海産ヒドロ虫クダウミヒドラ類の繁殖分布及び 室内幼生試験法に関する予備検討*

山下 桂 司** 神谷 享 子** 鈴木 紘 一**

Preliminary Studies on Distribution of Marine Fouling Hydroids *Ectopleura* and on Laboratory-based Actinula Larval Settlement Assays

By Keiji Yamashita, Kyoko Kamiya, and Kouichi Suzuki

Only a few studies have been devoted to the species identification and the distribution of marine hydroids *Ectopleura* in Japanese coastal waters, despite the scale of fouling problems that they pose. We collected polyps from the coast of the western and northern parts of Japan, and analyzed their morphological characters and mitochondrial COI genes. As a result, while polyps settled on fishing nets along the coast of Hokkaido were *Ectopleura radiata*, *E. crocea* were spotted along the Pacific coast of Honshu. Dense polyp colonies on pontoons along the coasts of Seto Inland Sea in mid-to-late winter were also identified for the first time as *E. radiata*. In addition, phylogenetic analysis has identified *Ectopleura* sp. JRH-2014 spotted in the China Seas as *E. radiata*. Regarding actinulae of *E. radiata*, we devised a new assay composed of hexagonal columnar cell using test slide glasses, and a magnetic stirrer, and examined the settlement inhibitory effects of the silicone-based coatings. The results found that actinulae proved very sensitive to copper pyrithione contained in anti-fouling agents and the age of coatings.

1. はじめに（背景）

ヒドロ虫類は、鉢クラゲ類やイソギンチャク類、サンゴ類と同じ刺胞動物（しほうどうぶつ）に属する動物群である¹⁾。多くの種類は、一生のうち基盤に付着して過ごす着生時期と海中に浮遊して過ごす浮遊時期を持ち、その着生時期の姿をポリプと呼んでいる。

沿岸で見られる着生ヒドロ虫類は、ポリプが群体性で、植物のような形状のものが多く、それぞれ、根のような部位（ヒドロ根または走根）、茎のような部位（ヒドロ茎）、花のような部位（ヒドロ花）からなっている（図1右上）。ヒドロ根（走根）で基盤に固着し、ヒドロ花の触手で動物プランクトンを捕えて捕食する¹⁾。

クダウミヒドラ類は、ヒドロ茎の高さが数 cm 程度で紅色のヒドロ花を持つ群体性の海産ヒドロ虫類である（図1上）。水産関連設備や臨海発電所の海水使用系統内等、海中の様々な人工構造物に着生・繁殖することによって被害を及ぼすことが知られている²⁾。

このクダウミヒドラ類は、アクチヌラ幼生と呼ばれる特殊な形状の幼生を持っているが（図1右下）、この幼生の着生過程や着生メカニズムに関しては、科学

技術振興機構・伏谷着生機構 PJ の研究グループ等によって、その一端が解明されている³⁾⁶⁾。また、海外産の特定種については、最近、北欧や米国のグループによって、付着生態に関する基礎研究が活発に行われている⁷⁾⁹⁾。一方、このクダウミヒドラ類では、種類の誤同定の例が非常に多く、分類が混乱していることも相まって、どの海域に、どういう種類のクダウミヒドラ類が着生分布しているかといった基本的な知見が世界的にも少なく、情報が錯綜しているのが現状である¹⁰⁾¹²⁾。

図1 クダウミヒドラ類の着生ポリプ群体と
アクチヌラ幼生及び定着1日後の幼ポリプ

*原稿受付 令和元年8月19日。

**株式会社セシルリサーチ 研究開発部門（姫路市白浜町甲770番地）。

また、我が国の定置網や臨海プラント等では、クダウミヒドラ類の大規模な群体着生によって様々な被害を受けているものの、種及び分布に関する詳細な解析例は皆無に等しいのが現状である。さらに、クダウミヒドラ幼生付着に対する各種塗料・材質の効果を迅速に評価しうる室内試験法についても、未確立である。

本研究では、まず、日本各地沿岸から採取されたクダウミヒドラ類について、形態学及び分子生物学的な解析を行い、種類と分布繁殖状況の概要を把握することを目的とした。また、クダウミヒドラ幼生を用いて、幼生付着に対する各種塗料基盤の効果を迅速に定量評価しうる簡易試験法を開発することを目的として、予備的な検討を行った。

予備的な段階ではあるが、種類と分布繁殖状況については、全く想定外の新規知見が得られており、また生物試験についても、クダウミヒドラ幼生における特定の感受性の高さを示す興味深い結果が得られている。以下に簡単に紹介したい。

2. クダウミヒドラ類の繁殖分布状況 (予備調査)

2.1 材料及び方法

北海道 6 地点、本州太平洋 3 地点、瀬戸内海 8 地点、及び日本海 1 地点の計 18 地点の海域において、クダウミヒドラ類のポリプ群体 (及び幼生) の出現・着生状況を調べ、一部試料採取を行った。各地試料について、成熟ポリプや幼生の形態を比較観察するとともに、ミトコンドリア DNA (COI 領域) 塩基配列解析を行い、既存データとの相同性検索及び分子系統解析によって、種類の同定を行った。以下、項目ごとに述べる。

