

総 説

安定同位体による新食物網解析法

— 数値の解釈と基礎生産者の同位体比推定記述モデルの検討 —

杉崎宏哉^{*1,2}・児玉真史^{*1}・市川忠史^{*1}・山田圭子^{*1}・和田英太郎^{*1}・渡邊朝生^{*1}

A New Aspect on Food Web Analyses Using a Nitrogen and Carbon Isotope Map - Guidance for Interpretations of Values and Estimation Model for Stable Isotope Values of Primary Producers of Food Web -

Hiroya SUGISAKI^{*1,2}, Masashi KODAMA^{*1}, Tadafumi ICHIKAWA^{*1}, Keiko YAMADA^{*1},
Eitaro WADA^{*1} and Tomowo WATANABE^{*1}

Though the isotope analysis method for marine and fishery science is spreading recently, there are serious obstacles for the analysis of food chain structures due to the difficulty of measuring the stable isotope ratio of the primary producer. In this paper, a brief history of the trophic fractionation of carbon and nitrogen isotopes during feeding processes was reviewed and a new method introduced for analysis of the food web structure and estimation of trophic level regardless of the stable isotope ratio of primary producer or the origin of the organic matters of the food web.

Recently a linear relation was reported between nitrogen and carbon isotope ratios among food chains in marine environments with a constant ratio of $\Delta\delta^{15}\text{N}/\Delta\delta^{13}\text{C}=1.53$. Starting with this equation, together with the two source mixing model for the Ohtsuchi bay watershed, we established a predictive descriptive model for the coastal areas and off-shore areas of the Sanriku district in Japan. On the basis of our model, we also reexamined several methods of sampling and sample preparations. Some potential future aspects of the present stable isotope techniques were discussed.

2012年12月28日受付, 2013年5月22日受理

海洋科学に関連した近年の技術革新の背景

30年来の環境学の発展を振り返ると衛星画像とコンピュータサイエンスの著しい進歩には目を見張るものがある。例えば、海洋における一次生産量、その時空間分布について衛星による推定とモニタリングの精度が飛躍的に上昇している^{1,4)}。すなわち、クロロフィル量や

生産量を領域スケールから全球スケール、かつ短いタイムスケール(1週間以内の程度)で観測できるようになったということである。一方、近年ではコンピュータの処理性能の開発が目覚ましく発展しており、全球スケールのモデル解像度も300~400km程度から25km以内の渦解像可能なモデル⁵⁾が開発され、領域スケールでは

*1 独立行政法人水産総合研究センター中央水産研究所 海洋・生態系研究センター
〒236-8648 横浜市金沢区福浦2-12-4

Research Center for Fisheries Oceanography and Marine Ecosystem, National Research Institute of Fisheries Science, Fisheries Research Agency, 2-12-4, Fukuura, Kanazawa-ku, Yokohama, 236-8648, Japan

*2 (現所属) 独立行政法人水産総合研究センター 研究推進部
〒220-6115 横浜市西区みなとみらい2-3-3 クイーンズタワー B15F
(present address) Research management Department, Fisheries Research Agency
Queen's Tower B 15F, 2-3-3 Minatomirai, Nishi-ku Yokohama, 220-6115, Japan

2.5km 以内まで解析可能となり、研究対象とする規模も、その目的により様々なアプローチが可能となった。このように現在は、衛星から得られたデータとタイムステップが短い海洋生態数値モデルとを容易に比較ができる時代となった。

しかしながら海洋の水産資源の主題となる食物網、すなわち高等植物→植食性動物→肉食性動物→高次動物の実態については、生物種のレベルである程度理解されているが、一步踏み込んだ代謝系のレベルや分子のレベルでは、その実態を把握するに至っていない。このことが、現在の生物の機能を重要視する生態系モデルと観測の間に大きなギャップを生じさせ、観測とモデルの統合を困難にする原因となっていると考えられる。

近年、生態学に導入された分析手法として、分子生物学的な DNA 分析法と化学的な安定同位体 (Stable Isotope; SI) 精密測定法がある。前者は遺伝情報をつかさどる核酸塩基の配列を解析する DNA ワールド学と見做せる。DNA ワールドでは主に系統分類や親子関係の解析が中心であり、対象生物の系統進化上の位置づけを明らかにする。さらに高速 DNA 塩基配列解析法による動植物プランクトン、微生物の同定等の解析に使われ始めている。後者は生体内で起こる同化や異化などの化学反応の際に同じ元素でも同位体が異なるために起こる反応速度の違いに起因して生態構成元素の同位体比が変動する効果 (同位体効果) を利用するものである。つまり、同位体分子の分子振動の差を解析する SI ワールド解析学であり統計熱力学に支配された生物界を見ることが出来る。安定同位体法は化学反応における同位体効果を基盤とする生物現象の解析法であるので、物質の動態について生物種を超えた一般性が期待できる事象を扱う方法でもある。SI ワールドでは安定同位体比の分布を測定することにより、生態系内の物質循環のキープロセスと食物網の構造を知ることができる⁶⁾。

上に述べた数値モデルとリモートセンシングは、コンピュータや衛星のめざましい発展によって、ここ 10 年日進月歩の中にある。一方、安定同位体比精密測定法は分子レベルの理解を深めつつも発展途上にある。近未来には安定同位体比数値モデルを構築し、現場観測によって検証・高度化する分野の発展が見込まれる。本研究ではこのような視座に立脚して、食物網に沿った窒素・炭素安定同位体効果の最新の知見をまとめ、食物網を包括する安定同位体比推定記述モデルの構築・提示を目指した。具体例として三陸沖の食物網解析を取り上げた。またこのモデルに基づいて、試料処理法について考察した。

水産研究における安定同位体手法の利用～餌や消化管内容物を直接調べなくても食性や被食・被捕食関係が分かる手法～

これまで、長年にわたり水産資源研究は調査船および

市場調査を行って得られるデータを元にした資源量や漁場の把握と予測が主要な研究内容であったが、水産重要種 (マイワシ、サンマなど) は大きな資源量変動を繰り返しており、この変動は海洋環境変動と連関していることがわかってきた。この様な大きな資源変動メカニズムを把握するには、水産重要種が生活史の様々な時期にどの海域でどのような被食捕食関係に遭遇し、その結果としてどのような栄養条件の優劣が生じ、どのような条件で捕食されるいは生残したかを、観測データやモデルを用いて詳細に解析して生態系構造を明らかにする必要がある。そのため水産資源調査の一環としてこれまでも対象種の食性調査が行われており、その一般的な手法として消化管内容物を観察して査定計量する手法が多く用いられてきた。しかし海洋生態系を構成する生物種は大変多く、調査も広域に及ぶため、これらの食性を消化管内容物の検鏡から解析するには多大な労力を要し、しかも捕獲された生物が直前に補食した餌という断片的な情報しか得られてこなかった。そこで、近年水産研究においても安定同位体を用いた食物網構造解析の手法が注目され、徐々に成果が出始めている⁷⁾。これらの成果から、かみ砕かれたり急速に消化したりすることにより消化管内容物調査ではわかりにくかった海洋生物の食性の情報が得られ、餌の餌となるものの推定など基礎生産から対象種に至る食物網構造を把握することができるようになる。食物網構造が自然・人為的要因による環境変化などによって変動することで、水産重要資源などの餌料環境に大きな変動を及ぼして資源量変動がもたらされたり、生態系を構成する主要種が変化して漁場が変動したりすると考えられているが、消化管内容物の直接観察などの手法のみではこのような食物網構造の実態を把握することは困難である。消化管内容物や捕食行動の直接観察により餌の種類やサイズなどを把握することに加えて安定同位体を用いることにより個々の被食・捕食関係から多様な生態系の中の食物網構造まで、生物の食性に関わる様々な解析が可能となる。

また、安定同位体は魚体を形成する栄養源となっている餌を識別できるので、増養殖事業において、無給餌養殖で実際に何が主要な餌料となっているかということや、様々な種類の餌料の中でどの餌がどの程度魚体形成に貢献しているか等を定量的に把握することが可能となる。安定同位体のデータを正しく用いることにより、これまでアプローチが困難であった水産重要種など水圏における生態系の主要生物をとりまく食物網を把握することが可能となり、水産資源研究に大きく貢献できると期待されている^{8,9)}。

