

安定同位体を用いた河川生態系の研究

京都大学名誉教授 和田英太郎

1. はじめに

安定同位体は化学的性質が似ており、生元素を含む化学反応においては、分子レベルの性質の僅かな差に伴う同位体効果が起こる。これは、水素、炭素、窒素、炭素などの生元素を含む化学反応の普遍的パラメーターであり、反応経路・反応機構に関する知見を与える。このため、この方法は以下に示したような特徴を示すことになる。

1) 自然界の生物及び生元素で構成される物質は、安定同位体の固有なフィンガープリントを持つようになる。生態システムや生体内のような複雑な反応のネットワークの中でも、同位体効果はネットワークの物質の出入りや経路、その構造に関する知見を与える。

2) SI (Stable Isotope) 法は、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。すなわち、SI 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り、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。

3) 生元素の存在比測定感度は 10^{-4} である。このため大気二酸化炭素の変動の変化 (10^{-3}) より一桁高い感度で環境の変化を検出することができる。

2. 同位体比 ($\delta^{13}\text{C}$ と $\delta^{15}\text{N}$) を用いた水系全体の構造に関する研究例

事例研究 1 汚濁の進んだ水系

生態系の有機物の生産者は植物である。同位体比の面から見ると、溪畔林を含む水系の C_3 植物は、大気中の二酸化炭素を利用する高等植物と水中の植物プランクトンに大別され、両者の同位体比は中緯度で有意に異なっている。沿岸の堆積物を $\delta^{15}\text{N}$ - $\delta^{13}\text{C}$ マップ上に目盛りをとると、人間活動の影響の小さい河川では、特に河口域内湾の堆積物の $\delta^{15}\text{N}$ は混合直線 (陸域 T- 海域 M) で示される。一方、水質汚濁の激しい河川の代表である淀川水系は図 1 に示したように直線から大きくずれてくる。ちなみに、 $\delta^{15}\text{N}$ の上昇は、水質汚濁の進行による集水域や湖・内湖水系での脱窒に起因しており、大阪湾で低下するのは、富栄養化で生じた藻類が無機窒素の一部を同化する時の同位体分別に

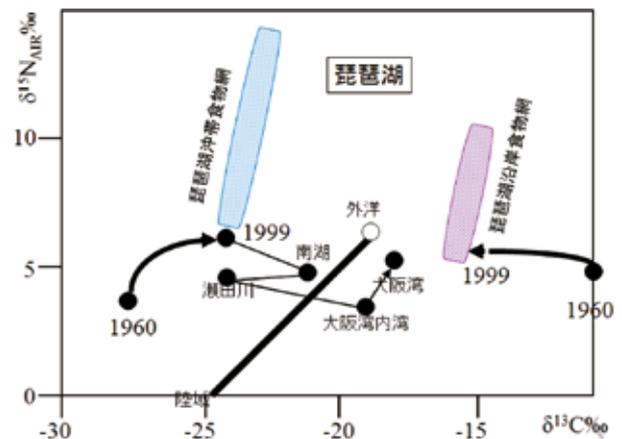


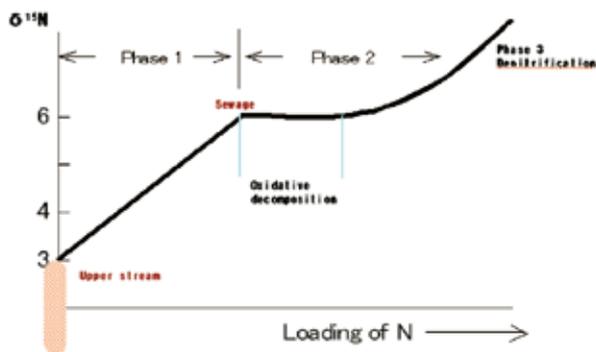
図 1. 琵琶湖・淀川水系の近過去 50 年誌河川堆積物の $\delta^{15}\text{N}$ - $\delta^{13}\text{C}$ マップと琵琶湖沖帯 (青) と沿岸 (赤) の食物連鎖