2.1.1 調査地点・調査基盤及び調査時期

クダウミヒドラ群体の着生状況に関する調査地点及び調査基盤を図 2 に示す。

厚岸以外の北海道 5 地点 (羅臼、野付、根室、浦河、榎法華 (とどほっけ))、本州太平洋 3 地点 (下北、釜石、串本)、及び日本海 1 地点 (温泉津) においては、2016 年 10 月～2017 年 1 月、沖合の定置網及び試験網におけるポリプ群体の着生状況を調べ、一部試料採取を行った。また、各地 1～4 回 (合計 13 試料)、目合 100 μ m のプランクトンネット鉛直曳き (海水 1m³ 分) によって、海水中における幼生出現状況を調べた。

北海道東部の厚岸は、クダウミヒドラ類 2 種の原記載地であり、ここでは、2017 年 7 月 26・27 日に、厚岸湖・厚岸湾内及び沿岸の浮き桟橋やアマモ葉上における群体の着生状況を調べ、一部試料採取を行った。

瀬戸内海については、2017 年 11 月～2018 年 2 月及び 2018 年 6 月中・下旬において、播磨灘から周防

灘沿岸 (本州側) を現地踏査し、浮き桟橋等への群体着生状況を調べるとともに、一部試料採取を行った。また、大阪南港・玉島・小野田沿岸では、2017 年 10 月より試験ロープを浸漬し、群体の着生状況を調べ、一部試料採取を行った。結局、瀬戸内海では 8 地点 (図 2) で着生状況の調査、一部試料採取を行った。

2.1.2 試料調製

採取したポリプ群体は、原則として、現地で、雌雄及び成熟状態を観察し、99.5%エタノール保存した。

比較的大型で成熟した雌ポリプ群体が採取された場合には、同一群体を二分し、5%ホルマリンと 99.5%エタノールの 2 通りで固定した。さらに、一部の成熟雌ポリプ試料を生体試料として分け、生きたまま海水に収容し実験室まで冷蔵運搬した。

No. 調査地点 (都道府県): 調査基盤

- ① 羅臼 (北海道): 沖合定置網・試験網
- ② 野付 (北海道): 沖合定置網・試験網
- ③ 根室 (北海道): 沖合定置網・試験網
- ④ 厚岸 (北海道): 沿岸アマモ
- ⑤ 浦河 (北海道): 沖合定置網・試験網
- ⑥ 榎法華 (とどほっけ) (北海道): 沖合定置網・試験網
- ⑦ 下北 (青森県): 沖合定置網・試験網
- ⑧ 釜石 (岩手県): 沖合定置網・試験網
- ⑨ 串本 (和歌山県): 沖合定置網・試験網
- ⑩ 南港 (大阪府): 沿岸試験基盤
- ⑪ 東播磨 (兵庫県): 沿岸浮き桟橋
- ⑫ 妻鹿 (兵庫県): 沿岸浮き桟橋
- ⑬ 赤穂 (兵庫県): 沿岸浮き桟橋
- ⑭ 下津井 (岡山県): 沿岸浮き桟橋
- ⑮ 玉島 (岡山県): 沿岸試験基盤
- ⑯ 竹原 (広島県): 沿岸浮き桟橋
- ⑰ 小野田 (山口県): 沿岸試験基盤
- ⑱ 温泉津 (島根県): 沖合定置網・試験網

図 2 クダウミヒドラ類繁殖分布状況の調査地点及び調査基盤

2.1.3 形態観察

種類の査定上、成熟した雌ポリプの生殖体の形態が重要なキーとされている。この点に注目し、各地ポリプ試料の実体・生物顕微鏡による形態観察を行った。また、北海道大学附属愛冠（あいかつぶ）自然史博物館にて所蔵保存されている各種クダウミヒドラ類のポリプ標本について同様の形態観察を行った。

各地プランクトン試料については、各種顕微鏡下で幼生等の出現個体数を調べた。生体試料については、幼生を遊出させ、その形態及び行動を観察・記録した。

これらの観察結果を各地試料や既報文献と比較・整理することによって、形態による種類同定を試みた。

2.1.4 遺伝子解析

エタノール保存したポリプ試料について、群体から比較的大型の1ポリプを選別し、ヒドロ花触手を切断、チューブに入れ、風乾してエタノールを飛ばした後、滅菌水を添加・懸濁した。その後、直接PCR法により、ミトコンドリアDNAのCOI（チトクロームオキシダーゼサブユニット1）遺伝子部分領域の増幅を行った。増幅には、Folmerら（1994）によって設計されたユニバーサルプライマーセットを用いた¹³⁾。

増幅遺伝子はサンガー法によりDNAシーケンサを用いて解析した。この解析結果を元にCOI領域658塩基対部分の配列を決定した。決定した塩基配列について、NCB BLASTによる既存データとの相同性検索を行った。また、既存データとの共通領域574塩基対を元に、フリーソフトMEGA6を用いて分子系統解析を行い、種類の同定を試みた。

