

リバーラジオアイソトープ標識法—天然放射性炭素 14 を活用した水生生物の硬組織・軟組織の炭素源推定法の提案—

西田 梢^{*1}
Nishida Kozue

横山 祐典^{*2,3}
Yokoyama Yusuke

宮入 陽介^{*2}
Miyairi Yosuke

平林 頌子^{*2,4}
Hirabayashi Shoko

1. はじめに

産業革命以降、人間活動による二酸化炭素排出によって大気・海洋中の二酸化濃度は増加を続けており、地球温暖化や海洋酸性化が進行している¹⁾。このような環境変動は、海洋生物の生存や成長、繁殖や生理代謝へ深刻な影響を及ぼす可能性が指摘されており¹⁾、生物飼育実験や野外観察によって環境変動が将来の生物に与える影響を評価する必要がある。今回、筆者らの研究²⁾では、環境影響評価のための生物飼育実験に活用できる新たな炭素源推定法として「リバーラジオアイソトープ標識法」を提案し、海洋酸性化が二枚貝類の生理代謝へ及ぼす影響の評価を行った。この標識法は、多様な生物の硬組織・軟組織の炭素源推定に活用でき、更に、様々な生物実験系に応用が可能である。本稿では、本手法の特徴や貝類を活用した研究成果²⁾について紹介したい。

2. リバーラジオアイソトープ標識法

本研究では、放射性炭素 14 (¹⁴C) 測定に特化したシングルステージ加速器質量分析装置 (図 1) の分析技術の高精度化³⁾を実現することで、新しい標識法の提案に至った。炭酸塩や水試料、有機物試料といった様々なサンプルの前処理方法や分析方法を検討したことで、安定して高精度な ¹⁴C 分析が可能となった。このような分析技術を基に、水生生物の硬組織・軟組織の炭素源推定方法として、「リバー



図 1 シングルステージ加速器質量分析装置
(東京大学大気海洋研究所)

ラジオアイソトープ標識法 (reverse radioisotope labelling)」を提案した。

現在の大気の ¹⁴C 濃度はモダンカーボンと呼ばれている。1950 年代に行われた大気圏核実験による人為起源の ¹⁴C により、大気中の ¹⁴C 濃度は急激に上昇した。そのため、自然環境の様々な生物試料の ¹⁴C レベルは高くなっている。

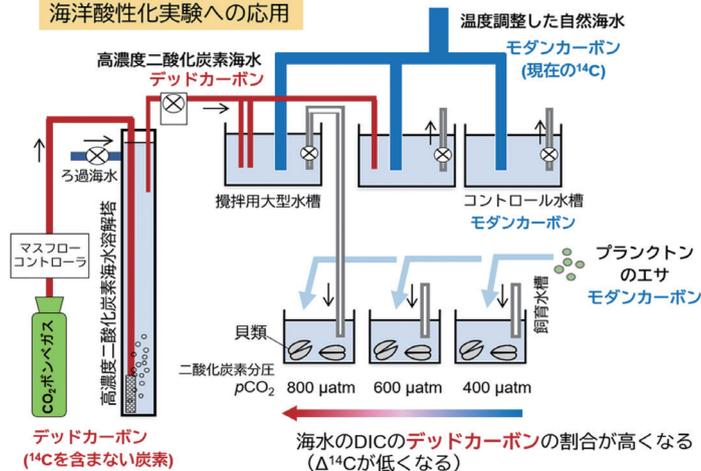
放射性炭素 14 の天然存在比 ($\Delta^{14}\text{C}$) は 1950 年の大気中 CO_2 の ¹⁴C 同位体比との差を千分率で表した値で、以下の式により求められる⁴⁾。

$$\Delta^{14}\text{C} = \delta^{14}\text{C} - 2 \times (\delta^{13}\text{C} + 25) (1 + (\delta^{14}\text{C}/1000))$$

