

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：15201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2017

課題番号：26550009

研究課題名(和文)メダカを利用した耳石微量試料の酸素同位体比による回遊履歴解読手法の開発

研究課題名(英文) Analysis of migration history using the stable oxygen isotopic values of otolith for the Medaka

研究代表者

山口 啓子 (Yamaguchi, Keiko)

島根大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：80322220

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：魚の海と川の回遊履歴解読にはSr/Ca比が利用されているが、海と汽水の区別が出来ない問題がある。そこで、耳石の酸素安定同位体比を用いて魚の回遊履歴を推定する手法について検討した。斐伊川水系の淡水域から汽水域に生息するメダカを採取し、生息場所の塩分と耳石の酸素安定同位体比を調べた。その結果、塩分と、環境水および耳石の ^{18}O 値とはいずれも直線関係を示した。また、塩分と水温を条件付けた飼育実験下で成長したメダカの耳石の ^{18}O 値を測定したところ、塩分と ^{18}O 値は直線関係を示し、水温の影響は小さかった。これらのことから、 ^{18}O 値は魚の生息塩分を推定する有効なツールとなることが示された。

研究成果の概要(英文)：There are many studies on fishes migrating between the sea and fresh water areas using Sr-Ca ratio in the otolith, however, it is difficult to describe the difference between brackish and sea water areas by that ratio. We made an attempt to use the oxygen stable isotopic study for estimating migration history of fishes in the brackish area. The relationship between water salinity and oxygen stable isotopic values in otoliths was examined for *Oryzias latipes*, caught from fresh and brackish water areas of Hii River system. The relationships between salinity and ^{18}O values of water and otolith are respectively linear. Rareing experiments in some conditions of controlled temperature and salinity showed that the relationships between salinities and ^{18}O values are also linear and the temperature effect is quite limited. We suggest that the analysis of oxygen stable isotope in otoliths will provide a powerful tool for the documentation of fish migratory behavior in brackish waters.

研究分野：生態環境工学

キーワード：耳石 メダカ 酸素安定同位体比 塩分 回遊

1. 研究開始当初の背景

水中の CO₂ や炭酸カルシウム結晶における酸素安定同位体比は、これまで地球科学の分野において過去の地質時代における気候や水温を示す温度計として高い精度を持つとされ、利用されてきた。一方、その値が淡水と海水で大きく異なることも知られ、温度計としての利用は淡水と海水とで区別されている。淡水と海水が混じる汽水域では、水温による変化と淡水海水の混合の両方により同位体比の値が変化するため、上述の温度計としての利用が困難であるとされ、ほとんど研究されておらず、水温・塩分の正確な対応関係も明らかにされていない。二枚貝での研究例はあるが (e.g. Sampei et al., 2005) 殻全体を均質化した試料と採取された場所の塩分を対応させているため誤差が大きい。より詳細に同位体値と水温・塩分について検討するには、成長に要する時間が長期にわたる水温・塩分と硬組織の形成とを一致させた試料が必要であるが、入手が困難であること、酸素炭素同位体分析における技術的な限界として、試料量が百 μg 程度と多く必要であるため、微細成長線の精度での分析が出来ず、研究が進まなかった。一方、近年、新たな微細試料の採取技術・微量試料の測定手法が開発されつつあり、微細成長線レベルでの同位体変化を分析が可能になりつつあり、これを利用して、成長に伴う環境の変化を推定することが出来ると期待される。

一方、魚類の水域利用に関する研究では、海水と淡水間の移動を行う回遊履歴の解読手法として、Sr/Ca 比の分析が行われている (海において値が高い) が、この手法では、汽水と海水で値の差がほとんど無いため、汽水域内での移動を推定することが出来ないという問題がある。

そこで本研究課題では、耳石の酸素安定同位体比で汽水域の生息塩分の推定が可能かを検討し、個体ごとの汽水域を含む水域移動の履歴を解読する手法の開発に取り組むこととした。

2. 研究の目的

本研究では、ミナメダカ *Oryzias latipes* (以下、メダカ) の水温・塩分環境耐性の高さと成長・繁殖の速さを利用して、付加成長する硬組織 (化石や保存試料中に残される性質を持つ) である耳石の情報から、その生物が生存していた期間の水温・塩分環境を読み取り、淡水～汽水域～海水を移動する回遊性魚類の詳しい行動履歴を耳石から読み取るための履歴解読手法を開発すること、およびメダカの汽水域の利用実態を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 野外における試料採集