2.2 結果

2.2.1 クダウミヒドラ群体の着生状況

クダウミヒドラ類群体の着生状況及び試料採取状況を表1にまとめた。

北海道沿岸・沖合では、7月及び10・11月、東北沖合では10月に、成熟ポリプ群体の着生が確認された。

瀬戸内海沿岸の浮き桟橋等の場合、6月中・下旬の現地踏査では群体の着生・繁茂は確認されず、12～2月に成熟群体の着生・繁茂が確認された。特に、東播磨浮き桟橋では、浮き桟橋側面・下面に非常に多数のポリプ群体がびっしりと繁茂した状態が確認された。

解析試料としては、北海道の野付の試料が乾燥し、解析不能であった。また、北海道の浦河、島根県の温泉津では、着生群体及び幼生とも出現無しであった。

串本では着生群体が得られなかったものの、プランクトン試料中にアクチヌラ幼生1個体の出現が確認されたため、これを解析試料とした。下北及び小野田では、各々、時季の異なる2試料を採取し、解析した。

すなわち、北海道4地点（羅臼、根室、厚岸、樺法華）、本州太平洋側3地点（下北、釜石、串本）、瀬戸内海本州側8地点（大阪南港、東播磨、妻鹿、赤穂、

下津井、玉島、竹原、小野田）の計15地点から17試料（ポリプ16、幼生1）を採取し、解析に用いた。

なお、北海道・本州太平洋及び日本海の沖合プランクトン試料中におけるアクチヌラ幼生の出現状況（個体数/m³）については、下北で10月に1個体、串本で12月に1個体出現したのみであり、他の11試料中にはアクチヌラ幼生の出現は全く観察されなかった。

2.2.2 形態観察結果

各地ポリプ試料について、成熟雌ポリプの生殖体の形状に注目して観察を行った。

北海道の着生ポリプでは、生殖体口の周縁に特徴的な有頭型触手状突起（図3参照）が確認された。文献及び愛冠自然史博物館の標本と比較した結果、これらは、形態上、キタクダウミヒドラと判断された。

下北・釜石の着生ポリプでは、生殖体の周縁に数個の葉状～トサカ状のコブ突起（図3参照）が確認され、これらは従来種ベニクダウミヒドラと判断された。

一方、瀬戸内海沿岸では兵庫県（東播磨・妻鹿・赤穂）及び山口県（小野田）で成熟雌ポリプが得られた。

表1 クダウミヒドラ群体の着生状況及び試料採取状況

試料採取海域	着生基盤等	採取時期	状態等
①羅臼(北海道)	沖定置網・試験網	2016年11月19日	成熟群体
②野付(北海道)	沖定置網・試験網	2016年11月16日	茎のみ(乾燥)
③根室(北海道)	沖定置網・試験網	2016年11月17日	成熟繁茂群体
④厚岸(北海道)	沿岸アマモ	2017年7月26日	成熟小群体
⑤浦河(北海道)	沖定置網・試験網	2016年11月15日	着生無し 幼生非出現(春立)
⑥樺法華(北海道)	沖定置網・試験網	2016年10月18日	成熟繁茂群体
⑦下北A(青森県)	沖定置網・試験網	2016年10月3日	成熟繁茂群体
⑦下北B(青森県)	沖定置網・試験網	2016年12月21日	茎のみ群体
⑧釜石(岩手県)	沖定置網・試験網	2016年10月15日	成熟繁茂群体
⑨串本(和歌山県)	沖プランクトン試料	2016年12月26日	着生無し アクチヌラ幼生出現
⑩南港(大阪府)	沿岸試験基盤	2017年12月20日	幼群体
⑪東播磨(兵庫県)	沿岸浮き桟橋	2018年1月16日	成熟大繁茂群体
⑫妻鹿(兵庫)	漁港浮き桟橋	2018年2月26日	成熟小群体
⑬赤穂(兵庫)	沿岸浮き桟橋	2018年2月15日	成熟繁茂群体
⑭下津井(岡山県)	漁港浮き桟橋	2018年3月21日	茎のみ群体
⑮玉島(岡山県)	沿岸試験基盤	2018年1月19日	若群体
⑯竹原(広島県)	沿岸浮き桟橋	2018年2月15日	小群体
⑰小野田A(山口県)	沿岸試験基盤	2017年12月8日	成熟小群体
⑰小野田B(山口県)	沿岸試験基盤	2018年2月7日	成熟群体
⑱温泉津(島根県)	沖定置網・試験網	2016年10月26日	着生無し 幼生非出現

図3 キタクダウミヒドラ雌生殖体の有頭型触手状突起（左、矢印）とベニクダウミヒドラ雌生殖体の葉状コブ突起（右）

これらの形態を観察した結果、兵庫県の1月・2月着生ポリプでは、生殖体に有頭型触手状突起が確認され(図3)、形態上、キタクダウミヒドラの可能性が高いと判断された。また、小野田では12月着生ポリプはベニクダウミヒドラ、2月着生ポリプはキタクダウミヒドラの可能性が高いと判断された。