$$\delta^{14}\text{C} = ((A_s/A_{\text{abs}}) - 1) \times 1000$$

(A) 飼育海水へのデッドカーボン添加

海洋酸性化実験への応用



(B) エサ（プランクトン培養水槽）へのデッドカーボン添加

水温・塩分などの環境制御実験への応用

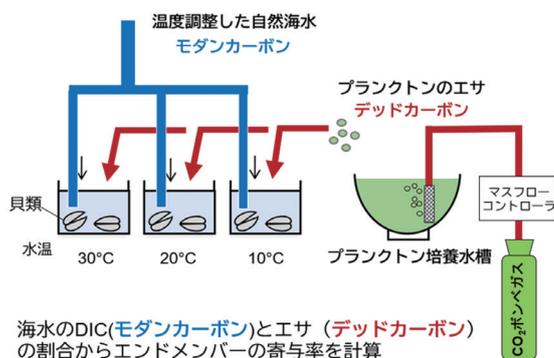


図2 リバースラジオアイソトープ標識法を活用した生物飼育実験の概要図

A. 海洋酸性化実験への応用例。二酸化炭素ガス（デッドカーボン）で標識した海水条件下で海洋生物を飼育し、海水のDIC（デッドカーボン）とエサ（モダンカーボン）の寄与率を計算。B. 水温・塩分等の環境制御実験への応用例。二酸化炭素ガス（デッドカーボン）を添加した水槽でエサのプランクトンを培養し、海水のDIC（モダンカーボン）とエサ（デッドカーボン）の寄与率を計算

A_s は試料の ^{14}C 濃度、 A_{abs} は標準 ^{14}C 初期濃度。 $\delta^{14}\text{C}$ 、 $\delta^{13}\text{C}$ には硬組織・軟組織形成に関わる種々の同位体分別が関わっているが、 $\delta^{14}\text{C}$ に見られる同位体分別は $\delta^{13}\text{C}$ での同位体分別の2倍という同位体間の相対質量差に基づいた仮定を置くことができる。上記の2式を用いることで、同位体分別効果を取り除いた、炭素起源の情報のみを記録する指標— $\Delta^{14}\text{C}$ が得られる⁴⁾。 $\Delta^{14}\text{C}$ は年代推定へ古くから広く活用されてきたが、近年では食物網解析や生体における炭素の滞留時間推定等、生態学や環境学、法医学といった多様な分野で応用研究が進んでいる^{5,6)}。 ^{14}C は5,730年を半減期として、窒素 ^{14}N に放射壊変する。そのため、過去数万年以前の炭素（例えば、石油・天然ガス等の化石燃料）には ^{14}C が含まれず、デッドカーボンと呼ばれている。今回提案したリバースラジオアイソトープ標識法では、海水に添加する化石燃料起源の二酸化炭素ガス（デッドカーボン）をトレーサとして用いることで、 ^{14}C 標識化合物を用いることなく、炭素源推定を可能にした(図2)。本研究²⁾で実施した海洋酸性化実験(図3)を例にすると、化石燃料起源の二酸化炭素が溶け込んだ酸性化海水では、海水の溶存無機炭素(DIC)は、デッドカーボンの影響により低い $\Delta^{14}\text{C}$ 値を示す(図2A)。このような海水のDICの $\Delta^{14}\text{C}$ 値が低い条件下で、現在の海水（モダンカーボン）で培養した