よるものと理解される。

近過去において著しく富栄養化が進行した琵琶湖では、この 40 年間の汚濁の進行状況は湖沼の堆積物や、固有魚イサザの生物標本資料が残されている。イサザ標本・堆積有機物の分析結果は、近過去の琵琶湖の窒素循環系の変化を浮き彫りにしていることが明らかとなった (Yamada *et al.*, 1998; Ogawa *et al.*, 2001; Wada *et al.*, 1987)。このように $\delta^{15}\text{N}$ - $\delta^{13}\text{C}$ マップ上に水系全体の構造を描きその特徴を浮き彫りにすることができる。

事例研究 2 新しい環境指標

湖の一次消費者や河川懸濁粒子が示す $\delta^{15}\text{N}$ は、集水域の人口密度と正の相関があることが知られている (図 2)。まず、人口密度が低い水系 (Phase I) において、人口密度と $\delta^{15}\text{N}$ は、ほぼ直線関係にある。一般に生活排水の $\delta^{15}\text{N}$ (約 6 ‰) は、森林起源有機物の値 (Ca. 0 ~ 1 ‰) に比べ高いことから、このフェーズでは両者の混合比により水系の $\delta^{15}\text{N}$ が決定される。より人口密度の高い水系 (Phase II) では生活排水の寄与が多くなり、水系への有機物付加が増加する。しかし、その殆どが酸化分解されるため、水系 $\delta^{15}\text{N}$ は生活排水の値近くで安定する。更に人口密度が高まると (Phase III)、栄養塩や有機物不可の増加に伴う水系での生物活動を活発化し、系内の酸化還元状態に乱れが起こり、底泥は局所的に無酸素状態になると考えられる。このことは硝化・脱窒反応を促進するこ



廃水の増加（人口増加）に伴う河川生態系の $\delta^{15}\text{N}$ の増加。高度化下水処理の負荷の大きい淀川では6から10permilにシフトする。

図2. 河川汚濁の新しい指標となる $\delta^{15}\text{N}$ と人口密度の関係

とで系の $\delta^{15}\text{N}$ を高める。このような水系では富栄養化が進み、水質は悪化すると予想され、温室効果ガスである N_2O やメタン、更には悪臭の原因となる硫黄化合物の発生を引き起こすことになる。Phase IIとPhase IIIの境界に当たる人口密度は、日本の小河川では百人/ km^2 程度と見積もられ、これは水系が持続的に維持される上限、すなわち一種の環境容量を表していると考えられる。これらの知見を得た蛇砂川は、琵琶湖東岸に位置する小河川で、丘陵から始まり、町を抜け、安土城跡の南側に位置する西の湖に注ぐ。この下流域は有機物に富む汚泥が堆積し、最下流域と西ノ湖堆積物は高い N_2O 放出能を示す。酸化還元境界層の層状構造は崩れ、堆積物表層は酸化部位と還元部位が入り子構造になり、そこに NO_3^- に富む水が流入し、脱窒がセミアネロビク（半嫌気条件下）で生起していることが NO_3^- -Nの濃度と NO_3^- -Nの $\delta^{15}\text{N}$ から推察された（Nishikawa et al., 2009）。この事実から、都市周辺の汚濁の進んだ小河川は N_2O が最終生成物となる脱窒系が駆動している可能性が高い。このような不均一場は自然界に多く、琵琶湖の $\delta^{15}\text{N}$ を高めたと考えられる。

事例研究3 食物連鎖と動物の栄養段階

我国で著しい進展のあった $\delta^{15}\text{N}$ 、 $\delta^{13}\text{C}$ を用いた窒素・炭素安定同位体精密測定法による食物網解析法の進捗について触れる。特に、食物連鎖に見出された窒素・炭素同位体効果に関する二つの経験則に注目し、近年の amino acid レベルの $\delta^{15}\text{N}$ に関する成果を考慮に入れて、その成立の境界条件を考察した。

経験則1：

栄養段階（TL）が1段階上がるごとに 筋肉の

$\delta^{15}\text{N}$ が高くなる事が過去の研究で示されている。この一定値増加の法則は、様々な生態系で広く認められ、経験則1としてまとめることができる。Minagawa and Wada (1984)は、動物の摂餌に伴う濃縮率（ $\Delta \delta^{15}\text{N}$ ）は、+1.3 ~ +5.3 ‰の幅を持ち、TLが1段階上がるごとに $\Delta \delta^{15}\text{N}$ は約 3.4 ± 1.1 ‰高くなる事を報告している、

$$\delta^{15}\text{N}_{\text{animal}} = 3.4 \pm 1.1 \times (\text{TL} - 1) + \delta^{15}\text{N}_{\text{plant}} .$$

