後は飢餓期間の 3~6 日間のうち、どの時点にクリティカルな成長阻害を引き起こすタイミングがあるかを明らかにすると、幼生の同化メカニズムの検討や初期拡散モデリングへの応用が期待できる。

必須脂肪酸の検出には、前処理の操作が煩雑で単位時間当たりに分析できる試料数が限られてしまう従来の脂質抽出・誘導体化・GC/MS 分析を個別に行う方法ではなく、これらの過程を同時に行うことが可能な熱分解-GC/MS (pr-GC/MS) 分析法を用いる際に誘導体化試薬として TMSH が有効であることが確認された。これを用いて異なる餌環境で飼育された幼生を分析した結果、藻類を常時与えられた実験区 (Exp. A) の個体には必須脂肪酸が検出されたのに対して、餌を与えていない妖精とデトリタス様有機物を与えた実験区 (Exp. D) においては PUFA が全く検出されなかった。したがって、オニヒトデがビピンナリアからブラキオラリア、そして着底期へと健全に成長を進めるためには餌から必須脂肪酸を摂取する必要があることが示された。

熱処理によって藻類細胞が失活して chl. *a* 濃度が顕著に減少し、曝気によって破碎された細胞が攪拌されて擬似的なデトリタス様有機物になった可能性が高いが、前年度と同様に熱処理によるデトリタス様有機物ではオニヒトデ幼生が健全に成長しなかった。自然海水中の POM に含まれるデトリタスをオニヒトデ幼生が餌として効果的に利用しているかを判別するには、より自然環境に近いデトリタスを再現する必要があると思われる。

2-6. 総合考察

本事業の助成により平成 27 年度から 29 年度の 3 年間、自然海水中の粒状態有機物 (POM) に含まれるデトリタスに注目し、炭素・窒素安定同位体比分析および脂質分析を用いたオニヒトデ浮遊幼生期の餌資源に関する継続研究を行い、異なる餌条件による飼育実験と幼生と餌の化学分析の結果、主な成果として以下のことが明らかになった。

- 1) 安定同位体比分析の結果から、オニヒトデ幼生は自然海水中の懸濁態有機物 (POM) に豊富に含まれる植物プランクトンやバクテリア等の生物態の有機物以外の「デトリタス」を摂取・同化することが可能である。
- 2) 摂餌実験の観察結果から、培養藻類のみを餌として与えた場合に比べて、植物プランクトンやその他の微生物を含む自然海水中の POM を餌とした場合の方が、幼生の成長が促進される可能性がある。
- 3) 物理的な処理による擬似的なデトリタス様有機物の作成方法を検討し、含有 chl. *a* 量の減少率と電子顕微鏡観察の結果から、この作成には低温・短時間の加熱と曝気が有効である
- 4) デトリタス様有機物をオニヒトデ幼生に与えて飼育した結果、全く餌を与えない条件に比べて生存率は高まり、一部の個体ではブラキオラリア期への成長が確認されたことから、餌資源としてデトリタスはある程度は有用である。
- 5) オニヒトデ幼生は、孵化直後のビピンナリア期と次の成長段階のブラキオラリア期の両期間において、孵化直後から少なくとも 3 日、最長 6 日間は飢餓状態に対する耐性を有している。
- 6) 必須脂肪酸の検出には、前処理方法が簡便かつ少ない試料量 (オニヒトデ幼生で 100 匹程度) で測定可能な、TMSH を誘導体化試薬とする熱分解 GC/MS 分析が有用である。
- 7) 孵化直後のオニヒトデ幼生、培養藻類を餌とした幼生、デトリタスを餌とした幼生、全く給餌しない幼生の脂質組成を比較した結果、藻類を摂取して健全に成長した幼生には必須脂肪酸が検出され、その他の条件では孵化直後には有していた必須脂肪酸が検出されなかったため、幼生の成長には餌に含まれる必須脂肪酸が不可欠である。