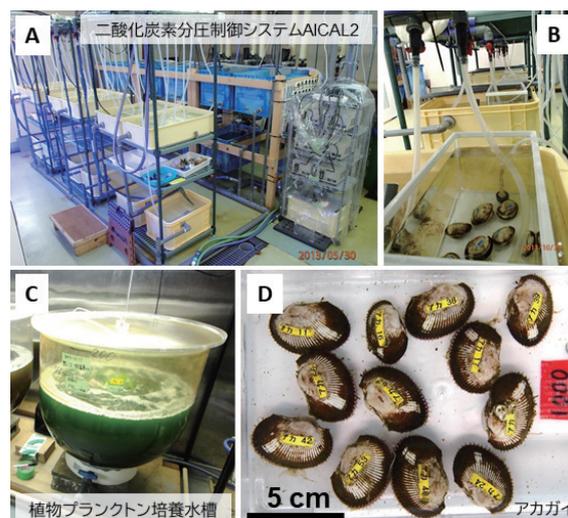


図3 貝類の酸性化実験の様子

A. 二酸化炭素分圧制御システム (AICAL2)。流式で大型の海洋生物の飼育が可能。B. アカガイ飼育水槽。C. 貝類のエサ（植物プランクトン）。D. 酸性化実験に使用した1歳のアカガイ個体

プランクトンのエサ(図3C)を給餌して生物を飼育することで、硬組織や軟組織への海水やエサ起源の炭素寄与率が推定できる。また、この実験系とは逆に、化石燃料起源の二酸化炭素ガスをプランクトン培養水槽に添加した場合(図2B)は、モダンカーボンの自然海水とデッドカーボンの影響を受けたエサの $\Delta^{14}\text{C}$ 値から炭素源推定をすることも可能である。エサにデッドカーボン標識をした飼育実験の場合は、水温や塩分等の様々な環境制御実験への応用

できる可能性がある。

硬組織、軟組織、海水 DIC、エサの $\Delta^{14}\text{C}$ 値（それぞれ $\Delta^{14}\text{C}_{\text{carbonate}}$, $\Delta^{14}\text{C}_{\text{tissue}}$, $\Delta^{14}\text{C}_{\text{DIC}}$, $\Delta^{14}\text{C}_{\text{plankton}}$ ）と以下の式⁷⁾を基に、硬組織や軟組織への海水の DIC 由来の炭素源の寄与率 (R_{DIC}) が求められる。

$$\Delta^{14}\text{C}_{\text{carbonate}} = [R_{\text{DIC}} \times \Delta^{14}\text{C}_{\text{DIC}} + (100 - R_{\text{DIC}}) \times \Delta^{14}\text{C}_{\text{plankton}}] / 100$$

$$\Delta^{14}\text{C}_{\text{tissue}} = [R_{\text{DIC}} \times \Delta^{14}\text{C}_{\text{DIC}} + (100 - R_{\text{DIC}}) \times \Delta^{14}\text{C}_{\text{plankton}}] / 100$$

また、エサ由来の炭素の寄与率 (R_{feed}) は以下の式で求めることができる。

$$R_{\text{feed}} = 100 - R_{\text{DIC}}$$

我が国では「放射性同位元素等の規制に関する法律（昭和 32 年 6 月 10 日法律第 167 号）」に基づき、放射性同位元素 (RI) 標識化合物の使用の際には管理区域指定が義務付けられている。そのため、安全性の確保に労力やコストが必要であり、更に、 ^{14}C 標識物質の作製や購入にも費用がかかるという課題があった。一方、リバーラジオアイソトープ標識法では、天然に存在する二酸化炭素ガスを活用するため、安全かつ安価にどこでも標識実験を行える画期的な手法である。本研究では、この新規手法を海洋酸性化実験に取り入れ、我が国の重要な水産種の二枚貝類を用いた炭素源推定を実現した。

3. 貝類への応用研究：酸性化影響の評価

海洋に溶け込む二酸化炭素が増えることで海洋の pH 低下が起る海洋酸性化問題は、とりわけ貝類、サンゴ、棘皮動物、有孔虫等の炭酸カルシウムの殻を作る生物への深刻な影響が指摘されている¹⁾。2000 年代に注目されるようになった環境問題であり、気候変動に関する政府間パネル (IPCC) に取り上げられるようになったのも 2007 年からと、比較的新しい環境問題である。未だ生物への将来影響は十分に検証されていないため、生物多様性の保全や地域産業の持続的発展のために、二酸化炭素濃度を高くした飼育実験等を通じて、様々な海洋生物へ