アミノ酸の窒素同位体比

アミノ酸（Amino Acid, AA）レベルの $\delta^{15}\text{N}$ について、最近の知見をまとめると以下ようになる（Chikaraishi et al., 2011; Ohkouchi et al., 2015）。

①藻類（緑藻、褐藻類、紅藻類、藍藻）の各アミノ酸相互間の $\delta^{15}\text{N}$ の相対的変動は、似たパターンを示す。しかし、 C_3 植物、 C_4 植物のパターンは異なる。

②各アミノ酸の摂餌に伴う $\Delta \delta^{15}\text{N}$ は無脊椎動物（動物プランクトンや昆虫など）、魚類、哺乳類で同じ値となる。例えば、グルタミン酸（Glu）とフェニルアラニン（Phe）では、摂餌においてGluの $\delta^{15}\text{N}$ は一定の割合で高くなるがPheは変化しなく、

$$\Delta \delta^{15}\text{N}_{\text{Glu} - \text{Phe}} = 7.6$$

で表すことができ、アミノ酸（AA）法の栄養段階（TL）は、

$$\text{AATL}_{\text{animal}} = \frac{\delta^{15}\text{N}_{\text{Glu}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{Phe}} + 3.4}{7.6} + 1 ,$$

で計算できる。この式の定数‘3.4’は一次生産者のGluとPheの $\delta^{15}\text{N}$ の差‘1’はTL=1、すなわち一次生産者である。

一次生産者のアミノ酸の $\delta^{15}\text{N}$ について、その変動パターンは C_3 植物を通して類似性が高く、加えて、摂餌に伴う各アミノ酸の $\Delta \delta^{15}\text{N}$ は、それぞれ一定の値を持つことが示唆される。従って、自然界の食物連鎖に沿った動物のアミノ酸の $\delta^{15}\text{N}$ は、出発点となる一次生産者の各アミノ酸の $\delta^{15}\text{N}$ が決まれば、各アミノ酸の一定の濃縮率（ $\Delta \delta^{15}\text{N}$ ）から導き出すことが可能となると考えている。

3. 経験則2：海洋と陸域の代表的な食物連鎖について

窒素・炭素同位体効果の比（ $\Delta \delta^{15}\text{N} / \Delta \delta^{13}\text{C}$ ）が、動物の種類に関わらず、ほぼ一定であることが示唆されている。一般的に、食物連鎖に沿って $\delta^{15}\text{N}$ は $\delta^{13}\text{C}$ と統計的に有意な回帰直線の関係を示す（Aita et al., 2011; Wada et al., 2013）。

ここで、同位体マップ上で自然界の食物連鎖が

直線になる条件を、既存の知見を取り込みながら考察してみる。

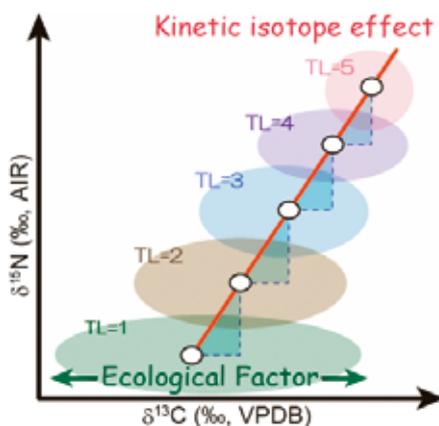
条件1：代謝マップのレベルにおける N/C 同位体効果は、食物連鎖上の全ての動物で同じである ($\Delta N/\Delta C = \text{一定}$)。

条件2：寿命が短く、生育速度によって N/C 同位体比の変動が激しい一次生産者の $\delta^{13}\text{C} \cdot \delta^{15}\text{N}$ は、ある時間幅で一定、あるいは、植食性動物の摂餌に伴う平均化 (均質化) する効果を考えに組み込む。

