

有殻翼足類 *Limacina helicina* の殻の成長速度

佐々木 洋¹・菅波 晋一¹・秋葉 文弘^{1,2}

Growth rate measurements of carbonate shells of pteropods (*Limacina helicina*)

Hiroshi SASAKI¹, Shin-ichi SUGANAMI¹ and Fumihiro AKIHA^{1,2}

¹Department of Biological Sciences, Faculty of Science and Engineering,
Ishinomaki Senshu University, Ishinomaki 986-8580

²TRK Company Ltd., 2-5-1, Honcho, Aoba-ku, Sendai, 980-0014, Japan

Abstract

Growth rates of carbonate shells of pteropods (*Limacina helicina*) collected in the coasts of Okhotsk Sea, Monbetsu, Hokkaido in June, 2010 were measured. The growth lines on the shell surface and microstructure of inner shells were scrutinized using light microscope and scanning electron microscope (SEM). The daily shell growth rates in terms of the increased number of axial ribbed growth line and the increased length between lines were 2.3 ± 0.2 lines day⁻¹, and $17.26 \pm 6.78 \mu\text{m m day}^{-1}$, respectively. It took about 0.4 ± 0.03 days to form one growth line. The SEM observations of inner shells showed that most individuals had two layers with crossed-lamellar and thin outer prismatic layers and some of them had intermediate layers with granular structures. The microstructure probably change with growth phases due to influences of environmental stresses. The present study suggests the availability of the growth line measurements to know the growth characteristics of shell-bearing pteropods.

1. 序論

有殻翼足類 *Limacina helicina* とは腹足綱有殻翼足目に属する浮遊性巻貝であるが、遊泳器官の翼足を用いて終生浮遊生活をする動物プランクトンである。主に北極海域と南極海域に分布し、亜寒帯海域にも高密度に出現することがある^(1, 2, 3)。現在、北半球と南半球に生息する *L. helicina* はそれぞれ亜種として北半球の *L. helicina helicina* および南半球の *L. helicina antarctica* に区別されている。さらに、それぞれ形態の異なるタイプがいくつか存在するためにそれらを別の品種 (forma) として記載されている⁽⁴⁾。近年、*L. helicina forma helicina* と *L. helicina forma antarctica* の個体を用いて、そのゲノム配列の差異を調べた研究により⁽⁴⁾、両者は種レベルで異なることが明らかにされている。また、*L. helicina* を含む有殻翼足類は、裸殻翼足類である

クリオネ *Clione limacina* にとって唯一の餌生物である⁽⁵⁾。生態系の中では大型動物プランクトンや魚類、海鳥などの肉食動物にとって重要な餌生物となることがある^(6, 7)。さらに無機炭素として殻の炭酸カルシウム、また有機炭素として軟体部や糞などが深層へ沈降することによって表層-深層間の物質輸送の中で無視できない役割を担っていると考えられる^(8, 9, 10)。

現在、大気中の CO₂ 増加によって引き起こされるとされる海洋酸性化が生態系にネガティブな影響を及ぼす可能性が指摘されている。海洋酸性化、つまり海水中の pH 低下は、特に石灰化生物に影響を及ぼす⁽¹¹⁾。水温が冷たいほど CO₂ が海水に溶けやすいため、極海域などの冷水域は酸性化が進みやすい。また、石灰化生物が形成する炭酸カルシウムにはアラゴナイト態とカルサイト態の二つがあるが、前者は酸性化環境下において

¹石巻専修大学理工学部生物科学科

²東北緑化環境保全株式会社

はより速く溶解が進行する⁽¹²⁾。そのため、冷水域に分布しアラゴナイト態の殻を形成する *L. helicina* は酸性化の影響を特に受けやすい。海洋酸性化の進行に伴って *L. helicina* の現存量が減少するならば、生態系にも影響が及ぶことが考えられるため、最近になって多くの研究者に注目されている^(13, 14, 15, 16)。

