アカフジツボ幼生飼育条件に関する検討

吉村えり奈¹⁾・野方靖行^{2)*}・坂口 勇²⁾

¹⁾ (株)セレス、〒101-0052 東京都千代田区神田小川町1-6-1

²⁾ (財)電力中央研究所 環境科学研究所、〒270-1194 千葉県我孫子市我孫子1646

Experiments on rearing the barnacle *Megabalanus rosa* to the cyprid stage in the laboratory

E. Yoshimura¹⁾, Y. Nogata^{2)*} and I. Sakaguchi²⁾

¹⁾ SERES Inc., 1-6-1, Ogawa-cho, Kanda, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0052, Japan

²⁾ Environmental Science Research Laboratory, Central Research Institute of Electric Power Industry, 1646 Abiko, Abiko, Chiba 270-1194, Japan

* corresponding author : Y.N., email : noga@criepi.denken.or.jp

(Received March 29, 2006 ; Accepted May 12, 2006)

Abstract

In order to develop a culture method for larvae of the major fouling barnacle *Megabalanus rosa*, we examined the effects of food concentration and larval density on the naupliar larval development and metamorphosis into the cyprid. When nauplius larvae were cultured with the diatoms *Chaetoceros gracilis* and/or *Skeletonema costatum* at different concentrations, metamorphosis rates to the cyprid increased with the diatom concentration up to 60×10^4 cells/ml. Naupliar survival rates and metamorphosis rates to the cyprid decreased with increasing larval density when nauplii were cultured at 20°C with 60×10^4 cells/ml of the diatom mixture. From these results, it appears that larval density should be kept below 2 larvae/ml, and food concentration above 60×10^4 cells/ml, during mass culture of *M. rosa* larvae.

Key words: barnacle, *Megabalanus rosa*, larva, food concentration, cypris

フジツボ類は付着汚損生物の代表的な種類であり、船舶、魚網、ブイ、発電所冷却水路系など様々な海洋構造物に付着、成長することで問題を引き起こすため、その対策が強く望まれている(坂口 2003)。また、そのユニークな生態や特殊なセメントタンパク質 (Okano *et al.*, 1996) を有することからその付着機構に関する研究も盛んに行われつつある。フジツボ類の付着機構や対策研究を効率的に行うためには、付着期の幼生であるキブリス幼生を大量に供給する必要があるが、採集によって海域から年間を通してコンスタントにキブリス幼生を得ることができないため、フジツボ類の幼生飼育方法について

はこれまでも数多く紹介されている (Moyse, 1963; Hirano, 1963; 加戸・平野, 1979; Rittschof *et al.*, 1984, 1992; Kon-ya and Miki, 1994; 北村, 1999; Mishra *et al.*, 2001など)。それらの多くは、世界中に分布し、潮間帯に生息するタテジマフジツボ (*Amphibalanus amphitrite*) であり、成体飼育、孵出方法、幼生飼育などが確立していることから、本種が実験材料として世界中で広く用いられている。

しかし、わが国においては実際に漁業、船舶、発電所において問題となるフジツボの代表的な種類は大型種のアカフジツボ (*Megabalanus rosa*) である。また、アカ

フジツボのキプリス幼生はタテジマフジツボなどのキプリス幼生と比較して大きいため、セメント腺から分泌されるセメント物質に関する研究 (Okano *et al.*, 1996) などにも用いやすいという利点がある。よってアカフジツボ幼生の飼育方法を確立することができれば、今後の防汚対策や付着メカニズム解明に関する研究に大きく寄与することができると思われる。これまでにアカフジツボ幼生の飼育についてはKado and Hirano (1994) が個体別飼育方法を、Okano *et al.* (1996) や松村ら (2002) が大量供給方法を報告しているが、飼育密度や飼育の際の餌密度についての詳細な検討はなされていない。そこで、本報告ではアカフジツボ幼生の飼育の際の飼育密度、餌密度および餌の種類に関して、我々が行った実験の結果を紹介する。

材料と方法

成体アカフジツボと幼生の採集

成体アカフジツボは越喜来湾 (岩手県) および伊方 (愛媛県) で採集し実験室の水槽に収容した。成体アカフジツボは12Lの天然海水 (塩分約35‰) を用いて、各水槽当たり20~30個体となるように収容し、 $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ の恒温槽で6回/週の頻度で朝にアルテミアを飽食量与え、夕方に新しい海水との換水を行い飼育した。朝の段階で幼生が孵化した際に、光を当てることで集まってきたノープリウス幼生を回収し、ろ過海水で洗浄して実験に用いた。