安定同位体食物網

安定同位体は、近年、構成する動物の種類に関わらず食物網構造を数値的に表現する手法として広く普及し始めており、水産研究においても利用されるようになって

きた。安定同位体を用いて食物網構造を判断するためには生態系の有機物起源（エンドメンバー、すなわち基礎生産者や遺骸など）の安定同位体比を把握する必要がある。しかし、海洋においては起源となる有機物の特定が難しいことに加え、基礎生産者は微小な植物プランクトンやバクテリアなどであることも多く、安定同位体比を分析できる十分量を収集することも困難であり、海洋の生態系構造を解析する際にエンドメンバーの安定同位体比から分析を行う障害となっている。そこで、本研究においては、安定同位体比を用いた手法の近過去史の概要をまとめ、エンドメンバーにこだわらず測定可能な生物種の安定同位体比を測定し同位体マップ上に整理することにより、同位体比の数値から食物連鎖構造や各種の栄養段階を推定する新食物網解析の提案について紹介する。

生物界における窒素同位体比測定の報告はHOERING¹⁰⁾に始まる。彼は職人肌の研究者で難しい測定法に挑戦するのが好きなようであった。また岩石中の正確な窒素同位体比も彼のグループによって報告されている。海洋における窒素同位体比の測定に関する初期の本格的論文は日本から出ており¹¹⁾、このときの成果は以下のようにまとめられる。

- 1) 海洋では食物網に沿って $\delta^{15}\text{N}$ 値が高くなる。
- 2) 海洋生態系は陸域よりも $\delta^{15}\text{N}$ 値が高い。

この論文は国内紙であったが、我が国の学会誌が別刷を外国に沢山送っていたこともあり色々な国の地球化学者の注目を浴びることとなった。

炭素同位体生態学の先鞭となる「食う-食われる」の研究は1975年ごろTexas大学海洋研究所（有機地球科学のP.L. PARKER教授の研究室）で始まった。著者の一人和田は博士研究員として同研究所に在席し、当時、院生として在席していたBrian FRY（現グリフィス大教授、オーストラリア）やMalilin FORGEL（現カーネギー研究所、Washington DC）、その後に加わったStephen MACKO（バージニア大学教授）などにより、いわゆる炭素同位体生態学の走りとなった研究が進められた。研究所がメキシコ湾沿いのC4植物（光合成にカルビン-ベンソン回路以外にCO₂を濃縮するC4回路を持つ植物群）の多い藻場の中にあり、炭素同位体の研究ができる自然環境に恵まれていたことがその出発点になったと思っている。食物網に沿った¹⁵Nの濃縮に関する本格的な論文は、UCLAのDENIRO and EPSTEIN¹²⁾、MINAGAWA and WADA¹³⁾等により報告された。

以下に生物界の窒素・炭素同位体比の分布に関する経験則を示す¹⁴⁾。

¹⁵Nは食物網によって濃縮される。食物の栄養段階（Trophic Level:TL）を1とすると図1に示すように、

$$\delta^{15}\text{N}(\text{動物}) = 3.3(\text{TL}-1) + \delta^{15}\text{N}(\text{植物})$$

……経験則1

の関係式が成立する。この一般式は無脊椎動物や脊椎動

物を通して成立することが認められている¹³⁾。これに対して $\delta^{13}\text{C}$ 値は餌と捕食者の間に0~1.5%の差が見られる¹⁵⁻¹⁷⁾。McCONNAUGHEY and McROY¹⁸⁾はベーリング海の食物網内における $\delta^{13}\text{C}$ 値を調べた結果、栄養段階（TL）が1つ上がる毎に $\delta^{13}\text{C}$ 値が1.5%濃縮されることを示した。またRAU et al.¹⁶⁾では、東部太平洋赤道域およびカリフォルニア沿岸域の捕食者を調べた結果、0.7~1.4%/TLの関係を示し、データセットにより変動が見られるがそのような相違が生じるメカニズムには、エンドメンバーの組成や成長速度など様々な要因が想定され、食物網過程上の $\delta^{13}\text{C}$ 値の濃縮機構に関して統一の見解が明らかとなっていなかった。

これまでの経緯をまとめると、 $\delta^{15}\text{N}$ - $\delta^{13}\text{C}$ マップ上に一次生産者の安定同位体比が異なる食物網の構造を描くことができ、不完全ながら安定同位体食物網モデルが使われるようになったが、 $\delta^{13}\text{C}$ の生物濃縮について幅があり、かつ、 $\delta^{13}\text{C}$ は栄養段階に応じた変化よりも一次生産者が生息する環境に応じた変動が大きいので、食物網の炭素源の特定と動物の餌起源の推定に有効であると考えられてきた¹⁹⁻²⁰⁾。このため誌上发表された研究では、 $\Delta\delta^{13}\text{C}$ （ $\delta^{13}\text{C}$ の数値の差）よりも $\Delta\delta^{15}\text{N}$ （ $\delta^{15}\text{N}$ の数値の差）の変化をもとに栄養段階を研究されているものが多く、この解析法は主として窒素同位体比の変化を中心に発展してきた。不完全ではあったが、この式を色々な生態系に応用することにより、食物関係を中心とする安定同位体の研究に一応の進捗が見られ、同位体生態学なる言葉も散見されるようになってきた。その後MATTHEWS and HAYES²¹⁾によってIsotope-Ratio-Monitoring Gas Chromatography Mass Spectrometryが開発され、Heフローズルー法と微分同位体比測定法の導入によって、現在見られる迅速簡便法に発展し、同位体生態学が急速に普及する引き金となった。近年は分子レベルでの同位体比の測定が急速に発展しており、今後同位体生態学は

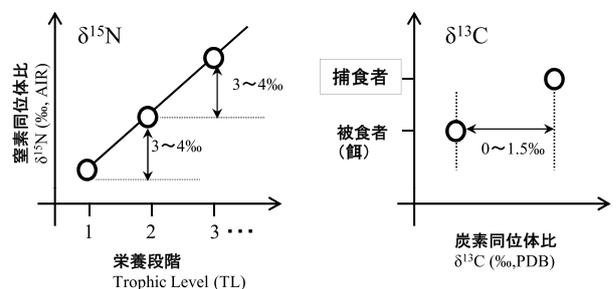


図1. 栄養段階（Trophic level）と左：窒素安定同位体比（ $\delta^{15}\text{N}$ ：MINAGAWA & WADA, 1984; FRY, 1988より改変）右：炭素安定同位体比（ $\delta^{13}\text{C}$ ：DENIRO & EPSTEIN, 1978; RAU et al., 1983; FRY & SHERR, 1984より改変）の関係（相田私信）
これらの関係から生態学的なプロセスや生態系（食物連鎖）構造などの理解が可能
ただし、 $\delta^{13}\text{C}$ については測定する部位によって値が異なるため、不明瞭な部分もある

分子レベルや代謝マップの動態などの基礎研究を踏まえて発展してゆくことが予見される。

食物網が $\delta^{15}\text{N}$ - $\delta^{13}\text{C}$ マップ上で直線になる意義

多くの文献では食物網のデータを $\delta^{13}\text{C}$ - $\delta^{15}\text{N}$ マップ上に描き最小二乗法で有意の直線を引いている。 $\delta^{13}\text{C}$ 値の変動は約 0.8‰ 程度とされ、食物網の解析では、陸上の植物、中緯度の植物プランクトン、C4 植物の間の大きな $\delta^{13}\text{C}$ 値の差を使い食物網を解析することに留まっていた。

植物の生育に使われる窒素・炭素の安定同位体比は地域によって一定の値を示し、これを出発点とする生態系は地域ごとに統一的な規則性が維持されると考えることが出来る¹⁴⁾。

ここでどのような条件を満たせば、食物網は $\delta^{13}\text{C}$ - $\delta^{15}\text{N}$ マップ上で直線となるのかを検討する。この背景には多くの生態系で $\delta^{13}\text{C}$ と $\delta^{15}\text{N}$ が有意の直線関係を示すことが多いという事実がある。このためには以下の条件を満たす必要が出てくる。

- 1) 図2に示したように食物網の起源となる植物プランクトンは連鎖上の高位の動物に共通しており、同一の食物網内にある。
- 2) メタボリックマップは、代謝形態の異なる生物種の例外はあるが、多くの生物に共通であり、タンパク質を構成するアミノ酸合成系の窒素・炭素の同位体効果は全ての動物で同じである。すなわち低次から高次までの栄養段階を網羅した食物網を考えたとき、

$$\Delta \delta^{15}\text{N} / \Delta \delta^{13}\text{C} = \text{一定}$$
 といえる。
- 3) 1次生産者の $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$ は、ある時間幅で一定とみなしうる状況である。例えば動物プランクトンの昼夜鉛直移動がホモジナイザーのように鉛直方向の同位体比の異なる藻類を摂取し平均化するような場