L. helicina に対する酸性化の影響を調べるためには、酸性化の程度に応じて変化する成長の指標が必要であるが、極海域に生息する *L. helicina* は採集が容易でなく、飼育も難しいため成長速度に関する知見が少ない現状にある。*L. helicina* を用いた殻成長の測定法としては、カルセイン等の蛍光色素を用いた標識法があるが^(13, 15)、この方法は数日間の飼育を必要とし、標識直後数日の成長しか分からない。そこで注目したのが殻表面に存在する成長線である。一般に殻には成長とともにその痕跡として成長線ができる。成長線とは、成長の休止期に生じる不連続面であり、それを解析することにより飼育をせずに日齢や年齢を推定することが理論的には可能である⁽¹⁷⁾。

北極と南極に生息する *L. helicina* の殻構造に関する Sato-Okoshi らの報告によれば⁽¹⁸⁾、北極産の *L. helicina* では殻径 1.5 mm 以上の個体は外側の螺層の表面には縦肋（じゅうろく）という構造が存在し、それを成長線として成長解析に用いることができると示唆した。一方、殻径 0.5~0.8 mm の成熟前の個体においては縦肋のようなリブ（肋骨状）構造が形成されないことが明らかにされている。しかし同時に、透過光下において成長線と思われる線状構造の存在が確認されている⁽¹⁸⁾。さらに、電子顕微鏡（SEM）観察において⁽¹⁸⁾、殻の表面にリブ構造ではないが、成長の痕跡として薄い線を確認した。成長線として殻表面に成長の痕跡が残るのであれば、それは成長解析に有用な指標となる可能性がある。

また、殻の成長と関連する指標として、殻の微細構造に注目した。貝殻は有機物と無機物の複合体であり、基本的な構造としては、一番外側（外表面）に有機質の殻皮層があり、その内側に炭酸カルシウムを主成分し、通常微細構造の異なる複数の層からなる殻質層（2層構造の場合は外層と

内層、3層構造の場合は外層、中層、内層）がある⁽¹⁹⁾。*L. helicina* の殻微細構造に関する知見は少ないが、Sato-Okoshi ら⁽¹⁸⁾は北極産と南極産の *L. helicina* の殻構造を調べた。北極産の *L. helicina helicina* と南極産の *L. helicina antarctica forma antarctica* の両方の小型個体において、外層は極めて薄い稜柱構造、内層は交差板構造からなる2層構造であり、南極の大型個体においては交差板層の下に厚い稜柱層がある3層構造であることを明らかにした。しかし、亜寒帯域に生息する *L. helicina* の殻微細構造に関する報告はない。殻の成長と密接に関係する殻の微細構造に関する情報の蓄積は、酸性化に関する今後の研究にとっても有用であると思われる。

本研究は、北海道のオホーツク海沿岸で採集された *L. helicina* の小型個体を用いて、殻表面内層の微細構造の特徴を明らかにするとともに、成長線が成長解析に有用な指標となるかどうかについて検討した。

2. 材料と方法

研究に用いた試料は2010年6月11日から19日の間に、北海道紋別市の海岸で採集した。プランクトンネット（目合い 330 μm ）により水深約 8.5 m から水面まで鉛直曳きにより採集し、有殻翼足類個体を選別後、冷凍保存した。

冷凍試料を解凍し、Sato-Okoshi らと同様の方法⁽¹⁸⁾で、はじめに倒立光学顕微鏡下において成長線の存在を確認した。さらにSEM観察のために、別の解凍試料を蒸留水で数回洗浄後、試料台に固定した。殻微細構造観察のためには、試料台に固定後、殻を割り、殻の断面を観察した。これらのSEM用試料はイオンコーターによってAuコーティングした後、SEM（JSM-6380LV, JEOL）を使用して観察した。