ノープリウス幼生飼育実験条件

1. 餌の種類と餌密度の検討

ノープリウス幼生の餌量として、2種類の珪藻、*Chaetoceros gracilis* と *Skeletonema costatum* を培養し、餌密度とアカフジツボのノープリウス幼生の密度を変えて実験した。

幼生は、500ml容のビーカーを用い、 $0.2\mu\text{m}$ のフィルターでろ過した天然海水 (塩分約35‰) 500ml中に収容した。アカフジツボのノープリウス幼生の密度は、1個体/mlと2個体/mlの2段階とした。その際に、血球計算盤で計数して求めた珪藻の細胞数にしたがって、下記の設定密度となるように調整した。

設定1の実験では、 10×10^4 cells/ml、 20×10^4 cells/ml、 30×10^4 cells/mlの3段階で実験を行い、餌の種類としては、*C. gracilis* 単独および *C. gracilis* と *S. costatum* を同じ細胞数になるように混合したものの2通りを設定した。設定2の実験では 30×10^4 cells/ml、 60×10^4 cells/ml、 90×10^4 cells/mlの3段階で、餌としては、*C. gracilis* 単独、*S. costatum* 単独、*C. gracilis* と *S. costatum* を同じ細胞数となるように混合したものの3種類を用いて実験した。実験はそれぞれ3回繰り返して行った。

すべての実験は 20°C に設定したインキュベーター内で行い、24時間連続照明で各ビーカーの照度が1500~2500 lx程度となるようにし、エアレーションはガラス管を用いて170~200 ml/minの量で連続通気を行った。毎日1

回新しい餌の入った飼育ビーカーと交換して8日間飼育し、キプリス幼生が出現し始めた飼育8日目からは換水せずに2日間培養した。早い時期に変態したキプリス幼生がビーカーに付着してしまう前の飼育10日目に目合い $220\mu\text{m}$ のプランクトンネットを用いて幼生を回収し、50ml容プラスチック製試験管50mlに濃縮した。設定1の実験では、回収した幼生をすべて実体顕微鏡下で観察・計数した。設定2の実験では、50mlに濃縮した海水を十分に攪拌しその中の5mlをピペットを用いてシャーレに移し、実体顕微鏡下でノープリウスとキプリスの個体数を計数した。この操作を3回繰り返して、キプリスに変態した割合の平均値からキプリス幼生への変態率を算出した。

2. 飼育密度の検討

アカフジツボのノープリウス幼生の密度は、1個体、2個体、3個体、4個体および5個体/mlの5段階とした。幼生は、500ml容のビーカーに $0.2\mu\text{m}$ のフィルターでろ過した天然海水 (約35‰) 500ml中に収容し、各2連 (Exp1, Exp2) で実験を行った。餌密度は 60×10^4 cells/mlとして *C. gracilis* と *S. costatum* の1:1に混合したもの (それぞれ 30×10^4 cells/ml) を与えて飼育を行った。他の条件は前述の実験と同様とした。

飼育10日後に目合い $220\mu\text{m}$ のプランクトンネットを用いて回収し、50ml容プラスチック製試験管50mlに濃縮し、回収した幼生をすべて実体顕微鏡下で観察・計数した。計数時にキプリス幼生、6令後期幼生、その他と区別してカウントし、飼育開始時の設定幼生数に対する生残率および生残個体数に対するキプリス幼生への変態率を算出した。

結果

1. 餌の種類と餌密度

設定1で飼育した場合のキプリス幼生への変態率をFig. 1. とFig. 2に示す。*C. gracilis* 単独、*C. gracilis* と *S. costatum* 混合のどちらの餌条件においても、餌密度の上昇に伴いキプリス幼生への生残率、変態率共に高くなる傾向が見られた。生残率が最も低かったのは飼育密度2個体/ml、*C. gracilis* 単独の餌密度 10×10^4 cells

Fig. 1 Metamorphosis rate into cyprids of *Megabalanus rosa* nauplius larvae cultured at different concentrations of nauplii and the *Chaetoceros gracilis*. Error bars indicate SD.

Fig. 2 Metamorphosis rate into cyprids of *Megabalanus rosa* nauplius larvae cultured at different concentrations of nauplii and the *Chaetoceros gracilis* and *Skeletonema costatum* mixture. Error bars indicate SD.