また、キタクダウミヒドラの原記載地である厚岸において、7月の調査中に成熟♀ポリプからアクチヌラ幼生が次々遊出する状態が観察された。これらの幼生の形態を、東播磨産ポリプから得られた幼生と比較した結果、両者ともに、触手の数11・14本(主に12本)触手の長さ2mm強であり、ベニクダウミヒドラのアクチヌラ幼生のほぼ倍の大きさであった。

また、これらの幼生の入ったミニディッシュを実体顕微鏡の照明下で静置していた所、ディッシュ内の水温が上昇したが、その際、幼生触手が急速に張り进行を失い、上皮組織が傷み始めている状態が観察された。

2.2.3 遺伝子解析結果

17試料(ポリプ16、幼生1)について、遺伝子解析を行い、ミトコンドリアDNAのうち、COI領域658塩基対の塩基配列を決定した。MEGA6を用いて、既存登録データとの共通領域574塩基対を元に系統解析した結果を図4に示す。外群として、淡水産ヒドラ(*Hydra vulgaris*)を設定した。

下北B(12月)、釜石(10月)、串本(12月)、南港(12月)及び小野田A(12月)の各試料は、南アフリカ産*Ectopleura crocea*(すなわちベニクダウミヒドラ)と1塩基異なるのみ(変異率0.17%)であり、遺伝的に極めて近縁であることが判明した。また、下北A(10月)も7塩基異なるのみ(1.22%)であり、これらは、従来種のベニクダウミヒドラと判断された。

一方、播磨灘~周防灘の本州側沿岸産の着生群体ポリプは、多型は多いながらも、北海道産の着生群体ポリプと遺伝的に近縁であることが判明した(東播磨産を中心にして、変異率0~8.89%)。

すなわち、遺伝子解析の結果からも、兵庫県・岡山県・広島県・山口県瀬戸内海沿岸の1月~3月着生群体ポリプは、北海道特有種とされてきたキタクダウミヒドラの可能性が高いと判断された。さらに、東播磨・赤穂及び竹原沿岸産の着生群体ポリプのCOI遺伝子配列(574塩基対)は、北海道・函館市の榎法華(とどほっけ)沖合定置網・試験網に着生していた群体ポリプの遺伝子配列と100%一致した。また、小野田沿岸では、遺伝子解析の結果でも、やはり、12月着生ポリプはベニクダウミヒドラ、2月着生ポリプはキタクダウミヒドラの可能性が高く、2種が時季を微妙にずらしながら混在していることが示唆された。

なお、相同性検索の結果、これらキタクダウミヒドラと相同なものとして、*Ectopleura* sp. JRH-2014

KF96211がヒットした。これは2013年12月、アモイ大学により中国の海の試料として配列のみ登録されたものであり、論文が非公表のため詳細は不明である。

2.3 考察

2.3.1 種類と分布

キタクダウミヒドラは、1937年、北海道・厚岸産のポリプについて、内田により新種記載されたヒドロ虫である¹⁴⁾。その分布について、公表されたものとしては厚岸以外からの報告は無く、北海道特有種とされてきた¹⁵⁾。また、1965年の長尾による報告¹⁶⁾を最後に、関連する情報がほぼ完全に途絶えた形となっていた。

一方、特に北海道や東北沖合の定置網では、古く(少なくとも30年以上前)からクダウミヒドラ類群の着生繁茂が問題となっており、各企業で、独自の防汚成分の探索や生物試験が行われてきた。しかしながら、最も基礎的な種や生態分布については未解明であった。

つまり、キタクダウミヒドラについて、厚岸以外の全ての地点におけるポリプ着生の記録は、正式なものとしては、本報告が国内外で初めての記録となる。

本研究の結果(予備段階ではあるが)、形態及び遺伝子の両面から、北海道沿岸及び沖合ではキタクダウミヒドラ(推定)が着生分布し、東北沖合ではベニクダウミヒドラが着生分布していることが、初めて明らかになった。この明瞭な分布境界が形成される要因については、海水中におけるアクチヌラ幼生出現の少なさも含めて、今後さらに詳細な解析が必要と考えられる。

さらに、盛冬の瀬戸内海沿岸に広く着生分布している種類が、キタクダウミヒドラ(推定)であることが判明した。これは、特筆に値する新知見だといえる。

このキタクダウミヒドラの種同定に関しては、原記載自体がかなり不十分であり、登録遺伝子も皆無である。今後は、再記載の検討も含めて、分類学者の協力・指導の下で詳細な調査・解析を進めたいと考えている。

2.3.2 系統推定結果について

海洋生物の地理的分布や系統進化において、地史との関連性が重要であることは、他の生物群で明らかにされている通りである^{17),18)}。一方、着生刺胞動物の場合、地史・環境変遷と関連した種間の系統進化については世界的にもほとんど研究例が無いのが現状である。

