フジツボ幼生の簡便な飼育方法について

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

Simple methods for mass culture of barnacle larvae.

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 this paper we describe simple culture methods for barnacle larvae that do not involve changing the culture seawater during rearing to the cyprid stage. Larvae of the barnacles *Amphibalanus amphitrite* and *Fistulobalanus albicostatus* were reared under three different conditions: 1, the culture seawater was changed every day; 2, the culture seawater was not changed, but modified Provasoli Erd-Schreiber medium for diatoms was added to it; and 3, the culture seawater was not changed but the diatom medium and antibiotics (penicillin G and streptomycin) were added to it. Larvae of both barnacle species cultured without changing the seawater grew sufficiently well and metamorphosed into cyprids. Using the same method, cyprids of *Megabalanus rosa* were reliably produced. Therefore, a maintenance-free culture method that adds diatom medium and antibiotics into the rearing water can be effective in producing large amounts of cyprids.

Key words: barnacle, larva, mass-culture, cypris

フジツボ幼生を用いた付着メカニズム解明や付着阻害物質の探索などの研究のためには、フジツボ類の幼生を実験室内で大量に飼育・供給する必要がある、これまでもフジツボ類の幼生の飼育について様々な報告(Moyse, 1963; Hirano, 1963; 加戸・平野, 1979; Rittschof *et al.*, 1984, 1992; Kon-ya and Miki, 1994; Okano *et al.*, 1996; 北村, 1999; Mishra *et al.*, 2001; 松村ら, 2002; 平野, 2003など)がなされている。しかし、大量飼育に関しては多くの場合、飼育期間中隔日あるいは毎日の換水を行う場合が多く、換水を行わない場合でもHirano (1963) や松村ら (2002) などのよう

に、餌となる珪藻を適時追加供給することで幼生を飼育している。幼生飼育にかかる労力は少なければ少ないほど、様々な幼生を用いた実験を行うことに時間を割けるため、簡便な方法が望まれる。本報告では、我々が行っている簡便な幼生飼育方法を紹介すると共に、その方法と従来の方法とを用いて飼育した3種のフジツボ(タテジマフジツボ *Amphibalanus amphitrite*、シロスジフジツボ *Fistulobalanus albicostatus*、アカフジツボ *Megabalanus rosa*) のキプリス幼生への変態率などについて紹介する。

材料と方法

成体フジツボと幼生の回収

成体タテジマフジツボとシロスジフジツボは浜名湖（静岡県）の牡蠣養殖に用いていた竹に付着していたものを竹ごと採集し実験室の水槽に収容した。実験室に持ち帰ったフジツボはそれぞれ、他の付着生物を取り除き12Lの濾過海水（塩分約35‰, 1 μ mフィルター濾過）中に収容し、20℃ $\pm$ 2℃の恒温室で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。半日間の干出を行った後に海水中に投入して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、濾過海水で十分に洗浄して実験に用いた。

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12 Lの濾過海水（塩分約35‰, 1 μ mフィルター濾過）を用いて、各水槽20~30個体となるように収容し、20℃ $\pm$ 2℃の恒温室で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ていた際に、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、濾過海水で十分に洗浄して実験に用いた。

珪藻培地

実験に用いた珪藻 *Chaetoceros gracilis* はTable 1に示すような組成のmodified Provasoli Erd-Schreiber medium（以下PES培地）（Ito *et al.*, 1985、サトイト, 1994）を用いて培養した。作成した培地は、無換水での幼生の飼育の際に、濾過海水1000ml（0.2 μ mフィルター濾過）に対してA solutionを1ml、C solutionを2mlの割合で添加した。また、換水飼育の際に用いた珪藻もPES培地を同様の比率でオートクレーブ滅菌海水に添加して培養し、対数増殖期のものを使用した。

Table 1. Composition of modified Provasoli Erd-Schreiber medium.

A solution		B solution	
Distilled water	100 ml	Distilled water	100 ml
NaNO ₃	10.0 g	MnCl ₂	4.0 g
Na ₂ glycerophosphate·5H ₂ O	1.7 g	CaCl ₂	0.4 g
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ ·6H ₂ O	0.7 g	ZnCl ₂	1.0 g
Na ₂ EDTA	0.3 g	FeCl ₂	1.0 g
H ₃ BO ₃	0.2 g		
Thiamine HCl	10 mg	C solution	
Vitamin B ₁₂	0.1 mg	Distilled water	100 ml
B solution	1.0 ml	Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	4.5 g

Add 1 ml of A solution and 2 ml of C solution to 1000 ml of sterilized seawater.