SEMにより1000倍に拡大して殻全体をいくつかの部分画像として撮影し、それらの複数画像を合成して一枚の画像を作成した。そしてそれを画像処理ソフト Adobe Photoshop によってコントラストを明瞭にするなどの処理後、成長線を観察、計数した。

2-3. 殻の成長速度の推定

殻の成長速度を推定するために、次の3つの項目、成長線数 (lines)、推定日齢 (days)、および成長線の間隔 ($\mu\text{m line}^{-1}$) を測定した。成長線数はSEMの拡大画像を用いた計数結果から求めた。成熟個体と思われる大型個体が2月末から3月に出現することが分かっているため(濱岡、私信)、これを根拠にして、産卵がその時期に行われれば、2010年6月中頃に採集した個体の日齢は約90日となることから、推定日齢を90日と仮定した。成長線と成長線の間隔を殻の外周から画像解析ソフトImage Jにより各個体50カ所測定した。それらの結果から成長線数を推定日齢で割ることで1日にできる成長線数 (lines day^{-1}) を求め、さらに成長線数 (lines day^{-1}) に成長線の間隔 ($\mu\text{m line}^{-1}$) を乗ずることで1日の成長速度 ($\mu\text{m day}^{-1}$) を求めた。

3. 結果

採集された *L. helicina* は、主に殻径 $450 \mu\text{m}$ 前後の未成熟個体であり、縦肋が存在する個体は観察されなかった。種類は *L. helicina helicina* であると思われる。

光学顕微鏡観察により、殻表面には多数の成長線が存在することが確認できた。しかし殻表面以外の部分に線状構造は確認できなかった。

8個体を用いたSEM観察によれば、成長線は殻表面のほぼ全体にわたって存在した(図1)。拡大した画像によると、成長線は浅いくぼみとして形成されている(図2)。同一の試料を使用して光学顕微鏡とSEMで成長線を観察したところ、光学顕微鏡で観察された成長線はSEMでも同じ位置に観察できた。また、成長線と交差し、殻の成長方向と平行に走る複数の線状構造も観察された(図2)。それらは殻径 $450 \mu\text{m}$ 前後の個体の体層(一番外側の螺層)にのみ観察されたが、成長線であるかどうか不明であるために計数から除いた。

殻径 $411\sim 469 \mu\text{m}$ の個体において成長線数は $187\sim 225$ 本観察され、殻径と成長線数の間には弱いながら正の相関 ($r=0.667$) が認められた(図3)。推定日齢を90日とすると、1日にできる成長線数は $2.1\sim 2.6 \text{ lines day}^{-1}$ となり、平均で

は $2.3\pm 0.2 \text{ lines day}^{-1}$ となった。成長線の間隔は、 $6.93\pm 2.36\sim 8.54\pm 2.91 \mu\text{m line}^{-1}$ であり、平均では $7.42\pm 2.86 \mu\text{m line}^{-1}$ となった。以上の結果から、成長速度は $13.35\pm 4.61\sim 19.17\pm 6.53 \mu\text{m day}^{-1}$ となり、平均では $17.26\pm 6.78 \mu\text{m day}^{-1}$ と推定された(表1)。