図4の系統樹を見ると、ベニクダウミヒドラ(の系統)から、順次、*Ectopleura marina*(北米太平洋岸に分布)、及び*Ectopleura larynx*(主に北海に分布)が派生し、その後、*E. larynx*から、比較的新しく、キタクダウミヒドラが派生・特化してきた(さらに、根室から種内派生)ように見える。また、今回の予備観察結果によると、このキタクダウミヒドラは、以下のよう明瞭な特徴を持っていることが示された。

①♀生殖体の有頭型触手状突起と大型幼生。

②群体が水温7~14℃で繁茂・成熟、高水温下で退行。

③幼生は高水温耐性がかなり低い。

つまり、キタクダウミヒドラは、分布的にも、系統

的にも、形態的にも、生態的にも、生理的にも、新しい知見に満ちた魅力的な生物種であると思われる。

今後、分布調査や系統解析 (16SrRNA 等の他遺伝子での検討を含めて)、ベニクダウミヒドラとの生態・生理比較、及び種間競争の解析によって、刺胞動物の系統・生態進化に全く新しい視点を加えることができる可能性があり、今後の展開が期待される。

2.3.3 函館・榎法華と瀬戸内海とをつなぐ要因

形態及び COI 遺伝子解析の結果、東播磨沿岸を中心にして、盛冬の瀬戸内海沿岸の人工基盤に着生・繁殖しているクダウミヒドラ類群は、従来種ベニクダウミヒドラではなく、北海道特有種とされてきたキタクダウミヒドラである可能性が高いことが判明した。

さらに、東播磨・赤穂及び竹原沿岸の群体ポリプは、北海道・函館の榎法華漁港沖の定置網・試験網に着生していた群体ポリプと遺伝的かつ特異的に極めて近縁 (ほぼ同一の母系由来) であることが示唆された。

距離を越え、両者が遺伝的につながる要因としては、今の所全く不明であるが、可能性としては、自然的な要因から人為的な要因まで、様々な可能性が考えられる。例えば、瀬戸内海の冬の海水温は予想以上に低く、その海底では、様々な冷水種が生息していることが知られている。すなわち、氷河期・寒冷期に分布を南下させた生物種が、他の開放海域では死滅する一方、瀬戸内海海底で特異的に生き残った (遺存種) とされるものであり、例として、冷水種のイカナゴ、ムツサング、ミネフジツボ等があげられるだろう^{19),20)}。キタクダウミヒドラの場合、寒冷期に瀬戸内海に進出し、その後温暖期には組織塊として耐えしのび、低水温期にのみ再生・繁殖を繰り返してきたと考えられる。

ただし、この場合、低水温でやや流れの速い条件を備えている他の海域に、北海道南西部へとつながる母系集団が散在的にでも生息・繁殖しているはずであり、それがまだ見出されていないということになる。

もう一つは、人為的な要因によるものである (具体的なルートは全く不明であるが、今の所、この人為的な要因の可能性が高いと考えている)。それは、船舶、台船、漁具、水産物あるいは観賞・研究用材料を介した移入・混入である。この例としては、ナンオウフジツボ、キタアメリカフジツボ、イチイズタ等が挙げられる²¹⁾。この点では、*Ectopleura* sp. JRH-2014 に関する詳細な情報がほしい所であり、近年、分布を拡大するような何らかの要因が生じているのかもしれない。

今後は、各地要所で各 30 試料程度採取し、その遺伝子型組成 (ハプロタイプ頻度) を解析・比較することによって、集団としての移入プロセスなどの一端を解明することが可能になるのではないかと考えられる。

2.3.4 付着被害の予測と対策について

キタクダウミヒドラの繁殖盛期は、厚岸と東播磨とでほぼ同様、7~13℃である。また、ヒドロ虫類の場合、幼生の他、成熟ポリプ片や走根片の漂流等、様々な分散法が知られており、タネの付着から 1 カ月前後で群体繁殖へと至りうる。つまり、今後、瀬戸内海沿岸では、冬季、どこでも、キタクダウミヒドラの突発的な出現・繁殖が生じうると考えられる。また、他海域でも環境次第で、その可能性があると考えられる。

したがって本種による付着被害を予測し、対策法を立案する上でも、今後、本種の分布や出現動向及び生態生理に関する調査試験、環境調和型の付着制御法の探索が、非常に重要になると考えられる。

図4 ミトコンドリア DNA (COI 領域 574 塩基対) に基づくクダウミヒドラ類の系統推定結果 (ML 法 (最尤法))

分岐点の数字はブートストラップ値 (この値が 100 に近いほど、分岐形の信頼性が高い)。

左下のスケールバー: 進化距離。左側ほど時代が旧く (上流), 右側に進むほど時代が新しい (下流)。

3. 簡易幼生付着試験法に関する基礎検討

3.1 材料及び方法

上記の解析によって同定された東播磨沿岸産キタクダウミヒドラのアクチヌラ幼生を用いて、室内簡易付着試験法に関する基礎検討を行った。以下に述べる。

3.1.1 試験生物

東播磨沿岸の浮き桟橋に着生繁茂していたキタクダウミヒドラ群体を採取・運搬後、成熟雌ポリプのみ選別し、ビーカー海水中に垂下・静置した。遊出した多数のアクチヌラ幼生をピックアップし、試験に用いた。