この2つの条件が成立すれば、食物連鎖は $\delta^{13}\text{C} - \delta^{15}\text{N}$ 同位体マップ上で、統計的に優位な回帰直線を引くことが可能となる。これを検証するために、Aita et al. (2011) は北太平洋亜寒帯域および南極海で、Wada et al., (2013) はモンゴル草原、琵琶湖およびバイカル湖の陸水域の同位体比データを用いて、各食物連鎖が持つ $\Delta \delta^{15}\text{N}/\Delta \delta^{13}\text{C}$ の違いについて共分散分析 ANCOVA (Analysis of covariance) を用いて統計的な検証を行った。その結果陸水域の食物連鎖については、

$\delta^{15}\text{N} = (1.61 \pm 0.41) \times \delta^{13}\text{C} + \text{各生態系の定数}$ が得られている。

海域や陸域といった地域の区分なく、各食物連鎖がもつ $\Delta \delta^{15}\text{N}/\Delta \delta^{13}\text{C}$ に大きな違いはない。つまり、地域性や生物 (動物) 種に関わらず、似通った $\Delta \delta^{15}\text{N}/\Delta \delta^{13}\text{C}$ をもっていることになる。この事実、「食う-食われる」の過程における炭素・窒素同位体効果の比が生物に関わらず普遍的に一定の値を示すことを示唆する (図3)。図1の琵琶湖の食物連鎖の直線は、この成果に基づいて模式化してある。実際の湖沼では、食物網が複雑であり、楕円は生態系の複雑さに伴う各栄養段階でのばらつきを示している。



摂餌過程における窒素・炭素同位体分別に関して各食物網を通して $\Delta \delta^{15}\text{N}/\Delta \delta^{13}\text{C}$ が一定の共通式で表せる

図3. 食物連鎖に沿った $\delta^{15}\text{N} - \delta^{13}\text{C}$ の直線関係

4. その他について

水系では、水の移動や温室効果ガス、硝酸イオンの起源などについて以下の同位体マップが使われている。

- ① 水の起源移動する考察：水素-酸素同位体マップを用いて、河川水の起源や蒸発の様子を調べることができる。
- ② NO_3 の起源：窒素-酸素同位体マップ
降水中の硝酸イオンの酸素同位体比は土壤中で硝化により生成した硝酸イオンと有意に異なる (大手, 2008)。
- ③ CH_4 の起源：炭素-水素同位体マップ
 CH_3COOH と $\text{CO}_2 + \text{H}_2$ の経路では CH_4 の $\delta^{13}\text{C}$ は異なる (Sugimoto and Wada, 1995)。
- ④ N_2O の生成経路： $\alpha - \beta$ 位の窒素同位体比の差から N_2O の生成経路が判定可能となる (Toyota et al., 2011)。

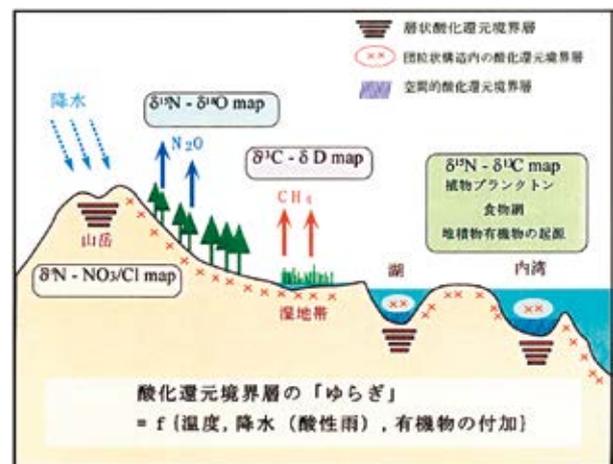


図4. 水系に沿った種々の同位体マップ

5. 終わりに

21世紀、地球環境科学の研究はその視点が大きく変化し、一つの Discipline から multi-Discipline へと移っている。この流れの中、地球化学の手法と方法論の開発において、安定同位体精密測定法は、その重要性が時代とともに増しており、人文科学における食文化の研究、生態学における食物網の研究を通して Inter- & Multi-Discipline の重要な方法論となっている。Urey (1947) による統計熱力学的安定同位体平衡論や、Bigelisen (1958) による反応速度論的同位体効果の研究に基づいて展開された生元素同位体精密測定法は、複雑な自然界の事象といえども、同位体効果に一般性、規則性が見出されている手法である。分析にあたっては、自然界の試料につきもののノイズを避けるために、研究の初期に測定する試料を十分に吟味することが要点となる。ノイズの要因は、一次生