図 1 に示した斐伊川水系では、中国山地を集水域とし、St.1 では淡水 (0psu) である

が、宍道湖では低塩分の汽水 (5psu 前後)、中海では中塩分 (10-20psu 程度) の汽水、境水道ではほぼ海水 (20-30psu) となっている。本研究ではこの明瞭な塩分勾配を利用して、塩分が明瞭に異なる調査地点 (St.1~5) を設定した。各地点で季節を通じて、水温・塩分を測定し、環境水およびメダカの採集を行った (2014 年 7 月~2015 年 6 月)。採集したメダカは体長を測定した後、解剖して耳石を摘出し分析に供した。

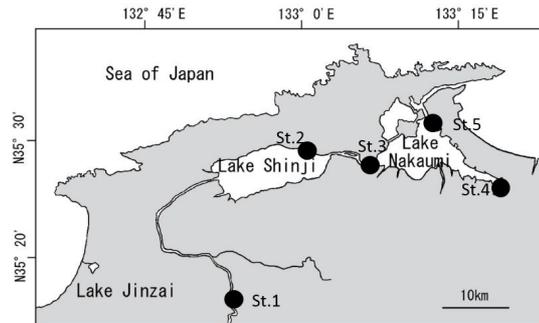


図 1 地点図

(2) 室内飼育実験

中海で採集し継代飼育した、塩分耐性のあるメダカを用いて、塩分 (0, 5, 10, 15, 20, 25psu) と水温 (15, 20, 25, 30) で条件付けた飼育実験を行った。環境水は実験開始時に水替え分も汲みおき、実験期間中同じ水を用いた。耳石の同位体分析が可能サイズまで飼育し、耳石を摘出し分析に供した。

(3) 酸素安定同位体比分析

同位体の分析は、炭酸カルシウムはリン酸溶液で溶解させ、発生した二酸化炭素ガスの質量比を、質量分析計 (GV Instruments 社製, IsoPrime) にて測定した。炭酸カルシウム (アラゴナイト) は PDB、水は SMOW (標準海水) を標準物質として、その偏差を求め、¹⁸O 値とした。

(4) 野外採集個体および移植飼育実験個体における Sr/Ca 比の分析

淡水および汽水域で採集されたメダカについて、耳石を樹脂包埋し、中心核が露出するまで研磨した。鏡面研磨、炭素蒸着を施した後、X 線マイクロアナライザー (EPMA) にて、Sr 及び Ca の濃度をライン状にスポット定量分析し、中心から縁辺までの Sr/Ca 比の変化を分析した。

また、水域移動による Sr/Ca 比の変化について確認するため、淡水域で採取された個体を、汽水 (中塩分) に移植する実験を行い、この移植飼育実験で得られたメダカの耳石についても断面の Sr/Ca 比分析を行った。

(5) 他魚種 (スズキ・マハゼ) の測定

酸素同位体比を用いた塩分推定が、他の魚種においても可能であるか、魚種により塩分と

酸素同位体比との関係に相違があるか、を確認するため、同じ斐伊川水系汽水域に広く分布する魚類として、スズキとマハゼについても耳石を測定した。スズキ試料は淡水域から日本海まで（塩分0～33）、マハゼは宍道湖から中海まで（塩分4～23）のマス網で捕獲された個体を用いた。スズキについては耳石断面を作成し、成長に沿った炭酸カルシウムの酸素同位体比の変化を明らかにし、回遊履歴解析の可能性を検討した。

4. 研究成果

(1) 斐伊川水系における環境水およびメダカの耳石の酸素同位体比と塩分との関係

図2に各調査地点で1年間に採取した環境水および夏期に採取したメダカの耳石の $\delta^{18}\text{O}$ 値の塩分との関係を示す。環境水およびメダカ耳石の $\delta^{18}\text{O}$ 値はいずれも塩分と直線関係にあり、回帰直線は、 y を $\delta^{18}\text{O}$ 値、 x を塩分とすると、それぞれ