3.1.2 試験基盤・試験塗料

試験基盤として、スライドガラス (7.6cm x 2.6cm x 厚み 1mm, MATSUNAMI S2215) を用いた。

洗浄した新品スライドガラスを対照区とした。

試験区としては、以下に示すとおり、スライドガラス片面に市販のプロペラ用シリコーン樹脂系防汚塗料 2 種 (A, B) を、それぞれ塗布したものを用いた。

①A-銅ピリチオン含有 (色 ; イエローブラウン)

②B-防汚成分非含有 (色 ; 無色透明)

さらに、各試験塗料は、塗布乾燥後、直ちに試験に用いるものと、あらかじめ海水中で 1 週間~1 ヶ月間高速攪拌することによって劣化促進 (初期溶出分を除く) させたものの 2 シリーズ設定した。

3.1.3 簡易塗料劣化促進試験法の検討

室内でできるだけ簡単かつ小規模に、防汚塗料の劣化を促進・制御できる系について予備検討を行った。

この塗料簡易劣化促進試験の状況を図 5 に示す。

試験条件・方法は、以下の通りである。

①試験容器 : 10 ガラスビーカー

②海水 : 粗濾過 (孔径 3 μ m 濾過) 天然海水 1000ml, 2 週間に 1 回全換水

③温度 : 室温

④試験方法 (図 5) : 各試験スライドガラス基盤の裏面にマグネチックテープを貼り付けた後、上記の海水を満たしたビーカー内壁面に立てかけ、ビーカーの外からボタン磁石で固定した。その後、マグネチックスターラー (ST-10, ケニス社製) と円盤状攪拌子 (クロスヘッド回転子ダブル Φ 40mm) を用いて、回転速度 800rpm (流速約 5m/sec に相当と推定) で連続攪拌することによって、試験塗料の劣化促進をめざした。攪拌期間は、0 日、1 週間、2 週間、1 ヶ月とした。

3.1.4 簡易幼生付着試験法の検討

クダウミヒドラ類幼生に対する付着抑制効果を定量的に評価しうる簡易試験法について予備検討を行った。

試験条件・方法は、以下の通りである。

①容器 : 深型ミニガラスシャーレ (径 6cm x 高さ 6cm)

②海水 : 粗濾過 (孔径 3 μ m 濾過) 天然海水 100ml

③温度 : 室温

④試験幼生数 : 52~64 個体 / 区

⑤試験方法 (図 6) : 対照区及び試験区ごとに、6 枚のスライドガラス基盤を組み合わせ、6 角柱状に組み立て、深型ミニシャーレ内面に設置 (ほぼぴったりフィットする) し、付着セルとした。この中に、濾過海水を満たし、小型マグネチックスターラー (SM-15S, 増田理化工業) 及び小型攪拌子 (長さ 30mm x 径 8mm) を用いて、回転速度 60rpm (流速 14 $\pm$ 2 cm/sec に相当と推定) で緩やかに攪拌した。その後、アクチヌラ幼生を移し入れ、攪拌による海水の動きを利用して、試験基盤への幼生の接触・付着を促した。

試験開始から一定時間ごとに、上部から経過を観察し、24 時間後、実体顕微鏡下で試験基盤及び容器底面への幼生付着状況・状態を観察・計数した (図 7 参照)。

図 5 簡易塗料劣化促進試験法の検討状況
側方より撮影 (左)、 覆いを外して上方より撮影 (右)

図 6 簡易幼生付着試験法 (6 角柱型攪拌付着試験法)
側方から撮影 (左)、 蓋を外して上方から撮影 (右)

図 7 クダウミヒドラ幼生の行動・状態模式図

3.2 結果

3.2.1 簡易塗料劣化促進試験法

簡易塗料劣化促進試験については、マグネチックテープと外面側からのボタン磁石の組み合わせによって、試験基盤を、簡易かつ自在に固定・着脱可能な系を見出すことができた。また、1ヶ月間程度は、安定回転していることが確認された。

3.2.2 簡易幼生付着試験

キタクダウミヒドラ幼生を用いた室内簡易付着試験について、まず対照区(2回)の結果を、図8に示す。

対照区では、攪拌に伴って多数の幼生が浮遊し、幼生の触手先端が試験基盤に接触すると即座に一次付着し、急速に定位行動を開始する状態が観察された。1日後、全幼生が触手を伸長しており、62.9%(1回目)及び85.7%(2回目)の個体がスライドガラス面及び容器底面コーナーへ定着・走根形成した状態であった。