の海洋酸性化影響を評価していく必要がある。

本研究²⁾では、海洋酸性化が貝類の生理代謝へ及ぼす影響の検証のため、リバーラジオアイソトープ標識法を活用した飼育実験により、日本の主要な水産重要二枚貝の 1 つであるアカガイ *Scapharca broughtonii* を対象種として (図 3D)、貝殻や軟体部形成に関わる炭素源推定を行った。生物飼育実験は、2013 年に海洋生物環境研究所 実証試験場 (新潟県柏崎市) にて高精度な二酸化炭素分圧制御システム AICAL2 を用いて実施した (図 3A, B)。本システムは本研究チームが独自開発した実験系で、二酸化炭素分圧 ($p\text{CO}_2$) を高精度に制御し、かつ、大量の海水をかけ流す方式により、貝類やサンゴ類、魚類等の大型の生物の飼育実験が可能である。このようなシステムを用いて、水温 25 °C 一定の条件下で、 $p\text{CO}_2$ を 463, 653, 872, 1,137, 1,337 μatm の 5 段階に設定してアカガイの酸性化実験を行った。飼育した貝類の炭酸塩殻・軟体部 (えら, 足), エサの植物プランクトン、海水試料をそれぞれサンプリングし、東京大学大気海洋研究所高解像度環境解析研究センターのシングルステージ加速器質量分析装置 (図 1) で放射性炭素分析を実施した。

$\Delta^{14}\text{C}$ から海水・エサ由来の炭素の寄与率を計算した結果、殻形成は海水の DIC が主な炭素源で、酸性化しても炭素源の寄与率は変化が見られなかった。一方、アサリを用いた先行研究⁸⁾では、酸性化すると石灰化量が低下し、殻形成におけるエサ由来の炭素の寄与率が増加する傾向が報告されている。アカガイは酸性化に対し殻形成で耐性のある種であり、アサリは脆弱な種である。したがって、このような殻形成に関わる炭素源の寄与率の違いは、海洋酸性化による生理応答の種間差が表れている可能性が考えられる。また、本研究では、これまで硬組織の炭素源推定に活用されてきた炭素安定同位体比 ($\delta^{13}\text{C}$) による炭素源推定⁹⁾も実施した。この結果、 $\delta^{13}\text{C}$ による見積りの場合、海水の DIC 寄与率が $\Delta^{14}\text{C}$ よりも 10% 程度低く見積もられることが明らかになった。アカガイの $\delta^{13}\text{C}$ による炭素源推定では、同位体分別効果の影響が表れている可能性が考えられるため、炭素源の計算に用いる際には注意が必要である。 $\Delta^{14}\text{C}$ による炭素源推定では、こういった殻の同位体分別効果を取り除くことができ、より高精度な見積もりが期待される。

4. 今後の展望

リバーラジオアイソトープ標識法は、天然に存在する二酸化炭素ガスを活用しているため、管理区域指定が必要な¹⁴C標識物質を用いた従来法よりも、安全、安価かつ汎用性の高い炭素源推定法である。この標識法を用いることで、地球環境問題による海洋環境変化に生物の生理代謝がどのように応答するのか、生物の炭素の取込みへの影響についてより正確に推定することが可能になる。将来の環境変化に対する生物の耐性を評価する上で重要な指標として期待され、今後は多様な海洋生物、様々な生物実験系（水温、塩分、酸性化実験等）での応用を行っていきたい。

参考文献

- 1) IPCC, In *The Physical Science Basis, Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, 1-1535,

- Cambridge Univ. Press (2013)
- 2) Nishida, K., *et al.*, *Methods in Ecology and Evolution*, **11**: 739-750 (2020)
- 3) Yokoyama, Y., *et al.*, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B*, **455**: 311-316 (2019)
- 4) Stuiver, M., & Polach, H. A., *Radiocarbon*, **19**: 355-363 (1977)
- 5) Zoppi, U., *et al.*, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B*, **223**: 770-775 (2004)
- 6) Ishikawa, N. F., *et al.*, *Ecological Research*, **28**: 759-769 (2013)
- 7) Adkins, J. F., *et al.*, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **67**: 1129-1143 (2003)
- 8) Zhao, L., *et al.*, *Science of the Total Environment*, **627**: 95-103 (2018)
- 9) McConnaughey, T.A., *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **61**: 611-622 (1997)

(*1 筑波大学生命環境系持続環境学分野, *2 東京大学大気海洋研究所, *3 東京大学大学院総合文化研究科, *4 立正大学地球環境科学部環境システム学科)