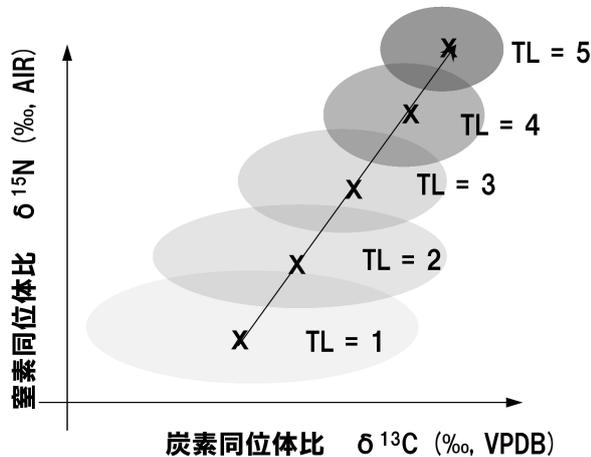


図2. 栄養段階 (Trophic level; TL) を示す $\delta^{13}\text{C}$ - $\delta^{15}\text{N}$ 分布の概念図

合を想定している。

これらの条件が成立すれば、食物網は $\delta^{13}\text{C}$ - $\delta^{15}\text{N}$ マップ上で直線になる。

図3に同位体効果の起こる生体内のサイトとしてアミノ酸合成系にまつわるメタボリックマップを示したが、アミノ酸の炭素骨格の合成系はすべての生物に共通であり、トータルとしてのアミノ酸の炭素骨格の合成系のダイナミクスに關与する同化と異化の比率 (同化/異化) は生物種によらずほぼ同じであり、似た $\Delta \delta^{13}\text{C}$ を示すことが期待できる。実際、アミノ酸の炭素同位体比分布には一定の傾向があること²²⁾やプランクトンではセルロースに比べてアミノ酸の方が高い $\delta^{13}\text{C}$ 値を示すこと²³⁾が報告されている。

$\Delta \delta^{15}\text{N}$ はアミノ基の脱アミノ過程ですべての生物に共通に起こるといふ力石ら^{24,25)}の考えを踏襲すれば、上記 $\Delta \delta^{15}\text{N} / \Delta \delta^{13}\text{C} = \text{一定}$ となり、 $\delta^{13}\text{C}$ - $\delta^{15}\text{N}$ マップ上で食物網は直線になる (図2)。

この仮説を検証するためには共分散分析 (ANCOVA: analysis covariance) を用いる方法が考えられる。その結果、多くの生態系について共通の勾配が得られれば、その勾配と一次生産者の窒素・炭素安定同位体比を用いて、目的とする同位体比推定記述モデルが構築可能となる。繰り返しになるが、これまでの文献でのデータは食物網が窒素・炭素安定同位体マップ上で有意に直線なるものが多いことがこの仮説の成立の可能性を示唆している。このような視点から、食物網に沿った $\Delta \delta^{15}\text{N} / \Delta \delta^{13}\text{C}$ について最近の成果を検討し、同位体比推定記述モデルの構築を意図した。

安定同位体食物網記述モデルの登場

AITA *et al.*²⁶⁾らは西部北太平洋域を中心として海洋中の食物網に関するデータベースをまとめ海域によって異なる $\Delta \delta^{15}\text{N} / \Delta \delta^{13}\text{C}$ を持つのかを検証するために ANCOVA を用いて統計的な解析を行った。

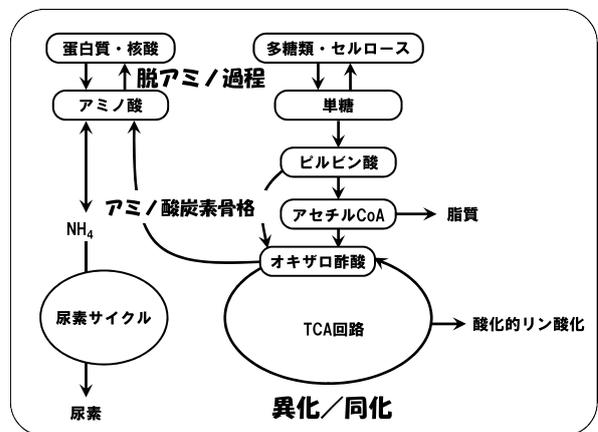


図3. 作業仮説：同位体効果の起こるサイト

$\delta^{15}\text{N}$ (‰) = 1.53 [± 0.25] $\delta^{13}\text{C}$ + 40.9 [± 5.6] + 各海域の定数 ($p < 0.05$)

水産総合研究センター北海道区水産研究所・東北区水産研究所の共同海洋調査定線である A-line (道東及び本州東北沖太平洋上) の親潮系冷水域においては

$$\delta^{15}\text{N} (\text{‰}) = 1.53 [\pm 0.25] \delta^{13}\text{C} + \text{各海域の定数} (p < 0.05) \dots\dots \text{経験則 2}$$

ここで A-line 親潮水域の定数は -1.71 ± 0.5724 であるから、

$$\delta^{15}\text{N} (\text{‰}) = 1.53 [\pm 0.25] \delta^{13}\text{C} + 39.2$$

となる。

MEARNS²⁷⁾ は胃の内容物などの調査から、海洋性動物プランクトンの Calanoid copepodas (カラヌス目カイアシ類), Chaetognaths (ヤムシ類) の栄養段階 (TL) はそれぞれ 2.0, 3.5 と報告されている。またカイアシ類の一種である *Eucalanus bungi* の TL を 2.0 として勘案し、最終的には ANCOVA から得られた直線から、親潮域の植物プランクトンの平均的な窒素と炭素の定同位体比としてそれぞれ、

$$\delta^{15}\text{N} = 5.0, \quad \delta^{13}\text{C} = -22.3\text{‰}$$

が得られた。

ここに提案した同位体比推定記述モデルは以下のように要約できる。

- i) ある生態学的に栄養段階 (TL) の分かっている動物について $\delta^{15}\text{N}$ と $\delta^{13}\text{C}$ の平均値を求める。
- ii) 次に $\delta^{13}\text{C}$ - $\delta^{15}\text{N}$ マップ上で、この点を使い勾配 1.5 の直線を引く。
- iii) この直線上で $\Delta \delta^{15}\text{N} / \text{TL} = 3.3\text{‰}$ あるいは $\Delta \delta^{13}\text{C} / \text{TL} = 2.2\text{‰}$ を使って、その動物の食物網の出発点と想定される植物プランクトンの値がマップ上に決まる。
- iv) 得られた直線を基準として他の動物の同位体比が解析可能となり、その TL を予測可能となる。

実例：三陸沖 (A-line) 及び内湾における同位体比推定記述モデルの提案

以上の作業仮説、これまでの研究から得られている食物網経験則 1 および 2、種々の考察をまとめると食物網の窒素・炭素安定同位体比推定記述モデルは以下のように整理される。

$$\delta^{15}\text{N} (\text{動物}) = 3.3 (\text{TL}-1) + \delta^{15}\text{N} (\text{植物}) \dots\dots \text{経験則 1}$$

$$\delta^{15}\text{N} (\text{‰}) = 1.53 [\pm 0.25] \delta^{13}\text{C} + 39.2 (p < 0.05) \text{ (A-line 親潮域)}$$

$\Delta \delta^{15}\text{N} / \Delta \delta^{13}\text{C} = 1.53 \pm 0.25$ (一定) ……経験則 2 したがって、 $\delta^{13}\text{C}$ - $\delta^{15}\text{N}$ マップ上で高位の魚の同位体比が得られると、その $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ 値と勾配 1.53, 生態学的な栄養段階数を用いて直線を引き、 $\Delta \delta^{15}\text{N} / \text{TL} = 3.3$ を入れて、対応する一次生産者マップ上の位置を決めることが可能となる。一次生産者の平均値が得ら

れた場合も同様の手続きでマップ上に直線を引くことが可能となる。

以下に文献値を踏まえた三陸沿岸及びその近海における同位体比推定記述モデルを具体例として取り上げてみる。

図 4 に岩手県大槌川水系の堆積物の陸域から湾にいたる安定同位体比の変化²⁸⁾を示した。大槌湾の堆積有機物は、陸起源と湾内で植物プランクトンによって作られ沈降した有機物の混合系、すなわち Two Source Model が成立し以下の式が得られている²⁸⁻³⁰⁾。

$$\delta^{15}\text{N} (\text{‰}) = 0.68 \delta^{13}\text{C} + 20.6 (r = 0.57; n = 19)$$

これより食物網におけるエンドメンバーとして、陸域有機物の C, N の δ 値として -26.5‰ , $+1.8\text{‰}$ 、また大槌湾で生産される有機物の平均値として -20.3‰ , $+6.3\text{‰}$ が得られている。