これまでオニヒトデ大量発生メカニズムや理解するために、オニヒトデ幼生期の主要な餌資源として認識されている植物プランクトン量や組成と、幼生の生存率や成長度の関係性が積極的に試みられ、chl. *a* 量から見積もられる餌濃度が成長制限要因として議論されてきた。近年では、この餌濃度を含む様々な環境要因と拡散動態を組み込んだモデリングによる大量発生の予測も試みられている (e.g. Vanhatalo et al. 2017)。本研究によって新たに示されたオニヒトデ幼生によるデトリタスの利用と飢餓耐性に関する知見は、これまで chl. *a* によって判断していた自然環境下の餌濃度と幼生の生存率に対する評価方法を見直す必要性を示唆している。大量発生メカニズムの解明と高精度な予測モデルの構築には、自然海水中に存在するデトリタスを可能な限り再現した摂餌実験を行い、本研究で注目した炭素源 (必須脂肪酸) に加えて窒素源 (必須アミノ酸) についても詳細に検討することにより、オニヒトデ幼生の栄養動態の解明が期待される。今後はこれらの点に注力した研究が必要である。

2-7. 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.
- Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8): 911-917.
- Caballes CF, Pratchett MS, Buck ACE (2017) Interactive effects of endogenous and exogenous nutrition on larval development for crown-of-thorns starfish. *Diversity*, 9(1):15; doi:10.3390/d9010015
- Casareto BE, Suzuki Y, Fukami K, Yoshida K (2000) Particulate organic carbon budget and flux in a fringing coral reef at Miyako Island, Okinawa, Japan in July 1996. *Proceedings 9th International Coral Reef Symposium, Vol. 1*.
- Caron DA, Dam HG, Kremer P, Lessard EJ, Madin LP, Malone TC, Napp QJM, Peele ER, Roman MR, Youngbluth MJ (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.
- Chesher RH (1969) Destruction of Pacific Corals by the Sea Star *Acanthaster planci*. *Science*, 165: 280-283.
- Fabricius KE, 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.
- Ishida Y, Wakamatsu S, Yokoi H, Tsuge S. (1999) Compositional analysis of polyunsaturated fatty acid oil by one-step thermally assisted hydrolysis and methylation in the presence of trimethylsulfonium hydroxide. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 49(1-2): 267-276.
- Lucas JS (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.
- Nakajima R, Yoshida T, Othman BHR, Toda T (2010) High detritus/phytoplankton content in net-plankton samples from coral reef water: source of over-estimation in zooplankton biomass by measuring seston weight. *Plankton and Benthos Research*, 5(2): 69-73.
- Nakamura M, Higa Y, Kumagai NH, Okaji K (2016) Using long-term removal data to manage a crown-of-thorns starfish population. *Diversity*, 8(4):24; doi:10.3390/d8040024.
- Nakanishi O, Ishida Y, Hirano S, Tsuge S, Ohtani H, Urabe J, Sekino T, Nakanishi M, Kimoto T. (2003) Highly Sensitive determination of lipid components including polyunsaturated fatty acids in individual zooplankters by one-step thermally assisted hydrolysis and methylation-gas chromatography in the presence of trimethylsulfonium hydroxide. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 68-69: 187-195.

- 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 *Acartia steueri*. *Research in Organic Geochemistry*, 29: 61-64.
- Naumann, MS, Mayr C, Struck U, Wild C (2010) Coral mucus stable isotope composition and labeling: experimental evidence for mucus uptake by epizoic acoelomorph worms. *Marine Biology*, 157(11): 2521-2531.
- Okaji K, Ayukai T, Lucas JS (1997a) Selective uptake of dissolved free amino acids by the larvae of the crown-of-thorns starfish, *Acanthaster planci* (L.). 1: 613-616. *Proceedings of the 8th International Coral Reef Symposium, Panama, 24-29 June 1996.*
- Okaji K, Ayukai T, Lucas JS (1997b) Selective feeding by larvae of the crown-of-thorns starfish *Acanthaster planci* (L.). *Coral Reefs*, 16:47-50.
- Olson RR (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 TR, Maita Y and Lalli CM (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.
- Vanhatalo J, Hosack GR, Sweatman H (2017) Spatiotemporal modeling of crown-of-thorns starfish outbreaks on the Great Barrier Reef to inform control strategies. *Journal of Applied Ecology*, 54(1):188-197.
- Welschmeyer NA (1994) Fluorometric analysis of chlorophyll a in the presence of chlorophyll b and pheopigments. *Limnology and Oceanography*. 39:1985-1992.
- 沖縄県自然保護・緑化推進課 (2015) 平成26年度オニヒトデ総合対策事業報告書. 沖縄県環境部自然保護・緑化推進課. 平成27年3月. 315p.