一方、試験塗料A(銅ピリチオン含有シリコン系防汚塗料)における結果を、図9に示す。

劣化処理無し区の場合、試験開始から10分後では16.1%の幼生が塗装面に一次付着したものの、その後、幼生の触手が急速に萎縮、24時間後には、全個体、試験容器底面で、組織崩壊(部分～完全)状態となった。

また、1週間劣化促進処理区の場合、試験開始から10分後では80.6%と多数の幼生が塗装面に一斉に一次付着した。しかしながら、1時間後には触手の萎縮が始まり、塗装面から次々脱落していく状態が観察された。24時間後には、さらに萎縮・組織崩壊が進行した状態が観察されたが、8.1%の個体が萎縮・崩壊しながらも塗装面上へ定着している状態が観察された。

すなわち、銅ピリチオンを含有する本塗料の場合、アクチヌラ幼生は明瞭な触手萎縮・組織崩壊反応を生じることが判明した。また、その反応が生じる早さには、初期溶出(劣化処理)の有無によって、明瞭な差異が見られることが判明した。

また、試験塗料B(銅ピリチオン等の防汚成分を含有していないシリコン系防汚塗料)における結果を、図10に示す。

本塗料の場合、試験中、全幼生が触手を伸長しており、一部～やや多数の個体が塗装面上に定着・走根形成している状態が観察された。24時間後の塗装面への定着・走根伸長率は、劣化無し区42.2%、劣化促進2週間区14.8%、劣化促進1ヶ月間区28.3%であった。

また、本試験の場合、剥離した幼ポリプが確認され、その出現率は、劣化無し区0%、劣化促進2週間区5.6%、劣化促進1ヶ月間区1.9%であった。

すなわち、幼生付着に対する抑制効果及び剥離効果

とも、劣化促進2週間区が最も高く、次いで劣化促進1ヶ月間区、最後に劣化無し区の順序であった。

つまり、本試験法によって、銅ピリチオン含有の有無及び劣化処理の有無でアクチヌラ幼生の反応・状態に明瞭な差異が見られること、及び幼生付着抑制効果を簡易かつ迅速に定量評価しうることが示された。

基盤	幼生 行動・状態	24時間後における 幼生の行動・状態%	
		試験1回目	試験2回目
スライド ガラス面	一次付着・定位	4.8	1.6
	定着・走根	43.5	47.6
容器 底面	一次付着・定位	32.3	7.9
	定着・走根	19.4	38.1
合計	一次付着・定位	37.1	9.5
	定着・走根	62.9	85.7
特記		全個体 触手伸長、 状態良好	全個体 触手伸長、 状態良好

図8 対照(清浄スライドガラス)区における結果

(A) 2時間後スライドガラスに多数の幼生が一次付着

(B) 24時間後スライドガラスに走根伸長した幼体

スケールバー=1cm (A) 及び1mm (B)

基盤	幼生の 行動・状態	劣化促進 処理無し区			1週間劣化促進 処理区		
		経過時間・状態%			経過時間・状態%		
		10分	2時間	24時間	10分	2時間	24時間
試験 塗装 面	一次付着	16.1	0	0	80.6	0	0
	定着	0	0	0	0	0	*8.1
容器 底面	一次付着	16.1	8.1	0	0	0	0
	*萎縮 定着	0	*14.5	0	0	0	0
合計	一次付着	32.2	8.1	0	80.6	0	0
	*萎縮 定着	0	*14.5	0	0	0	*8.1
特記		触手萎縮 組織崩壊	触手 伸長	強く 萎縮	組織 崩壊	触手 伸長	やや 萎縮

図9 試験塗料A(銅ピリチオン含有)区における結果

(A)劣化無し区2時間後、触手が萎縮した幼生(容器底面上)

(B)劣化無し区24時間後、触手組織崩壊(容器底面上)

(C)1週間劣化促進区24時間後、塗装面に定着部組織残存
スケールバー=300µm

基盤	幼生 行動・状態	各試験・24時間後における 幼生の状態%		
		劣化促進処理日数		
		劣化無し	2週間	1ヶ月間
試験 塗装 面	一次付着・定位	4.7	3.7	1.9
	定着・走根伸長	42.2	14.8	28.3
容器 底面	一次付着・定位	4.7	0	1.9
	定着・走根伸長	6.3	9.3	24.5
合計	一次付着・定位	9.4	3.7	3.8
	定着・走根伸長	48.4	24.1	52.8
特記	剥離したポリプ	0	5.6	1.9
	全個体 触手伸長	全個体 触手伸長	全個体 触手伸長	全個体 触手伸長

図10 試験塗料B(防汚成分非含有)区における結果

(A)劣化無し区24時間後、塗料面に多数の幼体が定着

(B)Aの点線囲み部の拡大。触手を十分に伸長した幼体
スケールバー=1cm(A) 及び2mm(B)