これらから親潮域 (A-line)²⁶⁾、大槌湾²⁸⁻³⁰⁾、大槌陸域 (和田私信) における食物網-安定同位体マップを示した (図 5)。

仙台湾で採取した、カタクチイワシ (*Engraulis japonicus*) からヒラメ (*Paralichthys olivaceus*)、多毛類からババカレイ (*Microstomus achne*) の連鎖のデータも勾配 1.53 から説明が可能と思われる (東北水産研究所、未発表)。ここに述べた安定同位体比推定記述モデルにより、 $\delta^{13}\text{C}$ - $\delta^{15}\text{N}$ マップ上で、食物網の解析が可能となる。

安定同位体比を用いた新手法に関する考察

ここに述べた新しい食物網解析法では一次生産者の窒素・炭素安定同位体比が一定のとき、食物網は $\delta^{13}\text{C}$ - $\delta^{15}\text{N}$ マップ上で勾配が約 1.5 の直線となる。ただし扱う窒素・炭素はアミノ酸の複合体となるタンパク質であり、その代表はいわゆる肉の部分である。動物体内では器官によって窒素・炭素同位体比が異なるが (図 6)、上記の一般経験則は食物網にそってアミノ酸組成が似ている筋肉タンパクを対象として成立する。

この手法は、海洋生態系のみならず、陸水、陸上の生

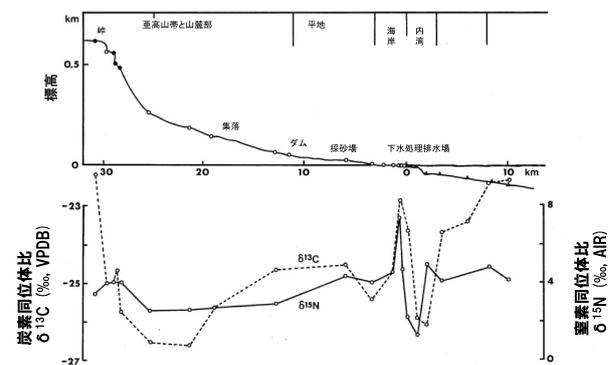


図 4. 大槌川水系 (河川+湾) の標高と地勢 (上) と堆積物の同位体分布 (下) (WADA et al. 1987 より改変)

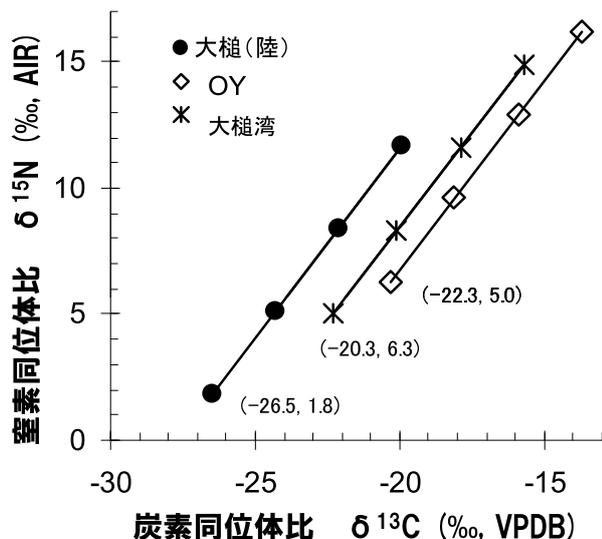


図5. A-line 上親潮域 (OY) と大槌湾及び大槌陸域における同位体予測記述モデル
() 内はエンドメンバーの平均的窒素・炭素同位体比

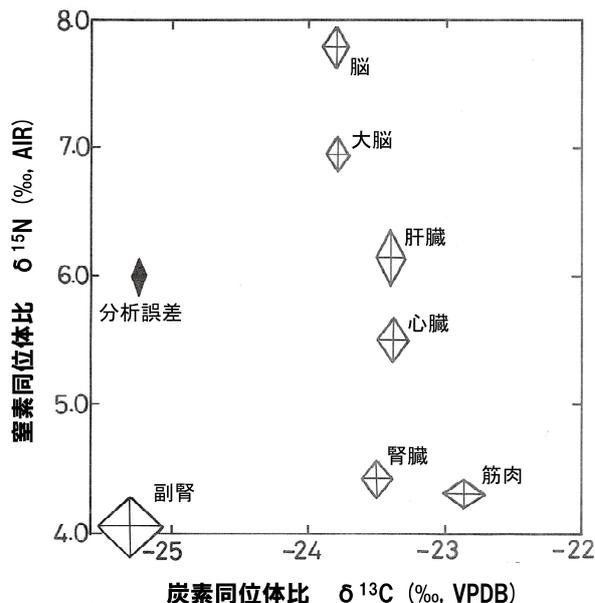


図6. 同じ餌で飼育した16匹のラットの各体組織における窒素・炭素同位体比 (和田, 2009より改変)
図左の◆は分析誤差を示す

態系にも有効であり, WADAら³¹⁾によるとこの式は, バイカル湖・琵琶湖沖帯の食物網, モンゴル草原の草, ヒツジ・ヤギ・ウシ・キツネ・オオカミを含む食物網でも成立していることが明らかとなっている。これは, 陸上(海洋)起源の生物生産を海洋(陸上)生物が利用するような異なった生態系が混合している場合の解析に適用できる手法である。

他の組織, 例えばモンゴル遊牧生態系ではヒツジ・ヤギ→キツネ・オオカミ→ヒトを含めた髪の毛についても成立することが確認されている³¹⁾。このことを踏まえ, 筋肉タンパク質を中心とした新食物網解析法ではこれまで不明瞭であった試料の扱いについて明確な指針が得られる。高井・富永⁷⁾は安定同位体比測定法について詳しく解説しているが, これを補足するために, 以下に新しい解析法に基づく資料処理法の新知見をまとめた。

勾配のゆらぎ

1) 速度論的要因: kinetic isotope effect

- 一般的に生体内の同位体比は, 代謝過程内で起こる数々の同位体分岐反応によって決定される(図3あるいはMINAGAWA *et al.*²²⁾の例より)
- 主要な代謝経路の多くは, 殆ど全ての細胞や生物で共通している。アミノ酸合成にまつわる中間代謝駆動時, 例えば排泄系(尿素サイクル), アミノ酸の炭素骨格の供給や消費をするTCAサイクル, アミノ酸の再利用等の代謝様の動態によって各種分岐反応時に差が生まれる。しかし栄養段階が異なる多くの動物は基本的には同一の代謝マップを持っており, 普通の生活では種に関わらずタンパク合成系とATP獲得系の駆

動の比(異化・同化作用の比率)が一定であると, アミノ酸総体の合成時の窒素・炭素同位体効果が相似的に起こり, 食物網を通して「 $\Delta \delta^{15}\text{N} / \Delta \delta^{13}\text{C} = \text{一定}$ 」が期待される。しかも逐次化学反応ではなく, いくつかの代謝サイクルの総体として同位体効果が顕在化するため, この同位体効果の温度依存性はなくなっていると考えられる。すなわち多重な代謝連鎖系の動態は海洋生物全般について相似であることを示唆する。

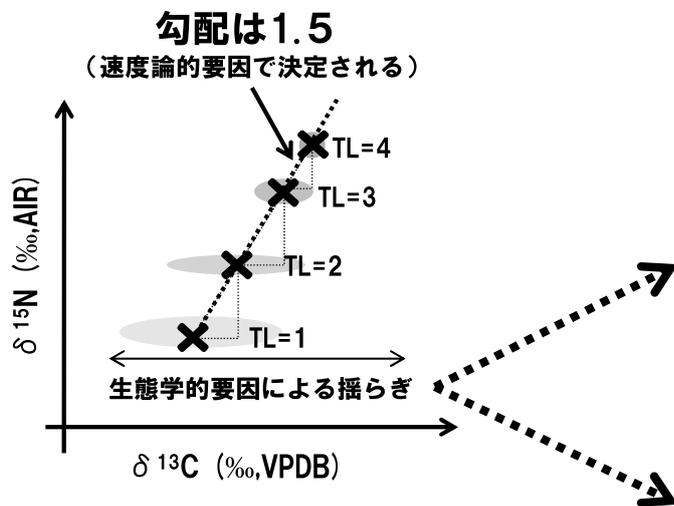
2) 生態学的要因: ecological factor

以下のような生態学的要因は経験則2からのゆらぎを引き起こす。

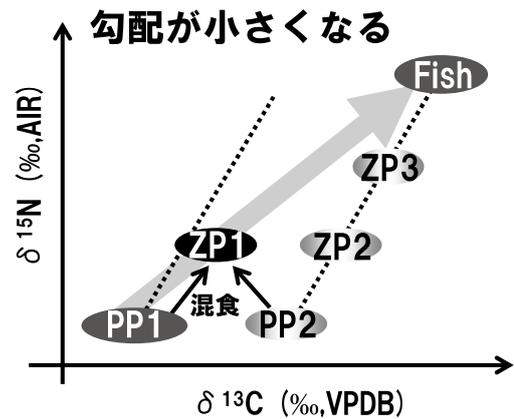
- 一次生産者がCとNを同化したときの, 季節的及び生息環境の違いによる生育速度の差異による同位体比の変動。
- 同位体比の異なる2種以上の藻類の増殖と食物網から食物網への複雑化。
- 従属栄養動物の混食。
- ライフサイクルによる脂肪含量の違い。