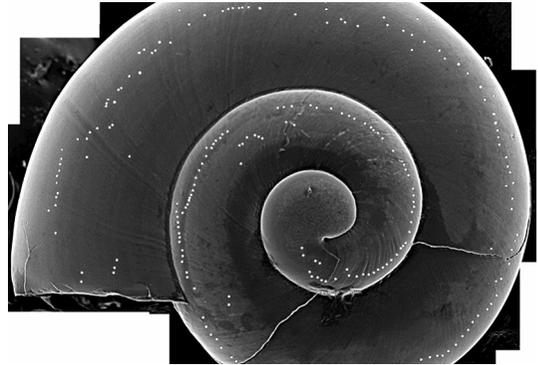


図1 *Limacina helicina* の殻表面にみられる成長線。白色の点は識別された成長線の位置を示している。

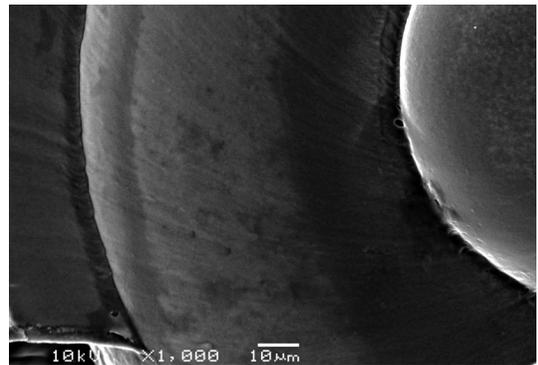


図2 図1に示した殻表面の拡大画像 ($\times 1000$)。くぼみ状構造の成長線が確認される。

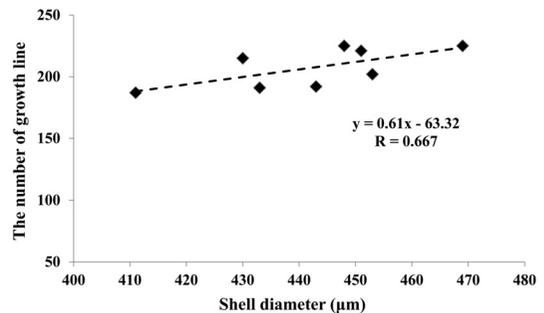


図3 成長線数と殻の直径の関係。回帰直線は弱い正の相関を示した。

有殻翼足類 *Limacina helicina* の殻の成長速度

表 1 殻の直径、一日に形成される成長線数、成長線の間隔、殻の成長速度の平均値と標準偏差。

Sample No.	Shell diameter (μm)	Number of lines formed in a day	distance between growth lines (μm)	daily growth rate (μm day ⁻¹)
1	411	2.08	6.93±2.36	14.40±4.90
2	430	2.56	7.36±3.24	18.83±8.29
3	433	2.12	6.29±2.17	13.35±4.61
4	443	2.13	8.12±3.54	17.32±7.55
5	448	2.55	6.97±2.90	17.76±7.39
6	451	2.46	7.34±2.66	18.02±6.53
7	453	2.24	8.54±2.91	19.17±6.53
8	469	2.50	6.90 ±2.36	17.25±5.90
average	442.3±17.5	2.33±0.21	7.42±2.86	17.26±6.78