/mlの条件で、3回の平均は20.3%であった。生残率が高かったのは飼育密度1個体/ml、*C. gracilis*と*S. costatum*混合の餌密度 30×10^4 cells/mlの条件であり、3回の平均は49.4%であった。飼育密度が低い方が同じ餌条件下では生残率が高くなり、同じ餌密度においては*C. gracilis*単独よりも*C. gracilis*と*S. costatum*混合のほうで生残率が高くなった。生残個体中のキプリス幼生への変態は飼育密度2個体/ml、餌密度 10×10^4 cells/mlの条件では、ほとんど観察されなかった。また、飼育密度による差は、 30×10^4 cells/mlではそれほど顕著ではないものの、1個体/mlの飼育密度のほうがキプリスへの変態率が高くなった。餌種類による差は、 10×10^4 cells/ml以外の餌密度では、*C. gracilis*単独による飼育の方が生残個体中の変態率としては高くなったが、生残率が低いために得られたキプリスの総数としては*C. gracilis*と*S. costatum*混合のほうが多くなった。

設定2で飼育した結果をFig. 3～5に示した。何れの餌条件においても、 60×10^4 cells/ml以上の餌密度でキプリス幼生への変態率が80%程度と高く推移し、飼育密度による差もほとんど見られなかった。*S. costatum*単独飼育の場合には、 30×10^4 cells/mlの2個体/ml飼育では他の条件と比べてキプリスへの変態率が低下した。

Fig. 3 Metamorphosis rate into cyprids of *Megabalanus rosa* nauplius larvae cultured at different concentrations of nauplii and the *Chaetoceros gracilis*. Error bars indicate SD.

Fig. 4 Metamorphosis rate into cyprids of *Megabalanus rosa* nauplius larvae cultured at different concentrations of nauplii and the *Chaetoceros gracilis* and *Skeletonema costatum* mixture. Error bars indicate SD.

Fig. 5 Metamorphosis rate into cyprids of *Megabalanus rosa* nauplius larvae cultured at different concentrations of nauplii and the *Skeletonema costatum*. Error bars indicate SD.

2. 飼育密度

Fig. 6に実験終了時に計数した幼生数から算出した生残率を、Table 1に生残個体中のキプリス幼生への変態率を示した。Fig. 6とTable. 1に示したように、1個体/mlや2個体/mlで飼育した場合には、キプリス幼生への変態率が90%前後と非常に高率であったのに対して、飼育密度が高くなるにつれて、生残率とキプリス幼生への変態率の低下が認められた。また、1個体/mlや2個

Fig. 6 Survival rate after 10 days of *Megabalanus rosa* nauplius and cypris larvae cultured at different larval densities with 60×10^4 cells/ml of food (*Chaetoceros gracilis* and *Skeletonema costatum* mixture).

Table 1. Metamorphosis rate into cyprids and the number of larvae in the nauplius stages after 10 days of *Megabalanus rosa* cultured at different larval densities with 60×10^4 cells/ml of food (*Chaetoceros gracilis* and *Skeletonema costatum* mixture).

Larval density		Rate of metamorphosis to cyprids (%)	Number of larvae			
			Total	Cyprids	Late nauplius VI	Other naupliar stages
1 larva/ml	Exp1	94	347	325	13	9
	Exp2	93	398	369	22	7
2 larvae/ml	Exp1	90	614	552	34	28
	Exp2	87	556	484	45	27
3 larvae/ml	Exp1	78	774	605	95	74
	Exp2	77	756	581	109	66
4 larvae/ml	Exp1	61	1029	624	248	157
	Exp2	52	876	459	232	185
5 larvae/ml	Exp1	30	1021	307	427	287
	Exp2	24	1288	308	546	434

体/mlで飼育した場合には、キブリス幼生は飼育8日目あたりで多く出現したが、飼育密度が高くなるにつれて、幼生のステージのばらつきが大きくなることが認められた。

考 察

フジツボのキブリス幼生を実験に用いる際には、なるだけ多くの個体が同調して得られるほうが望ましいと考えられる。今回の実験の結果、アカフジツボのキブリス幼生を安定して大量に供給するためには、20℃の飼育条件下であれば、餌密度は 60×10^4 cells/ml以上、飼育個体密度は2個体/ml以下が望ましいことが示唆された。キブリス幼生への変態率やキブリス幼生になるタイミングについては餌の密度に依存していると考えられるため、今回設定した餌密度以上で供給すれば、これよりも高密度での飼育も可能となることも考えられる。しかし、タテジマフジツボの場合でも、キブリス幼生への移行が順調となる飼育密度はそれほど高くはなく、2個体/ml以下（北村、1999）である。よって、その後の付着実験などに同質のキブリス幼生を供給する点から考えた場合には、飼育密度は松村ら（2002）と同じように1個体/ml以下程度がよいと思われる。餌の珪藻に関しては、餌密度を高く設定することでアカフジツボの幼生もタテジマフジツボなどと同じように *C. gracilis* や *S. costatum* を用いた大量飼育が可能であった。サンカクフジツボ *Balanus trigonus* の幼生飼育（Mishra *et. al.*, 2001）においては、 50×10^4 cells/mlがキブリス幼生への変態率、生残率の面から最適であることから、飼育するフジツボの種類によって最適な餌密度は異なると考えられる。今回の実験の結果からアカフジツボについては、珪藻を 60×10^4 cells/ml程度の餌密度で与えることで変態