3) 試料採取の偏り

- 一次生産者の地域による違いのほか, この最後の因子(試料採取の偏り)がゆらぎをもたらす可能性はきわめて大きいと考えられる。図7にこの例を示した。たとえば植物プランクトンのブルーミングが発生していない時には植物の $\delta^{13}\text{C}$ 値が低くなるためブルーミング時のみ高い $\delta^{13}\text{C}$ 値が混合して勾配が小さくなる傾向が見られたり(図7の例1), 同化/異化比が変化した動物プランクトンの脂質含量が増え $\delta^{13}\text{C}$ 値が低くなり勾配が大きくなる傾向が見られたり(図7の例2)



例1) ブルーミングが発生した時
 $\delta^{13}\text{C}_{\text{blooming}} > \delta^{13}\text{C}_{\text{usual}}$



例2) 異化/同化比の変動
 (季節に伴う生息環境や脂肪含量の変化)

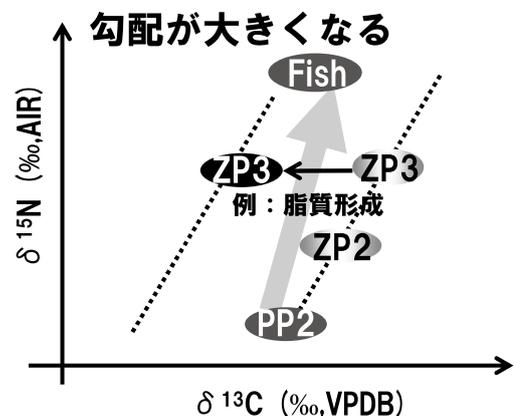


図7. SI予測モデルとそのゆらぎの例
 PP: 植物プランクトン, ZP: 動物プランクトン

する。このように一次生産者の炭素安定同位体比の数値が大きな幅を持つことから、安定同位体比による食物網の解析において原点となる一次生産者の炭素同位体比の数値の特定が困難となっている。これは植物プランクトンの組成のばらつきなどによりサンプルによるばらつきが大きく同位体比の平均値が得にくいことの一因があると考えられる。また、植物プランクトンではブルーミングのような短期間のタイミングのずれでも同位体比が変動し、食物網に沿ってタイムスケールをあわせた試料採取が極めて困難であることも一次生産者の炭素同位体比のばらつきの要因と考えられる。

ここに述べたような試料採取の不完全さも含めた生態学的要因が見かけ上の勾配のゆらぎの原因となる。

再現性

同一の窒素・炭素安定同位体比を持つ餌を食べた時の捕食者の器官の同位体比の再現性を確かめることが必須条件となる。図6はこの目的で16匹のラットを特注の同位体比の均一化過程を経たペレット試料で3ヶ月飼育

後(通常1月で親になる)各臓器の窒素・炭素安定同位体比を測定した結果である。個体の違いを超えて各器官がほぼ一定の値を示すことがわかる。ただし飼育実験で摂餌過程における濃縮係数を求め、これを自然生態系と比較する場合、飼育される動物の生理状態(例えば同化/異化の比率)が似ている必要がある。餌の選択にもこの点での注意が必要となる。餌にC4系のもの(例えばトウモロコシ)をまぜると餌のアミノ酸分子内の同位体比が変わることに注意されたい。このため、自然界でC3植物系(C4植物と異なり光合成過程にカルビン-ベンソン回路のみを持つ植物群)が主体となる海洋生態系に属する生物を対象とした実験を行う際に、飼育実験でトウモロコシなどのC4植物をまぜた飼料を使うと、分子内同位体比の分布の違いにより、自然界での被食-捕食関係で起こる $\delta^{13}\text{C}$ 値の変化とは異なった結果となる可能性がある。この点はこれまでに軽視されてきたが、今後の研究の要点となるであろう。また飼育に際しては対象とする動物の成長速度が自然界のものに近い状態にすることが必要となる。この点に関しては今後更なる検討が必要となる。

MIZUTANI *et al.*³²⁾は、上野動物園に餌として搬入されたサバの安定同位体比を3年間に渡って調べ、 $\delta^{15}\text{N}$: 9.5 ± 1.0 (n=7), $\delta^{13}\text{C}$: -20.1 ± 1.2 (n=19)の結果を得、 $\pm 1\%$ の幅で変動していることを明らかにした。一方、自然界ではその生活史や生育環境によって大きく炭素安定同位体比が変動することが知られている。その例を図8に示した。以下に同種でも炭素安定同位体比が大きく変動したことを観察した研究例を示す。

- i) ナンキョクオキアミ：元東大海洋研究所の川口浩一教授が昭和基地で越冬した際1年にわたって採取した和名コオリオキアミ (*Euphausia crystallorophias*), 英名 Ice krill, Antarctic coastal krill である。冬季にはアイスアルジーと浮遊性植物プランクトン食の二つのグループがあるため、このように炭素同位体比がばらついたと思われる。
- ii) 諏訪湖のフナ (*Carassius auratus*)：4m×4mの四手網で同時に捕獲したほぼ同じ体長からなる試料である。それらの炭素同位体比は個体ごとに大きく異なった。これは水草周辺で各個体の採取域が極めて狭い餌の $\delta^{13}\text{C}$ 値が異なる範囲で生育したためと示唆される。海では藻場がこのような環境となる。すなわち光条件や流速の差異によって植物の炭素同位体比がヘテロな値となっている。
- iii) ヨコエソ (*Sigmops gracile*)：相模湾表層から数100mにかけて採取した。ヨコエソは昼夜を通じ200～800mの幅広い水深に分布し³³⁾、多様な餌を捕食し³⁴⁾、その餌サイズも幅広いレンジにある³⁵⁾ことが知られており、個体による分布深度や餌生物に大きな差が生じ、炭素同位体比がばらついた可能性がある。
- iv) 諏訪湖のワカサギ (*Hypomesus nipponensis*)：春から夏にかけてアオコの増殖と連動した餌となるワムシ (輪形動物：Rotifera), ミジンコ (Cladocera), ユスリカ (Chironomidae) のさなぎなどの炭素同位体比が激しく変動し春から夏にかけて高くなる。
- v) 大槌で購入したサケ (*Oncorhynchus keta*)：体重3～6kgのサケ12個体について体長が大きくなるとよ

り高位の餌を食べるため炭素同位体比が変化したと思われる。

- vi) 蒲生干潟に生息するアシハラガニ (*Helice tridens*)：甲羅が大きくなると岩場やヨシハラに移動し炭素同位体比の変動が激しくなる。
- vii) 多摩川河口域に生息するアサリ (*Ruditapes philippinarum*)：春から夏にかけて高く、冬に低下する季節変化を示す。餌となる基礎生産者の生産速度の変化やアサリ自身のグリコーゲンの増減など体組成の変化が影響しているものと考えられる³⁶⁾。

上記の例は同種内での $\delta^{13}\text{C}$ 値が例外的に大きく変動する例であり、通常は、成長に伴って炭素同位体比が高くなり、成熟後ほぼ一定の値を示すことが知られている。これは成長に伴って餌の種類やサイズが変化することによるものと考えられる。種の同位体比を代表する値として安定した数値を使用するため、安定同位体法では通常成熟個体を採取して解析を行う。哺乳類では出生後母乳で育つためその影響はヒトで2年半、アザラシで1年³⁷⁾などが知られている。また、ヒトのひげの場合約2週間でその変化が出てくる³⁸⁾。大槌湾に放流されたサケの稚魚は湿重量1gになると湾内の餌に同調した値になる (和田私信)。

植物プランクトンの採取法と同位体比

植物プランクトンの炭素安定同位体比 ($\delta^{13}\text{C}$) は生育速度の関数である。一般に、生育速度は水温、光強度、栄養塩濃度、細胞の形によって変化するが、前三者が大きな因子となる。生育速度が速くなると細胞内への CO_2 の供給が炭酸固定を律速し、 $\delta^{13}\text{C}$ 値は高くなる。弱光で温度が低いと生育速度が遅くなり $\delta^{13}\text{C}$ 値は低くなる。したがって海では表層から有効層下部に向かって植物プランクトンの $\delta^{13}\text{C}$ 値は低くなる。また北から南に向かって表面水温 (SST) が高くなり、生育がよくなるため、その $\delta^{13}\text{C}$ 値は高くなる。春のブルームではChl. aのピークに向かって $\delta^{13}\text{C}$ 値は高くなり、以後低下する。ブルームの時期10日間天気が悪いと $\delta^{13}\text{C}$ 値はそれほど高くなれない。すなわち植物プランクトンの炭素同位体比は時空間に変化が激しく (タイムスパン1週間)、その時間積分平均値を出すためには、毎週採水と分別作業をすることが要求される。