3.3 考察

近年、国内外の様々な海洋産業で、クダウミヒドラ類付着による被害の報告が増加しており^{22,23)}、環境調和型の付着抑制技術が模索されている²⁴⁾。一方、クダウミヒドラ類幼生付着に対する各種塗料・薬剤の効果を迅速に評価しうる試験法は未確立なのが現状であった。そこで、まず本研究では、特にシリコン系防汚塗料の効果を簡易に定量評価しうる室内試験法を開発することを目的として、予備試験を行った。

今回検討した試験法(六角柱型攪拌付着試験法)は、非常に簡素な系であるものの、対照区において安定した幼生付着変態率が得られるとともに、試験塗料の防汚性能や細胞毒性成分の含有状況まで高感度に検出できる可能性があり、さらに、同一原理で、他種幼生等への応用や流水試験系への展開も可能だと考えられる。

今後、室内試験と野外試験とを実施し比較する等、この簡易室内試験法の開発・検討をさらに進めたいと考えている。いずれにしても、今後、付着生物幼生の生物試験や生理学的な解析を進める上では、まず、試験に用いる生物の種同定に慎重を期すこと、及びその遺伝的な背景や野外の動向をある程度把握しておくことが、ますます重要になってくるように思われる。

謝辞

本研究は、以下の調査研究機関及び研究者との共同研究及び委託研究として行われたものです。貴重な調査研究の機会及びご協力・ご指導をいただき、さらにデータの公表をご了承いただいた関係各位に、心より感謝申し上げます(順不同)。

- ・日東製網㈱
 - ・関西電力㈱技術研究所：奥畑博史氏
 - ・中国電力㈱エネルギー総合研究所：柳川敏治氏・角田祐介氏
 - ・北海道大学厚岸臨海実験所・愛冠自然史博物館：仲岡雅裕教授・濱野章一氏・桂川英徳氏・須藤健二氏
- また、試料採取及び解析にご協力・ご支援いただいた齋藤伸介氏・林義雄氏(㈱セシルリサーチ)、及び文献調査にご尽力いただいた高橋一暢氏(ハルビン工程大学)に、深く感謝申し上げます。

参考文献

- 1) 山下, ヒドラ-怪物?植物?動物!, 岩波書店 (2011).
- 2) 火力原子力発電技術協会編, 発電所海水設備の汚損対策ハンドブック, (2014) 62-67, 恒星社厚生閣.
- 3) Kawaii, et. al., J. Exp. Zool., 278 (1997), 299-307.
- 4) Kawaii, et. al., Biol. Bull., 196 (1999), 45-51.

- 5) Yamashita, et.al., Biol.Bull., 204 (2003), 259-269.
- 6) 山下, 伏谷, Sess. Org., 19-2 (2002), 111-120.
- 7) Bloecher, et. al., Biofouling, 29-3 (2013), 237-246.
- 8) Nawrocki, et.al., Curr. Biol., 22-9 (2012), 825-829.
- 9) Chang, et. al., Evolution Letters, 2-4 (2018), 442-455.
- 10) Hirohito, Family Tubulariidae, *In*: The Hydroids of Sagami Bay, (1988), 14-23, Maruzen.
- 11) Petersen, Zool. J. Linn. Soc., 101 (1990), 101-231.
- 12) Imazu, et. al., Zootaxa, 3753-5 (2013), 421-439.
- 13) Folmer et.al., Mol. mar. biol. biotechnolog. 3-5 (1994), 294-299.
- 14) Uchida, Annot. Zool. Japon., 16-2 (1937) 157-158.
- 15) Yamada, Publ. Akkeshi mar. biol. Stat., 9 (1959), 2-101.
- 16) Nagao, Publ. Akkeshi mar. biol. Stat., 15 (1965), 9-35.
- 17) Kon, et. al., Mar. Biol., 149 (2006), 875-883.
- 18) 山口, フジツボ類の最新学, (2006), 1-40, 恒星社厚生閣.
- 19) Han, et.al., PLoS ONE, 7-5, (2012), 1-12.
- 20) 山口 他 2 名, フジツボ類, 日本付着生物学会編 新・付着生物研究法, (2017), 142-172, 恒星社厚生閣.
- 21) 加戸, 日マリ学誌, 52-1 (2017), 3-8.
- 22) Fitridge, et.al., Biofouling, 28-7, (2012), 649-669.
- 23) Calder, et. al., Aquatic Invasions, 14-1 (2019), 21-58.
- 24) 山下 他 4 名, 日マリ学誌, 52-1 (2017), 25-32.

著者紹介

山下 桂司

- ・日本付着生物学会会員・運営委員
- ・㈱セシルリサーチ 研究開発部門
- ・鹿児島大学大学院理学研究科修了
- ・博士(農学)(東京大学)
- ・付着生物の幼生生物学

神谷 享子

- ・日本付着生物学会会員・運営委員
- ・㈱セシルリサーチ 研究開発部門
- ・鹿児島大学大学院理学研究科修了
- ・博士(理学)(兵庫県立大学)
- ・フジツボ類の光生物学, 生物試験

鈴木 紘一

- ・㈱セシルリサーチ 研究開発部門(元)
- ・岡山大学大学院薬学研究科修了
- ・分子生物学