産者の同位体比の時空間変動が大きいことに起因する。この点は特に留意されたい。

本稿では窒素・炭素同位体比に焦点を当てたが、近年、アミノ酸レベルの同位体比の測定、流域の水の流れに沿った Sr, Pb の安定同位体比や ^{14}C の測定が盛んになってきている。このような技術の進歩に伴って、いわゆるトレサビリティ法は、自然界を多面的に透視する方法として日進月歩の状態下にある (和田・神松, 2010)。

引用文献

- Aita, M.N., Tadokoro, K., Ogawa, N.O., Hyodo, F., Ishii, R., Smith, S.L., Saino, T., Kishi, M.J., Saitoh, S. and Wada, E. (2011) Linear relationship between carbon and nitrogen isotope ratios along simple food chains in marine environments, *J. Plankton Res.*, 33, 1629-1642.
- Chikaraishi, Y., Ogawa, N.O., Doi, H. and Ohkouchi, N. (2011) $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ratios of amino acids as a tool for studying Terrestrial food webs: a case study of terrestrial insects (bees, wasps, and honets), *Ecol. Res.*, 26, 835-844.
- Minagawa, M. and Wada, E. (1984) Stepwise enrichment of ^{15}N along food chains: further evidence and the relation between $\delta^{15}\text{N}$ and animal age. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 48 (5), 1135-1140.
- Nishikawa, J., Kohzu, A., Boontanon, N., Iwata, T., Tanaka, T., Ogawa, N.O., Ishii, R. and Wada, E. (2009) Isotopic composition of nitrogenous compounds with emphasis on anthropogenic loading in river ecosystems. *Isotop. Environ. Health Stud.* 45, 27-40.
- Ogawa N.O. et al. (2001) *Limnol. Oceanogr.*, 46(5), 1228-1236.
- Ohkouchi, N., Ogawa, N.O., Chikaraishi, Y., Tanaka, H. and Wada, E. (2015) Biochemical and physiological bases for the use of carbon and nitrogen isotopes in environmental and ecological studies, *Prog. Earth. Planet. Sci.*, doi: 10.1186/s40645-015-0032-y.
- 大手信人 (2008) 大気降水物としての窒素が水源域に与える負荷. 永田俊・宮島利宏 (編), 流域環境評価と安定同位体—水循環から生態系まで. 京都大学学術出版会, 59-69.
- Sugimoto, A. and Wada, E. (1995) Hydrogen isotopic composition of bacterial methane: CO_2/H_2 reduction and acetate fermentation. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 59 (7), 1329-1337.
- Toyoda, S., Suzuki, Y., Hattori, S., Yamada, K., Fujii, A., Yoshida, N., Kouno, R., Murayama, K. and Shiomi, H. (2011) Isotopomer analysis of production and consumption mechanisms of N_2O and CH_4 in an advanced wastewater treatment system., *Environ. Sci. Technol.*, 45, 917-922.
- Wada, E., Minagawa, M., Mizutani, H., Tsuji, T., Imaizumi, R., and Karasawa, K. (1987) Biogeochemical studies on the transport of organic matter along the Otsuchi River watershed, Japan. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 25, 321-336.
- 和田英太郎, 神松幸弘編著 (2010) 安定同位体というメガネ—人と環境のつながりを診る, 地球研叢書 昭和堂, 171pp.
- Wada, E., Ishii, R., Aita, M.N., Ogawa, N.O., Hyodo, F., Kohzu, A. and Yamada, Y. (2013) Possible ideas on carbon and nitrogen trophic fractionation of food chains: A new aspect of food-chain stable isotope analysis in Lake Biwa, Lake Baikal and the Mongolian grasslands. *Ecol. Res.*, 28, 173-181.
- Yamada Y, Ueda T, Koitabashi T, Wada E (1998) Horizontal and vertical isotopic model of Lake Biwa ecosystem. *Jpn. J. Limnol.*, 59, 409-427.