一方、植物プランクトンの窒素安定同位体比 ($\delta^{15}\text{N}$) は $\delta^{15}\text{N}$ (NO_3) 値とその濃度によって決まる。西部北太平洋高緯度の硝酸濃度が $10\mu\text{M}$ を超える場合、表層の植物プランクトンは約3%程度で鉛直方向に向かって、有光層下部で $\delta^{15}\text{N}$ 値は低くなる。したがって、植物プランクトンが過去の一定期間に蓄積し平均化されてきた同位体比を知るためには毎日時空間的に必要十分な試料採取とソーティングが必要となるが、ほぼ不可能である。このため、植物プランクトンより栄養段階が高位に位置する動物の同位体比から外挿して求めることが次

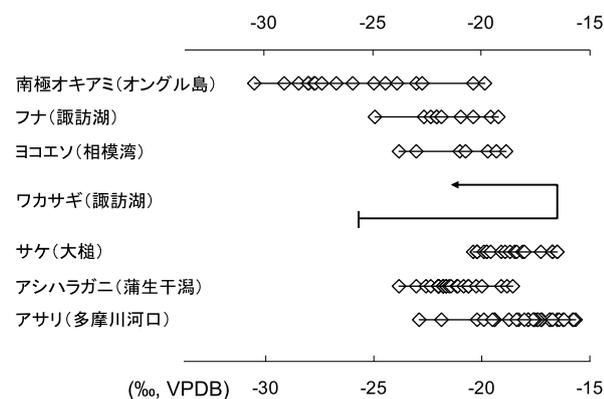


図8. 各種動物の $\delta^{13}\text{C}$ 値の変動幅

善の策となる。ただし、外挿値の妥当性を検証するため、現場の植物プランクトンで構成される懸濁態有機物 (POM) の同位体比は可能ならば取得することが望ましい。

酸処理

海水中には約 2mM の無機炭酸が含まれるため、酸処理を行い、無機炭酸塩を除くのが一般的である。中央水研では GF/F フィルター試料は、60℃で一晩以上乾燥させた後、HCl を入れたデシケーター内で3時間以上塩酸蒸気にさらす。あるいはフィルターに試料を集めた後、NaCl 等張溶液で洗浄する。先に述べた同位体効果は筋肉を構成するタンパク質の合成で起こると仮定し、筋肉の同位体比がそれぞれの生体の同位体比を代表するものとして得られた経験則をもとに食物網構造を推定するので、試料はターンオーバータイムの異なるキチン、髪の毛、血液などを除いた値を得ることが求められる。このため、酸処理によって失われる可溶性分画の損失は気にする必要はない。堆積物の処理でも同様に考えるが、後述のように同化される有機物はトータルの堆積有機物と同位体比が異なることに注意されたい。

脱脂処理について

安定同位体による食物網解析にはタンパク質の $\delta^{13}\text{C}$ 値を知ることが求められる。しかし脂質の炭素同位体比は有意に低いため^{39,40)}、この影響を除くために脱脂を行う。特に海洋においては、魚類の餌料として重要とされる冷水域のカイアシ類や、深層に生息するハダカイワシ科魚類など体に非常に多量の脂質を蓄える生物種が多く存在するため、安定同位体を用いてこのような生物を取り巻く食物網構造を高い精度で検証するために脂質含量を考慮することは重要となる。

- 1) 従来法：クロロホルム：メタノール (2:1) 液 4mL を 0.01 ~ 0.02g の試料に加え攪拌。5分間遠心分離し上澄み液を捨てる。この操作を2回繰り返す。その後 50℃で乾燥。

- 2) OHKOUCI *et al.*⁴¹⁾ の手法：均質化した乾燥試料 2mg 程度をマイクロチューブにいれ、特級メタノールを 1mL、ジクロロメタン：メタノール (7:1) 1mL、ジクロロメタン：メタノール (10:1) 1mL の順に添加。各溶液を添加後 20 分間の超音波抽出と 10,000 回転で 5 分間遠心分離し、上澄みを捨てる。残った試料を 60℃で乾燥。

図9に多摩川河口で採取したアサリの $\delta^{13}\text{C}$ 値について、未脱脂-脱脂の比較を示した。脱脂によって $\delta^{13}\text{C}$ 値が有意に高くなっていることが分かる。

キチン質の除去について

甲殻類は水圏の生態系を構成する生物としてきわめて生物量が多く、多くの甲殻類 (エビ、カニなど) が水産重要種となっているばかりでなく、動物プランクトンや小型ベントスとしてほとんどの水産資源の重要な餌料となっており、水圏生態系において甲殻類を経由しない食物網構造はきわめてまれであると言える。したがって、多くの生態系構成種がキチン質の殻を持つあるいはそれを捕食することとなるので、キチン質が同位体比にもたらす影響について考察する必要がある。

- 1) NICOL *et al.*⁴²⁾ はオキアミの場合、キチンは全体の 2.4 ~ 2.7% (乾重量, 平均 2.6%) (1) と報告した。またツノナシオキアミ (*Euphausia pacifica*) とナンキョクオキアミ (*Euphausia superba*) のタンパク質含量は 70% である (2)。
- 2) SCHIMMELMAN *et al.*⁴³⁾ はアルテミア (*Artemia salina*) を例としてタンパク質に比べキチン質の窒素同位体比は約 10‰, 炭素同位体比は 2‰低くなることを報告している (3)。

上記をまとめると

- オキアミの例：一般的なタンパク質の窒素含量 16% (4)
- (2), (4) より Protein 70% × 0.16 = 11.2% (Protein-N の値) (5)
- さらに Chitin: ($\text{C}_8\text{H}_{13}\text{NO}_5$)_n, N は 7.3% (6) である

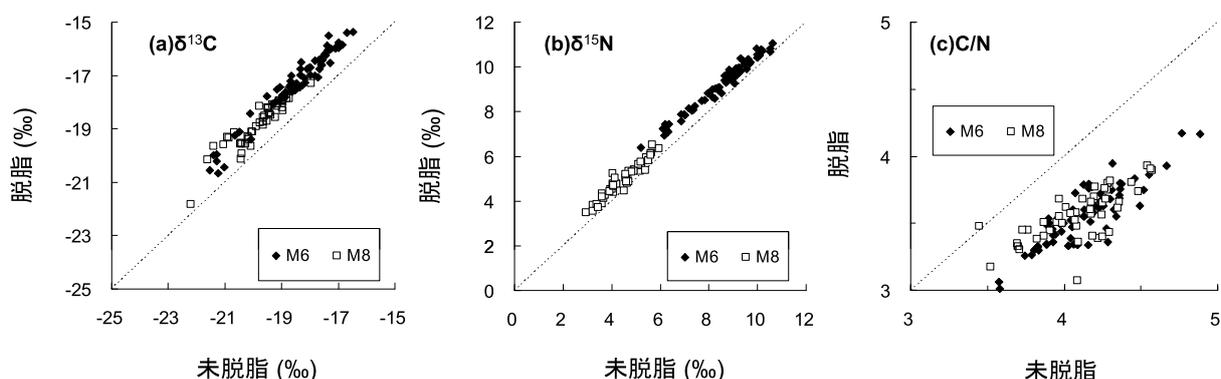


図9. 多摩川河口域のアサリの未脱脂-脱脂の同位体比比較 (児玉, 未発表)

ことから

(1), (6) より Chitin タンパク質の N 量は $2.6\% \times 0.073 = 0.19\%$ (7)

- アルテミアの同位体のデータ (筋肉 5.0%, (3) より Chitin-N は 5-10=5%) を利用して, (5), (7) よりタンパク質キチンの N の割合から加重平均を取り試算すると

$5\% \times (11.2/11.39) + (-5)\% \times (0.19/11.39) = 4.84\%$
 $\delta^{15}\text{N}$ 値は 0.16% 低くなるが, 測定の誤差範囲以内と見てよく, 殻を除かなくとも大きな誤差にはならない。したがってオキアミ類の試料はキチンを除かなくとも大きな誤差にはならないと結論される。一方, 炭素に関しては, SI サイエンス(株)の佐藤理恵氏 (未発表) が市販のクルマエビ属について筋肉と殻の部分測定し, 殻の $\delta^{15}\text{N}$ 値は 8~10% 筋肉より低く, $\delta^{13}\text{C}$ 値が 2% 程度低いことを見だし, キチンを分離しなくとも同位体比には大きな影響を及ぼさないと考えられる。