幼生の飼育

1. タテジマフジツボ

ノープリウス幼生の飼育は2L容ビーカーを用いて行い、飼育条件は毎日換水、換水なし、換水なしで抗生物質添加の3つの条件で行った。それぞれ、0.2 μ mのフィルターでろ過した後に蒸留水で希釈した濾過海水（塩分約27‰）2Lを入れ、そこに幼生を3個体/mlで収容した。ビーカーは25℃のインキュベーターに収容し、24時間連

続照明で各ビーカーの照度が1500lx程度となるようにして培養した。毎日換水の飼育区は餌として珪藻 *C. gracilis* を20 $\times$ 10⁴ cells/mlの密度で与え、毎日1回幼生をプランクトンネットで回収・洗浄した後に、新たに設定濃度の珪藻の入った飼育ビーカーに交換して5日間飼育した。換水なしの2つの飼育区は、幼生密度を3個体/ml、餌の密度を40 $\times$ 10⁴ cells/mlとして、PES培地を加えた。抗生物質添加区には、PES培地と共にストレプトマイシン硫酸塩（和光純薬製）を30 μ g/ml、ペニシリンG（ICN Biochemical製）を20 μ g/mlとなるようそれぞれ添加した。なお、すべての飼育区において、幼生が走光性により水面近くに集まらないようにビーカーの水面付近には黒いビニールテープを張り、上方から光が入らないようにラップで包んだアルミホイルをかけた。エアチューブの先端にガラス管を差し込み0.2 μ mのエアフィルターを通過させた空気エアレーションした。

飼育6日目に、ビーカーから10ml採水して、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10回繰り返し、飼育開始時の設定した幼生数と6日目にカウントされた平均値から算出された幼生数の比から生残率を算出した。また、キプリス幼生への変態率は生残個体から算出することとし、カウントの際のノープリウス幼生数とキプリス幼生の割合からキプリス幼生への変態率を算出した。実験は2回繰り返して行った（Exp1, Exp2）

2. シロスジフジツボ

ノープリウス幼生の飼育は25℃のインキュベーター内で2L容ビーカーを用いて行い、飼育条件は毎日換水、換水なし、換水なしで抗生物質添加の3つの条件で行った。それぞれ、濾過海水（塩分約35‰, 0.2 μ mフィルター濾過）2Lを入れ、そこに幼生を2個体/mlで収容した。毎日換水の飼育区は餌として珪藻 *C. gracilis* を20 $\times$ 10⁴ cells/mlの密度で与え、毎日1回、プランクトンネットで回収・洗浄した後に、新たに設定濃度の珪藻の入った飼育ビーカーに交換して5日間飼育した。換水なしの2つの飼育区については、幼生密度2個体/mlとして、珪藻密度、PES培地、抗生物質の条件はタテジマフジツボ飼育の場合と同様とした。キプリス幼生の計数方法などはタテジマフジツボ飼育の場合と同様としたが、試験の繰り返しは行わなかった。

3. アカフジツボ

ノープリウス幼生の飼育は2L容ビーカーを用いて行い、濾過海水（塩分約35‰, 0.2 μ mフィルター濾過）2Lを入れ、そこに幼生を0.5個体/mlで収容し、餌として *C. gracilis* を60 $\times$ 10⁴ cells/mlの密度で与え、PES培地を加えた。飼育区は抗生物質添加区のみとし、ストレプトマイシン硫酸塩を30 μ g/mlとペニシリンGを20 μ g/mlとなるように調整した。ビーカーは20℃恒温室に収容し、明暗条件はそれぞれ12時間として培養し、明条件の際には2000lx程度になるようにした。エアチューブの先端にガラス管を差し込み、0.2 μ mのエアフィルターを通過さ

せた空気エアレーションを行った。この条件で飼育を5回繰り返して、10日後におけるフジツボの幼生の生残率とキプリス幼生への変態率を算出した。算出方法はタテジマフジツボと同様である。

10L飼育：10Lの濾過海水（塩分約35‰、0.2 μ mフィルター濾過）を用いてノープリウス幼生の密度が1個体/mlとなるように10L容の透明ポリカーボネート製容器（ナルゲン製）に収容した。餌は *C. gracilis* と *Skeletonema costatum* の密度がそれぞれ 30×10^4 cells/mlとなるように与え、PES培地を加えた。飼育区は、抗生物質を添加する飼育区としない飼育区の2つを設定し、抗生物質添加区にはストレプトマイシン硫酸塩を30 μ g/mlとペニシリンGを20 μ g/mlとなるように調整した。他の飼育条件は2L飼育の際と同様である。飼育10日後にタテジマフジツボと同様の方法で幼生の生残率とキプリス幼生への変態率を算出した。

結果と考察

タテジマフジツボの飼育結果をFig. 1、シロスジフジツボの飼育結果をFig. 2、アカフジツボの飼育結果をFig. 3（2L飼育）とFig. 4（10L飼育）に示した。タテジマフジツボではExp1とExp2で多少結果が異なったが、珪藻培地のみあるいは珪藻培地+抗生物質添加の飼育区でも従来の換水飼育よりやや劣るものの、十分な量のキプリス幼生が確保可能であることが明らかとなった。また、シロスジフジツボの場合においては、1回のみの試験結果ではあるが、換水<珪藻培地<珪藻培地+抗生物質添加の順で、生残率とキプリス幼生への変態率がともに上昇した。アカフジツボを用いた場合には、換水との

Fig. 1 Larval survival rates and metamorphosis rates into cyprids of *Amphibalanus amphitrite* cultured under different conditions.

changed: the culture water was changed everyday with food concentrations of 20×10^4 cells/ml.