$$y = 0.2502x - 9.0512 \quad (R^2 = 0.9161)$$

$$y = 0.2472x - 9.8551 \quad (R^2 = 0.9233)$$

となり高い決定係数が得られた。

これは、斐伊川水系汽水域の水は海水と淡水を端成分として、その混合割合により、酸素同位体比の値が決定されていること、その水中に生活するメダカは、水の $\delta^{18}\text{O}$ 値を基本的に反映していることを示す。また、環境水の $\delta^{18}\text{O}$ 値は、夏と冬で水温が大きく異なっても、塩分が同じであれば同程度であった。両者を比較すると、回帰直線の傾きはほぼ一致した(0.25)が、耳石の方が環境水より0.8%低い値を示し、何らかの体内での分別作用が働いたと考えられた。この式により、メダカの耳石 $\delta^{18}\text{O}$ 値から、およそその生息塩分が推定できることが示された。

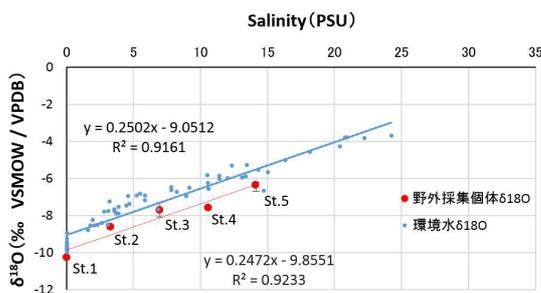


図2 斐伊川水系の水およびメダカ耳石における塩分と酸素同位体比 $\delta^{18}\text{O}$ 値との関係

(2) 室内実験による水温・塩分と耳石の同位体比の関係

水温と塩分を条件付けた室内飼育実験で得られたメダカ耳石の同位体比の値を図3に示す(15ではメダカが正常に発育しなかったため、20-30)。既往の研究では結晶形成時の水温が約4℃上昇すると炭酸塩の $\delta^{18}\text{O}$ 値が1%程度低くなることが知られているが、本研究の結果では中塩分から高塩分では同位体比の値が水温にはほとんど依存せず、塩

分に応じて同様の直線関係を示した。

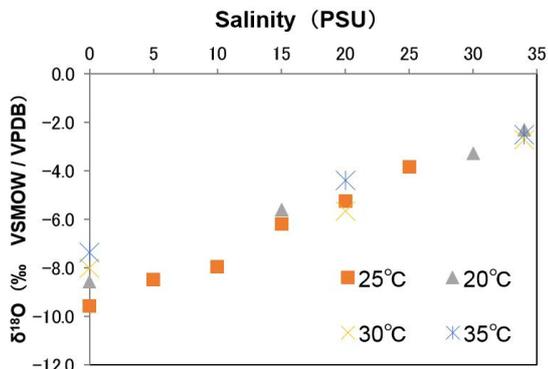


図3 室内飼育実験温度と耳石の同位体比

一方、淡水では高水温ほど $\delta^{18}\text{O}$ 値が高い傾向が見られた。実験に用いた飼育水を水替えの前後で採取し、同位体比を測定したところ、飼育後で同位体比が高くなる傾向がみられたことから、特に淡水では蒸発による同位体分別が大きく値を変化させたと考えられた。

図4に野外で採取した野生のメダカ個体(図2と同じ)と25℃で室内飼育したメダカの耳石 $\delta^{18}\text{O}$ 値と塩分との関係を示した。野外の各塩分の地点と室内実験で得られた塩分と $\delta^{18}\text{O}$ 値の回帰直線は、非常によく一致した。

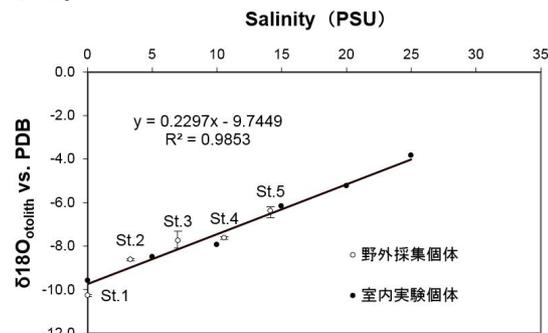


図4 野外採集個体と室内飼育実験(25℃)個体の塩分と同位体比の関係比較

(3) 魚種間の比較

図5にメダカに加えて、同じ斐伊川水系汽水域に生息する他魚種として、スズキおよびマハゼについて、宍道湖・中海で採取された個体の耳石縁辺部(直近に形成された層)の同位体比と採集地点の塩分、および、斐伊川水系で採取した全ての環境水と塩分との関係を示した。環境水とスズキ(夏)の耳石の回帰直線は非常に良く一致した。