浮遊性 POM と底泥有機物の関係

河口付近の生態系について KIKUCHI and WADA⁴⁴⁾ による七北田川河口のゴカイ類 (*Hediste* spp.) や見玉ら³⁶⁾ による多摩川河口のアサリ, 孵化場から放流後大槌湾で成育したサケの稚魚のデータ (和田私信) をもとに, 生体の安定同位体比と環境中の底泥の安定同位体比の差をとると, 食物網の起源と想定される底泥有機物との同位体比の差は生物種によってばらつきがあることが認められた。特にアサリでは底泥に比べて炭素同位体比が数% 高く, 一方窒素は 1% 未満の差であった。七北田川のゴカイ類の炭素安定同位体比には差が無く, 窒素同位体比は 1% 強高かった (表 1)。このばらつきに理由については水温, 底質など環境の違いや取り込む有機物の種間相違など様々な要因が考えられ, 今後の研究が必要となる。このような複雑な生態系においても安定同位体比データが蓄積されることにより, 河口や内湾など陸上生態系と海洋生態系の境界領域となる極沿岸域の生態系構造を把握する有効な指標となり得る。

今後の展望

- 1) Amino Acid Trophic Level (ATL) 推定法²⁴⁾ という新しい方法が海洋研究開発機構 (JAMSTEC) の大河内直彦氏のグループによって提案された。すなわち

表 1. 底泥有機物と捕食者の窒素・炭素同位体比の差。

場所	対象生物	$\Delta \delta^{13}\text{C}$ (‰)	$\Delta \delta^{15}\text{N}$ (‰)
多摩川河口*	アサリ	+3.8	+0.5
多摩川河口上流*	アサリ	+2.9	-1.6
七北田川河口	ゴカイ	+/- 0	+1.5
大槌湾	サケ幼魚	+0.6	-2.3

Δ : δ 捕食者 - δ 底泥有機物

動物試料のアミノ酸 $\delta^{15}\text{N}$ を使って TL を一義的に決める方法が開発されている。

一次生産者の $\delta^{15}\text{N}$ を動物試料から復元でき計算は以下の式で行う。

TL を動物試料だけで計算できる (アミノ酸 TL; ATL):
動物の ATL = (動物 $\delta^{15}\text{NGlu}$ - 動物 $\delta^{15}\text{NPhe} + 3.4$) / 7.6 + 1

Glu はグルタミン酸, Phe はフェニルアラニン, 3.4 は一次生産者 $\delta^{15}\text{NGlu}$ と $\delta^{15}\text{NPhe}$ の差, 7.6 は捕食あたりの $\delta^{15}\text{N}$ 濃縮率である。

このような TL を正確に決定する手法を検証するためには天然の複雑な生態系に属している生物ではなく, 飼育下において既知の同位体比の餌のみで数段階の栄養段階の得られる系が必要であり, 栽培養殖技術と連携した研究の取り組みも試みられている。

2) ISOSCAPES (同位体地図)

ISOSCAPES は Isotope Landscape の意味である。安定同位体による食物網の解析手法を広域に適用するために, 時空間的に平均化された一次生産者 (Primary Producer) の同位体地図 (PP-ISOSCAPES) の作成が最も重要なポイントとなる。AITA *et al.*²⁶⁾ で導き出した $\Delta \delta^{15}\text{N} / \Delta \delta^{13}\text{C}$ の一定の共通式 (経験則 2) は TL=2 以上の動物から導き出しているため, 年に及ぶタイムスパンが長い生物の食物網において有用な一般式となる。したがって, 一次生産者 = 植物プランクトンの安定同位体比は, このタイムスパンに対応した積分平均値として PP-Isoscapes を作成する必要がある。一次生産者の $\delta^{13}\text{C}$ 値及び $\delta^{15}\text{N}$ 値は, 栄養塩の季節変化や種構成, 生物生産を含めた物質循環に依存して変化するため, $\delta^{15}\text{N}$ に比べ $\delta^{13}\text{C}$ は特に現場環境下で測定することは難しく, 観測誤差が大きい。そこで, i) 観測と経験則 2 からの見積もり, ii) 数値モデルによる推定を併用する。具体的には, 安定同位体比, 理論モデル, 衛星データ解析を統合させ, 海洋域における PP-ISOSCAPES を作成する。例えば, 藻類の $\delta^{13}\text{C}$ は生育速度の関数であるが, 光律速のない表層の藻類については水温 (SST) から炭素同位体比が求められる。一方, 硝酸塩濃度と $\delta^{15}\text{N}$ の関係式を導き, 硝酸塩取り込みモデルを構築して $\delta^{15}\text{N}$ 値を見積もる。これにより, 地球上の様々な海域や時期においてそれぞれの栄養段階における生物の安定同位体比が推定できる。その結果必ずしも生態系構成生物を網羅するような同位体比測定標本のサンプリングができなくても研究対象生物の同位体比を測定すればその生物の栄養段階や食性を見積もることや, その生物が属する生態系の特徴 (エンドメンバーの組成や生物生産速度など) を把握することが可能となると考えられる。このように安定同位体-海洋生態系食物網学の新しい展開や, 海域間を移動する魚類などの高次捕食者成長モデルの動態検証に向けた新しい研究の発展が期待できる。生物地理学的なこの種の図が得られれば, 安定同位体を用いた海洋生態系の食物網モデルを北太平洋全域に拡大することが可

能となるであろう。将来は ATL も加味した、より高度化した安定同位体個体群動態モデルの構築も視野に入ってくるであろう。

PP-ISOSCAPES が完成すれば研究対象とする生物種（水産重要種など）を取り巻く食物網の様々な生物の安定同位体比をすべて分析することなく、水温等の環境情報といくつかの同位体比データを組み合わせることにより、研究対象種の属する食物網構造をかなり高い精度で類推することが可能となると期待される。そのために、現在安定同位体比データを取得している研究者間のネットワークを密にし、安定同位体比の実測データを環境データとともに蓄積していくことが不可欠となる。