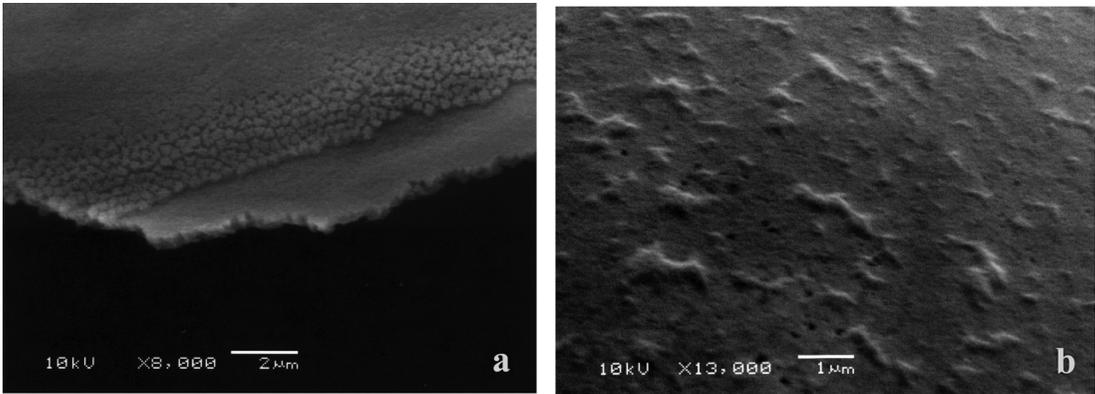


図 4 a: 殻の表面を内側から観察した画像。上部に薄い稜柱構造、下部に相対的に厚い 交差板構造が見られる。
b: 胎殻付近の表面に突起構造が認められる。

殻の微細構造は、外層が極めて薄い稜柱構造、内層が交差板構造からなる 2 層構造であった (図 4a)。その他に外層と内層の間に均質な粒状構造の中層が存在し、3 層構造が存在する個体も見られた。胎殻 (最初に形成された殻) の表面は、多くは起伏のある構造物がある (図 4b)。一般に殻全体は殻皮に覆われていたが、まれに胎殻の殻皮が部分的に剥がれ、均質な粒状構造が露出している個体も見られた。観察された個体の多くが 2 層構造であるが、構造が不明瞭なもの、中層が均質な粒状構造である 3 層構造の場合も一部観察された。また、中層と内層の厚さの割合が変化するなど、個体間や同じ個体においても部位によって殻微細構造に変化が見られた。

4. 考察

光学顕微鏡、SEM の両方で殻表面の成長線が観察された。光学顕微鏡を使用した場合にも成長線の存在が識別できたことは、今後の観察作業を容易にする可能性があるが、殻の内側に軟体部が残存すると成長線の識別は容易ではないなどの技術的問題がある。SEM 観察により、成長線が浅いくぼみ状の構造であることが示されたが、鮮明度の違いはくぼみの深さによると考えられる。

L. helicina の大型個体に存在する縦肋は、段差構造になっているとされる (中村、私信) ことから、本研究で観察された成長線と縦肋は異なるものと思われる。しかし、成長にともなって縦肋が形成される際、本研究で観察されたくぼみとしての成長線が縦肋となるのか。あるいは、くぼみ

としての成長線が形成されながら、同時に縦肋も形成されるのかについては現段階では判断はできない。成長線と交差する線状構造は、南極海に生息する種類 *L. helicina antarctica forma antarctica* において確認された螺肋（らろく）に形態が近似するが⁽¹⁸⁾、形成過程などは不明である。

Lischka らによる実験は⁽¹⁵⁾、異なる pH 海水環境下において *L. helicina* の殻をカルセインにより染色し、成長速度を測定したものである。彼らの実験から成長速度を求めたところ、pH 8.06 における平均殻径 $720\ \mu\text{m}$ の個体の成長速度は平均 $18.4\ \mu\text{m day}^{-1}$ であった。また、本研究と同一試料を用いた、秋葉（未発表）によるカルセイン及びテトラサイクリン染色によって測定された成長速度は、殻径 $450\ \mu\text{m}$ 前後の個体において平均 $12.8 \pm 10.0\ \mu\text{m day}^{-1}$ であった。それらの結果と本研究の結果を比較すると、これらの値と近似することから、本研究の推定値は信頼に足るものと思われる。また、1日に形成される成長線数は平均で $2.3 \pm 0.2\ \text{lines day}^{-1}$ と偏差が小さく、殻径と成長線数の間には正の相関がみられたことから、未成熟期の短い期間においては殻径と成長線数は一次式で示すことが可能であると考えられる。また、1日当たりの成長線数の逆数は、成長線1本が形成される日数（ days line^{-1} ）を意味するので、それを求めると $0.4 \pm 0.03\ \text{days line}^{-1}$ となる。これは、成長線が約半日に1本できることを意味する。成長線を用いた解析は、飼育実験を必要としないことが有用な理由の一つであるが、さらにこれが現場における成長の履歴を反映しているならば有望な指標と考えられる。