時期を同調させたキブリス幼生を大量に獲得することができると考えられる。このことは、加戸・瀬川（1996）がアカフジツボ幼生を用いて 40×10^4 cells/mlと 10×10^4 cells/mlの餌密度で *C. calcitrans* を与えて比較実験を行っているが、餌密度が高いほうがキブリス幼生までの所要日数が短く、同調性も高くなるという結果とも一致している。

今回の実験で得られたキブリス幼生を用いて、ポリステレンシャーレを用いた付着実験を行ったが、同じ実験条件での繰り返し間のばらつきが非常に大きくなった。アカフジツボの場合、20℃の条件下ではノープリウス幼生から変態したキブリス幼生は付着能を有するまでに数日必要であると考えられ、変態直後～1日令のキブリス幼生はほとんど探索行動などを行わない。付着実験の大きなばらつきがそれらの成熟条件によるものなのか、他の因子によるものなのかは今回の実験で明らかにすることはできなかった。付着機構の解明や付着実験のためには、付着率も安定していることが望ましいため、今後は安定した付着率を示すようなキブリス幼生回収方法、加齢方法あるいはアッセイ方法の検討を行っていく必要がある。

謝 辞

本実験を行うにあたり、多大な協力と助言をいただいた北里大学水産学部助教授加戸隆介博士に深く感謝の意を表します。

引用文献

- Hirano, R. (1963). Mass rearing of barnacle larvae. *Bull. Mar. Biol. Sta. Asamushi, Tohoku Univ.*, 11, 77-80.

加戸隆介、瀬川真一郎（1996）. アカフジツボ幼生の飼育およ

- び付着について, 第3回付着生物研究会・研究集会発表要旨
- 加戸隆介、平野礼次郎 (1979). 付着生物浮遊期幼生の飼育法. 付着生物研究, 1 (1), 11-19.
- Kado, R. and R. Hirano (1994). Larval development of two Japanese megabalanine barnacles, *Megabalanus volcano* (Pilsbry) and *Megabalanus rosa* (Pilsbry) (Cirripedia, Balanidae), reared in the laboratory. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 175, 17-41.
- 北村 等 (1999). タテジマフジツボ幼生の飼育法およびキブリス幼生を用いた循環流水式の付着試験法. *Sessile Organisms*, 15 (2), 15-21.
- Kon-ya, K. and W. Miki (1994). All-seasonal assay for antifouling substances using reared barnacle larvae. *J. Mar. Biotechnol.*, 1, 193-195.
- 松村清隆、山下桂司、神谷享子、岡田佳子、柳川敏治、岡洋祐、川端豊喜 (2002). タテジマフジツボおよびアカフジツボキブリス幼生の着生における着生誘起タンパク質と付着基盤性状の重要性. *Sessile Organisms*, 19 (2), 93-99.
- Mishra, J. K., H. Kitamura and K. Tomoda (2001). Laboratory culture of *Balanus trigonus* larvae by the method of *B. amphitrite* for establishing a multi-species settlement assay. *Sessile Organisms*, 18 (1), 1-6.
- Moyse, J. (1963). A comparison of the value of various flagellates and diatoms as food for barnacle larvae. *J. Cons. Perm. Int. Explor. Mer*, 28, 175-187.
- Okano, K., K. Shimizu, C. G. Satuito and N. Fusetani (1996). Visualization of cement exocytosis in the cypris cement gland of the barnacle *Megabalanus rosa*. *J. Exp. Biol.*, 199, 2131-2137.
- Rittschof, D., E. S. Branscomb and J. D. Costlow (1984). Settlement and behavior in relation to flow and surface in larval barnacle, *Balanus amphitrite* Darwin. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 82, 131-146.
- Rittschof, D., A. S. Clare, D. J. Gerhart, A. V. Sister and J. Bonaventura (1992). Barnacle in vitro assays for biologically active substances: toxicity and settlement inhibition assays using mass cultured *Balanus amphitrite amphitrite* Darwin. *Biofouling*, 6, 115-122.
- 坂口 勇 (2003). 発電所の汚損生物対策技術の展望. *Sessile Organisms*, 20 (1), 15-19.