文 献

- 1) BEFRENFELD M.J., E. BOSS, D.A. SIEGEL, and M. SHEA (2005) Carbon-based ocean productivity and phytoplankton physiology from space. *Glob. Biogeochem. Cyc.*, **19**, GB1006, doi:10.1029/2004GB002299.
- 2) ALVAIN, S., C. MOULIN, Y. DANDONNEAU and H. LOISEL (2008) Seasonal distribution and succession of dominant phytoplankton groups in the global ocean: A satellite view. *Glob. Biogeochem. Cyc.*, **22**, GB3001, doi:10.1029/2007GB003154.
- 3) HIRATA, T. and R. BREWIN (2009) Phytoplankton community structure from space. *GLOBEC International Newsletter*, **15**, 5-6.
- 4) OKAMOTO, S., T. HIRAWAKE and S. SAITOH (2010) Interannual variability in the magnitude and timing of the spring bloom in the Oyashio region. *Deep-Sea Res. II*, **57**, 1608-1617. doi:10.1016/j.dsr2.2010.03.005.
- 5) SUMATA, H., T. HASHIOKA, T. SUZUKI, N. YOSHIE, T. OKUNISHI, M.N. AITA, T.T. SAKAMOTO, N. OKADA and Y. YAMANAKA (2010) Effect of eddy transport on the nitroet supply into the euphotic zone simulated in an eddy-permitting ocean ecosystem model. *J. Mar. Sys.*, **83**, 67-83. Doi:10.1016/j.marsys.2010.07.002.
- 6) WADA, E. (2009) Stable isotope fingerprint. *Jpn. J. Ecol.*, **59**, 259-268.
- 7) 高井則之, 富永 修 (2008) 安定同位体比分析を始める人たちへ。安定同位体スコープで覗く海洋生物の生態, 恒星社厚生閣, 9-30.
- 8) TANAKA, Y., H. MINAMI, Y. ISHIHI, K. KUMON, T. EBA, A. NISHI, H. NIKAIIDO and S. SHIOZAWA (2010) Prey utilization by hatchery-reared pacific bluefin tuna larvae in mass culture tank estimated using stable isotope analysis, with special reference to their growth variation. *Aquaculture Sci.*, **58**, 501-508.
- 9) DUBOIS, S., F. ORVAIN, J.C. MARIN-LEAL, M. ROPERT and LEFEBVRE S. (2007) Small-scale spatial variability of food partitioning between cultivated oysters and associated suspension-feeding species, as revealed by stable isotopes. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **336**, 151-160.
- 10) HOERING, T. C. 1955. Variations of nitrogen-15 abundance in naturally occurring substances. *Science* **122**, 1233-1234.
- 11) MIYAKE, Y. and E. WADA (1967) The abundance ratio of $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ in marine environments. *Rec. Oceanogr. Works Jap.* **9** (1), 37-53.
- 12) DENIRO, M.J. and S. EPSTEIN (1981) Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **45**, 341-351.
- 13) MINAGAWA, M. and E. WADA (1984) Stepwise enrichment of ^{15}N along food chains: further evidence and the relation between ^{15}N and animal age. *Geochim Cosmochim Acta*, **48**, 1135-1140.
- 14) WADA, E. and A. HATTORI (1991) Nitrogen in the sea: forms, abundances and rate processes. CRC Press, Florida, U.S.A. 224p
- 15) FRY, B. and E.B. SHERR (1984) ^{13}C measurements as indicators of carbon flow in marine and fresh water ecosystems. *Contr. Mar. Sci.*, **27**, 13-47.
- 16) RAU, G.H., A.J. MEARNNS, D.R. YOUNG, R.J. OLSON, H.A. SCHAEFER and L.R. KAPLAN (1983) Animal $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ correlates with trophic levels in pelagic food webs. *Ecology*, **64**, 1314-1318.
- 17) DENIRO, M.J. and S. EPSTEIN (1978) Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **42**, 495-506.
- 18) MCCONNAUGHEY, T. and C.P. MCROY (1979) Food-Web structure and the fractionation of carbon isotopes in the Bering Sea. *Mar. Biol.*, **53**, 257-262.
- 19) SUGISAKI, H., M. TERAZAKI E. WADA and T. NEMOTO (1991) Feeding habits of a pelagic amphipod, *Themisto japonica*. *Mar. Biol.* **109**, 241-244.
- 20) SUGISAKI, H. and A. TSUDA (1995) Nitrogen and carbon stable isotopic ecology in the ocean: The transportation of organic materials through the food web. In: SAKAI, H. and Y. NOZAKI (Eds.), Biogeochemical processes and ocean flux in the western Pacific, Terra Scientific Publishing Company (TERRAPUB), Tokyo, 307-317.
- 21) MATTHEWS, D.E. and J.M. HAYS (1978) Isotope-ratio-monitoring gas chromatography mass spectrometry. *Anal. Chem.* **50**, 1465-1473.
- 22) MINAGAWA, M., S. EGAWA, Y. KABAYA and K. KARASAWA-TSURU (1992) Carbon and nitrogen isotope analysis for amino acids from biological sample. *Mass Spectroscopy*, **40**, 47-56.
- 23) DEGENS, E.T., M. BEHRENDT, B. GOTTHARDT and E. REPPMANN (1968) Metabolic fractionation of carbon isotopes in marine plankton-II. Data on samples collected off the coasts of Peru and Ecuador. *Deep-Sea Res.*, **15**, 11-20.
- 24) 力石嘉人・柏山祐一郎・小川奈々子・大河内直彦 (2007) 生態学指標としての安定同位体：アミノ酸の窒素同位体分析による新展開. *RADIOISOTOPES* **56**:463-477.
- 25) CHIKARAISHI, Y., Y. KASHIYAMA, N.O. OGAWA, H. KITAZATO and N. OHKOUCHI (2007) metabolic control of nitrogen isotope composition of amino acids in macroalgae and gastropods: implications for aquatic food web studies. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **342**, 85-90.
- 26) AITA, M.N., K. TADOKORO, N.O. OGAWA, F. HYODO, R. ISHII, S.L. SMITH, T. SAINO, M.J. KISHI, S. SAITOH and E. WADA (2011) Linear relationship between carbon and nitrogen isotope ratios along simple food chains in marine environments, *J. Plankton Res.*, **33** (11), 1629-1642. doi:10.1093/plankt/fbr070
- 27) MEARNNS, A.J. (1982) Assigning trophic levels to marine animals. In W. BASCOM (Ed.), Coastal Water Research Project, Biennial Report for the years 1981-1982, Southern California Coastal Water Research Project, Long Beach, California, U.S.A.,

- 125-141 pp.
- 28) WADA, E., M. MINAGAWA, H. MIZUTANI, T. TSUJI, R. IMAIZUMI and K. KARASAWA (1987) Biogeochemical studies on the transport of organic matter along the Otsuchi River watershed, Japan. *Est. Coast. Shelf Sci.* **25**: 321-336.
- 29) 和田英太郎, 辻 堯, 南川雅男, 水谷 広, 今泉励子, 柄沢亨子 (1983) 大槌川水系における有機物輸送の研究－生物地球化学的モデル場の確立. 大槌臨海研究センター報告 **9**, 17-34.
- 30) 和田英太郎, 水谷 広, 柄沢亨子, 蒲谷裕子, 南川雅男, 米本昌平, 辻 堯 (1984) 大槌水系における有機物の挙動－炭素・窒素同位体比からの評価－. 地球化学 **18** (2), 89-98.
- 31) WADA, E., R. ISHII, M.N. AITA, N.O. OGAWA, A. KOHZU, F. HYODO and Y. YAMADA (2013) Possible ideas on carbon and nitrogen trophic fractionation of food chains in lakes Baikal, Biwa, and the Mongolian grasslands: A new aspect of food-chain stable isotope analysis. *Ecol. Res.* **28**, 173-181.
- 32) MIZUTANI, H., Y. KABAYA, and E. WADA (1991) Nitrogen and carbon isotope compositions relate linearly in cormorant tissues and its diet. *Isotopenpraxis* **27**, 166-168.
- 33) SASSA, C. and K. KAWAGUCHI (2006) Occurrence patterns of mesopelagic fish larvae in Sagami Bay, central Japan. *J. Oceanogr.* **62**, 143-153.
- 34) UCHIKAWA, K., O. YAMAMURA and Y. SAKURAI (2001) Feeding habits of the mesopelagic fish *Gonostoma gracile* in the Northwestern North Pacific. *J. Oceanogr.* **57**, 509-517.
- 35) LANCRAFT, T.M., T.L. HOPKINS and J.T. TORRES (1988) Aspect of the ecology of the mesopelagic fish *Gonostoma elongatum* (Gonostomatidae, Stomiiformes) in the eastern Gulf of Mexico. *Mar. ecol. Prog. Ser.* **49**, 27-40.
- 36) 児玉真史, 渡部諭史, 八木 宏, 灘岡和夫, 鈴木紀慶, 古殿太郎 (2011) 多摩川河口域に生息する二枚貝類の炭素・窒素安定同位体比の変動特性. 土木学会論文集B2 (海岸工学) **67**, I-961-965.
- 37) YOSHII, K., N.G. MELNIK, O.A. TIMOSHKIN N.A. BONDAREMKO, P.N. ANOSHKO, T. YOSHIOKA and E. WADA (1999) Stable isotope analyses of the pelagic food web in Lake Baikal. *Limnol. Oceanogr.* **44**, 502-511.
- 38) NAKAMURA, K., D.A. SCHOELLER, F.J. WINKLER, H.-L. SCHMIDT (1982) Biomedical Mass Spectrometry. 390 pp.
- 39) DENIRO, M.J. and S. EPSTEIN (1977) Mechanism of carbon isotope fractionation associated with lipid synthesis. *Science*, **197**, 261-263.
- 40) MONSON, K.D. and J.M. HAYES (1982) Carbon isotopic fractionation in the biosynthesis of bacterial fatty acids. Ozonolysis of unsaturated fatty acids as a means of determining the intramolecular distribution of carbon isotopes. *Geochim Cosmochim Acta*, **46**, 139-149.
- 41) OHKOUCHI, N., K. KAWAMURA, H. KAWAHATA and A. TAIRA (1997) Latitudinal distributions of terrestrial biomarkers in the sediments from the Central Pacific. *Geochim Cosmochim Acta*, **61**, 1911-1918.
- 42) NICOL, S., G.W. HOSIE (1993) Chitin production by krill. *Biochem. Sys. Ecol.* **21**, 181-184.
- 43) SCHIMMELMAN, A., P. LAVENS, P. SORGEOLOS (1987) Carbon, nitrogen, oxygen, and hydrogen-stable isotope ratios in *Artemia* from different origin. In: P. SORGEOLOS, D.A. BEGTSON, W. DECLEIR, and E. JASPERS (Eds) *Artemia Research and Its Applications*. Vol.1. Morphology, Genetics, Strain Characterization, Toxicology. Univers Press, Wetteren, Belgium. 380 pp.
- 44) KIKUCHI, E. and E. WADA (1996) Carbon and nitrogen stable isotope ratios of deposit-feeding polychaetes in the Nanakita River Estuary, Japan. *Hydrobiologia* **321**, 69-75.