$$y = 0.2265x - 8.8127 \quad (R^2 = 0.9525)$$

$$y = 0.2348x - 8.9436 \quad (R^2 = 0.9637)$$

またスズキの冬に得た耳石では

$$y = 0.2050x - 7.7668 \quad (R^2 = 0.8721)$$

となり、夏と比べ冬で約1%高い値となった。

マハゼは試料数が少なく、パラツキが大き

いため、信頼性は低いですが、水やスズキの耳石と比べて 1%程度低い値をとり、回帰直線はメダカのもの と近かった。これらのことから、斐伊川水系汽水域では環境水と同位体比は直線関係にあり、そこに生息する魚類の耳石もほぼ同じ傾きの直線関係を示すが、魚種間で値が異なることが明らかになった。このことは、魚種によっては生息する環境水から耳石に取り込まれる際に何らかの分別作用が働き、 ^{18}O がやや低い値をとることがあることを示している。

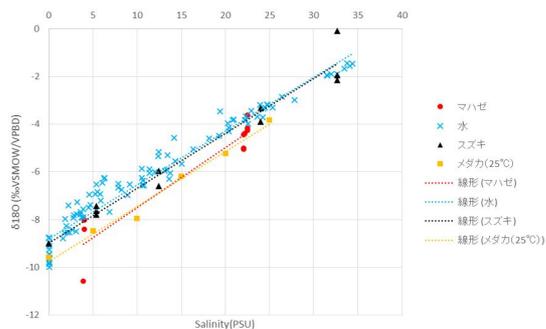


図 5 魚種による塩分と耳石の酸素同位体比との関係比較

また、大型魚種であるスズキがこの分別作用が小さく、小型のメダカやマハゼにおいて大きかった。

スズキにおいて、夏と冬で水温に 20 以上の差があるにもかかわらず、同位体比の値は 1%程度しか差が無かったことから、塩分を推定する際に季節により 4psu 程度の誤差があるとすれば、汽水域における魚の移動を推定するために利用可能であると考えられた。

そこで、図 6 にスズキの耳石断面における成長線に沿って削り出した試料の同位体比の変化の 1 例を示した。宍道湖は 5psu 程度 ^{18}O 値 -6‰以下、中海が 15-20psu 程度 -5 ~ -2‰同、日本海が 30-33psu -1‰以上程度であることから、この個体が成長に伴い、日本海と宍道湖を移動していることを読み取ることが出来た。

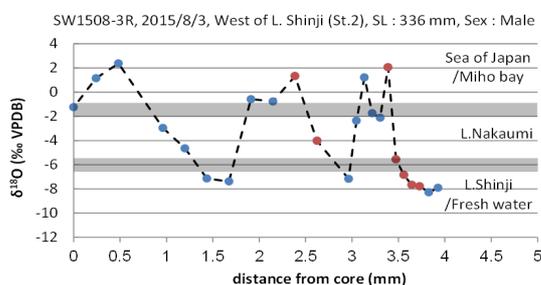


図 6 スズキの耳石断面試料を用いた成長に伴う同位体比の変化と塩分の異なる水域移動の推定

以上のことから、耳石の酸素同位体比 ^{18}O 値が、汽水域における回遊履歴解読に有効な

ツールとなり得ることが明らかとなった。

(4) メダカの移動履歴解読

本研究課題の提案当初には、研究分担者が開発しつつあった、レーザー吸光を利用した微量試料による酸素炭素同位体分析装置を適用し、メダカ耳石断面の成長線に沿って削り出した炭酸カルシウムの酸素同位体比の変化から、個体の水域の移動履歴を読み取ることを計画していた。しかし、当該装置の特許取得と製品化のため、本研究期間中の実施が困難となった。

そこで、メダカの移動履歴解読については、魚類の回遊履歴解読の代表的な手法である耳石の Sr/Ca 比分析を行った。詳細は、すでに発表した論文に記した(田久和ほか, 2018)。