+ Medium - antibiotic: the culture water was not changed, but 40×10^4 cells/ml of food and PES medium were added to the seawater at the start of culture.

+ Medium + antibiotic: the culture water was not changed, but 40×10^4 cells/ml of food, antibiotics, and PES medium were added to the seawater at the start of culture.

Fig. 2 Larval survival rates and metamorphosis rates into cyprids of *Fistulobalanus albicostatus* cultured under different conditions (no replication).

changed: the culture water was changed everyday with food concentrations of 20×10^4 cells/ml.

+ Medium - antibiotic: the culture water was not changed, but 40×10^4 cells/ml of food and PES medium were added to the seawater at the start of culture.

+ Medium + antibiotic: the culture water was not changed, but 40×10^4 cells/ml of food, antibiotics, and PES medium were added to the seawater at the start of culture.

Fig. 3 Larval survival rates and metamorphosis rates into cyprids of *Megabalanus rosa* cultured in 2 L beakers (n=5) without changing the culture water, but with 60×10^4 cells/ml of food, PES medium, and antibiotics added to the seawater at the start of culture.

比較は行っていないが、5回の繰り返しにおいて、安定して生残率5割以上、生残個体中キプリス幼生が6割以上を確保することができた。また、10Lの大量飼育においても、珪藻培地+抗生物質飼育区においてキプリス幼生を6000個体以上得ることができた。これらの結果より、幼生の無換水飼育はフジツボ幼生のキプリス幼生を大量に供給する際に十分に有効な方法であることが示唆された。また、継続的なデータの取得は行っていないが、本方法を用いてアカフジツボの幼生の飼育が3年近く安定して行っており、換水の際にノープリウス幼生の肢や棘を壊すことがないせいか換水なしで飼育したほうが大量に飼育できる傾向にある。しかし、アカフジツボの場合、キプリス幼生のフジツボへの付着・変態率がかなり不安

Fig. 4 Larval survival rates and metamorphosis rates into cyprids of *Megabalanus rosa* cultured in 10 L tanks (no replication) with or without antibiotics. A food concentration of 60×10^4 cells/ml and PES medium were added to the seawater at the start of culture.

定であり、キプリスへの高い変態率が必ずしもフジツボへの高い付着・変態率に繋がる訳ではない。この問題をクリアしないことには、付着実験などを効率よく行えるとならないため、飼育している成体の状態による違いなのか、幼生飼育中、キプリス幼生回収後の微妙な環境の違いに起因するものなのかなど、更なる検討を行う必要がある。

また、本方法を用いることにより、オニフジツボ、ケハダカイメンフジツボ、サラサフジツボなどについても飼育が可能であることがわかっている。さらにミネフジツボのような低水温で飼育する必要がある幼生においても、10℃、24時間照明下で、途中10日～15日に1回の換水を3回行うことでキプリス幼生を得ることができた。

本方法で飼育する際には、珪藻の質が最も重要であると思われ、対数増殖期のものを使わないと飼育成績が低下する傾向にある。また、照明が暗すぎる場合にも、珪藻の増殖速度が幼生の摂餌速度に負けてしまい、明るすぎても珪藻をたくさん必要とする飼育後半に珪藻の増殖が落ちてしまうなどしてうまく幼生が飼育できなくなる。珪藻の培地に関して、今回の実験に用いた培地の代わりとして市販の植物プランクトン培養用培地KW21（第一製鋼（株））を用いて検討も行ったが、KW21においても同様にキプリス幼生までの飼育が可能であった。しかし、原因については明らかではないが、PES培地と比較して幼生の生残率やキプリスへの変態率が不安定な傾向にあり、全くキプリスが得られない場合があった。

以上のように、適度な照明や珪藻の質の維持など、細かな調整がある程度必要となるが、飼育開始時の設定だけで、換水の手間がかからない点が本方法の一番の利点であると思われる。

謝 辞

タテジマフジツボ、シロスジフジツボの採集にご協力いただいた、舞阪町牡蠣養殖組合の大河原彪氏、アカフジツボの採集にご協力いただいた、北里大学水産学部助教授加戸隆介博士、珪藻の飼育方法をご教授いただいた長崎大学水産学部教授北村等博士に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.
- 平野禮次郎 (2003). 付着生物研究事始-フジツボ幼生の大量飼育, *Sessile Organisms*, 学会創立30周年記念号, 17-21.
- Ito, S., T. Ariyoshi and Y. Ito (1985). Mass production of *Chaetoceros gracilis*. In: *A Report, Saga Prefectural Sea Farming Center, Saga, Japan*, pp. 97-103 (in Japanese).
- 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.
- 北村 等 (1999). タテジマフジツボ幼生の飼育法およびキプ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プ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.
- サトイト, C., グレン (1994). 海産動物幼生の飼育法—餌料生物の観点から. *海鞘*, 12, 14-17.