微細構造の特徴をまとめると以下のような。外層が極めて薄い稜柱構造で内層が交差板構造であること、胎殻の表面に起伏のある構造物があること、交差板構造の交差板の向きがランダムであるということは Sato-Okoshi ら⁽¹⁸⁾ の北極産と南極産の *L. helicina* の小型個体を用いた観察結果と一致する。また、胎殻の表面に見られた起伏状の構造物は、Boltovskoy⁽²⁰⁾ による南極産の *L. helicina* における観察結果とも一致する。しかし、本研究では外層あるいは中層が均質の粒状構造からなる3層構造が一部観察された。これ

は、本研究で用いた *L. helicina* が Sato-Okoshi ら⁽¹⁸⁾ と採集海域が異なり、変種である可能性があるため、それらが殻微細構造の差異をもたらしたかもしれない。また、本研究で用いた試料の殻径が $450\ \mu\text{m}$ 前後（最大 $536\ \mu\text{m}$ ）であり、先行研究^(18, 20) が観察に使用した個体がやや大型であり、殻口付近では粒状構造が観察されなかった事実を考えると、均質の粒状構造は幼生期にのみ形成される可能性もある。

均質の粒状構造は粒状間に隙間があるため交差板構造と比較して密度が低いことから、強度では劣るが形成に要するエネルギーは少ないと予想される。その場合は幼生期においては交差板構造ではなく均質粒状構造を形成することによって、殻形成のためのエネルギーを節約していることを示唆している。その後、成長に伴い殻の強度が必要とされるため、交差板構造を形成している可能性がある。殻の形成における微細構造は、環境や生理状態の変化に応じて柔軟に対応していると考えられ、成長線の内部構造の差異と関連する可能性もある。しかし、成長線の幅は極小であるため、それを識別するのは難しい。本研究においては *L. helicina* の未成熟個体を用いたが、今後はより大型の成熟個体を用いた成長線と殻の微細構造を観察する必要があるだろう。

謝辞

試料採集の際にご協力を頂いた紋別市の濱岡莊司氏、片倉靖次氏、紋別市海洋交流館ガリンコタワーの永田隆一氏をはじめとする皆様には心から感謝の意を表します。また、東邦大学理学部生命圏環境科学科大越健嗣教授には、貴重なご意見を頂き感謝いたします。

文献

- (1) Kobayashi, H. A. (1974), Growth-cycle and related vertical distribution of thecosomatous pteropod *Spiratella* (“*Limacina*”) *helicina* in central Arctic Ocean. Mar. Biol., 26: 295-301.
- (2) Lalli, C. M. and Gilmer, R. W. (1989), The thecosomes, shelled pteropods. In: Lalli, C. M., Gilmer, R. W. (eds) Pelagic snails. The biology of holoplanktonic gastropod mollusks. Stanford

有殻翼足類 *Limacina helicina* の殻の成長速度

University Press, Stanford, Calif., pp.58-166

(3) Tsurumi, M., Mackas, D. L., Whitney, F. A., DiBaccoc C., Galbraith M.D. and Wong C.S. (2005), Pteropods, eddies, carbon flux, and climate variability in the Alaska Gyre. *Deep-Sea Res. II.*, 52: 1037-1053.

(4) Hunt, B., Strugnell, J., Bednarsek, N., Linse, K., Nelson, R.J., Pakhomov, E., Seibel, B., Steinke, D., Würzberg, L. (2010), Poles Apart: The “Bipolar” Pteropod species *Limacina helicina* is genetically distinct between the Arctic and Antarctic Oceans. *PLOS One.*, 3: e9835.

(5) Conover, R. J. and Lalli, G. M. (1972), Feeding and growth in *Clione limacina* (Phipps), a pteropod mollusk. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 9: 279-302.

(6) Hunt, B. P. V., Pakhomov, E. A., Hosie, G. W., Siegel, V., Ward, P. and Bernard, K. (2008), Pteropods in Southern Ocean ecosystems. *Prog. Oceanogr.*, 78: 193-221.