淡水・汽水ともに、野生メダカの耳石における Sr/Ca 比は、コアから縁辺までほぼ一定で変化が無かった。一方、淡水から中塩分の汽水(中海)に移植したメダカの耳石では、移動に伴い Sr/Ca 比の値が大きく変化した。これらのことより、汽水の中海や宍道湖で採取されたメダカは、淡水域から流れ込んだのではなく、汽水域で生まれ育った個体であることが明らかとなった。メダカの水系を超えた分散や個体群維持にとって、汽水域が重要な役割を果たしていることが推察された。

[引用論文]

Sampei, Y., Matsumoto, E., Dettman, D.L., Tokuoka, T. Abe, O. 2005. Paleosalinity in a brackish lake during the Holocene based on stable oxygen and carbon isotopes of shell carbonate in Nakaumi Lagoon, southwest Japan. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 224 : 352 - 366 .

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

- 1) 田久和剛史・山口啓子・高須晁・耳石 Sr/Ca比を用いた汽水域産ミナミメダカの経験環境の推定. *Laguna*, 25, 1-9, 2018. 査読有.
- 2) Sakai, S., Matsuda, S, Hikida, T., Shimono, A., McManus, J.B., Mark Zahniser, M., Nelson, D., Dettman, D.L., Yang, D. and Ohkouchi, N. High-precision simultaneous $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ and $^{17}\text{O}/^{16}\text{O}$ analyses for μg -quantities of CaCO_3 by tunable infrared laser absorption spectroscopy. *Analytical Chemistry*, 89, 11846-11852, 2017. 査読有.

- 3) Sakai, S. and Matsuda, S. A practical cryogen-free CO₂ purification and freezing technique for stable isotope analysis. *Analytical Chemistry*, 89, 4409-4412, 2017. 査読有.
- 4) 坂井三郎, 地球化学におけるマイクロサンプリング技術の進歩. *地球化学*, 企画総説「最先端の分析解析法」, 39, 1-12, 2015. 査読有.

〔学会発表〕(計 5 件)

- 1) Yamaguchi, K., Hosoda, M., Sakai, S., Nakamura, M., Koshikawa, T., Dettman, D. L. and Takayasu, K. Estimation of the migration history of the temperate seabass (*Lateolabrax japonicus*) from an otolith-based stable isotope study in Shinjiko-Nakaumi lagoon, Southwest Japan. 3rd Asian Marine Biology Symposium, Kumamoto, Japan. 2017
- 2) 山口啓子・細田真生・福島康文・伊藤晁介・田久和剛史・坂井三郎. 耳石の酸素安定同位体比を用いた汽水域における魚類の生息環境推定手法の検討. 汽水域研究会大会. 高知. 2017
- 3) 細田真生・山口啓子・坂井三郎・中村幹雄. 斐伊川水系産スズキの耳石酸素安定同位体比を用いた回遊履歴の推定. 汽水域研究会年会. 松江. 2017.
- 4) 田久和剛史・山口啓子・高須晁. 耳石 Sr/Ca 比による汽水域産ミナメダカ of 経験環境の推定. 汽水域研究会 2016 年大会, 静岡. 2016.
- 5) 田久和剛史・福島康文・山口啓子・坂井三郎. ミナメダカの耳石分析～耳石に記録される生息塩分～. 日本陸水学会第 80 回大会. 函館. 2015.

〔産業財産権〕

取得状況 (計 1 件)

名称 : PRE-PROCESSING DEVICE FOR GAS ANALYSIS

発明者 : SAKAI Saburo

権利者 : 同上

種類 : 特許

番号 : PCT/JP2016/076107

取得年月日 : 2017 年 6 月 9 日

国内外の別 : 国際特許

(1) 研究代表者

山口 啓子 (YAMAGUCHI, Keiko)
 国立大学法人 島根大学・生物資源科学部・教授
 研究者番号 : 80322220

(2) 研究分担者

坂井 三郎 (SAKAI, Saburo)
 国立研究開発法人海洋研究開発機構・生物地球化学研究分野・技術研究員
 研究者番号 : 90359175

(3) 研究協力者

田久和 剛史 (TAKUWA, Tsuyoshi)
 宍道湖自然館ゴビウス・学芸員
 (当時 : 島根大学大学院生物資源科学専攻)

高須 晁 (TAKASU, Akira)
 島根大学大学院 総合理工学研究科

David L. Dettman
 アリゾナ大学・技術研究員