(7) Karnovsky, N. J., Hobson, K. A., Iverson, S. and Hunt, G.L., Jr. (2008), Seasonal changes in diets of seabirds in the North Water Polynya: a multiple-indicator approach. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 357: 291-299.

(8) Accornero, A., Manno, C., Esposito, F. and Gambi, M.C. (2003), The vertical flux of particulate matter in the polynya of Terra Nova Bay: Part II. Biological components. *Antarct. Sci.*, 15: 175-188.

(9) Collier, R., Dymond, J., Honjo, S., Manganini, S., Francois, R. and Dunbar, R. (2000), The vertical flux of biogenic and lithogenic material in the Ross Sea: moored sediment trap observations 1996-1998. *Deep-Sea Res. II.*, 47: 3491-3520.

(10) Manno, C., Tirelli, V., Accornero A. and Fondammani S. (2010), Importance of the contribution of *Limacina helicina* faecal pellets to the carbon pump in Terra Nova Bay (Antarctica). *J. Plankton Res.*, 32(2): 145-152.

(11) Orr, J.C., Fabry, V.J., Aumont, O., Bopp, L., Doney, S.C., Feely, R.A., Gnanadesikan, A., Gruber, N., Ishida, A., Joos, F., Key, R.M., Lindsay, K., Maier-Reimer, E., Matear, R., Monfray, P., Mouchet, A., Najjar, R.G., Plattner, G.-K., Rodgers, K.B., Sabine,

C.L., Sarmiento, J.L., Schlitzer, R., Slater, R.D., Totterdell, I.J., Weirig, M.-F., Yamanaka, Y. and Yool, A. (2005), Anthropogenic ocean acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms. *Nature* 437: 681-686.

(12) Mucci, A. (1983), The solubility of calcite and aragonite in seawater at various salinities, temperatures, and one atmosphere total pressure. *Am. J. Sci.*, 283: 780-799.

(13) Comeau, S., Gorsky, G., Jeffree, R., Teyssie, J. -L. and Gattuso, J. -P. (2009), Key Arctic pelagic mollusk (*Limacina helicina*) threatened by ocean acidification. *Biogeosciences.*, 6: 1877-1882.

(14) Comeau, S., Jeffree, R., Teyssie, J. -L. and Gattuso, J. -P. (2010), Response of the Arctic Pteropod *Limacina helicina* to Projected Future Environmental Conditions. *PLOS One.*, 6: e11362.

(15) Lischka, S., Büdenbender, J., Boxhammer, T., and Riebesell, U. (2011), Impact of ocean acidification and elevated temperatures on early juveniles of the polar shelled pteropod *Limacina helicina*: mortality, shell degradation, and shell growth. *Biogeosciences.*, 8: 919-932.

(16) Roberts, D., Howard, W. R., Moy, A. D., Roberts, J. L. and Trull, T. W. (2008), Interannual variability of pteropod shell weights in the high-CO₂ Southern Ocean. *Biogeosciences Discuss.*, 5: 4453-4480.

(17) 大越 健嗣 (2001)、第2章 貝殻はデータバンク。貝殻・貝の歯・ゴカイの歯。成山堂書店、東京、pp. 19-69.

(18) Sato-Okoshi, W., Okoshi, K., Sasaki, H., and Fumihiko, A. (2010), Shell structure of two polar pelagic molluscs, Arctic *Limacina helicina* and Antarctic *Limacina helicina antarctica* forma *antarctica*, *Polar Biol.*, 33: 1577-1583.

(19) 大越 健嗣 (2007)、4.1 貝殻に含まれるミネラル。海のミネラル学海のミネラル学—生物との関わりと利用。成山堂書店、東京、pp. 63-68.

(20) Boltovskoy, D. (1974), Study of surface-shell features in Thecosomata (Pteropoda: Mollusca) by means of scanning electron microscopy. *Mar. Biol.*, 27: 165-172.