

平成30年 5月29日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14968

研究課題名(和文)酸素安定同位体比を用いたクロマグロの産卵水温の推定

研究課題名(英文) Estimation of spawning temperature for bluefin tuna using oxygen stable isotope ratio

研究代表者

木村 伸吾 (Kimura, Shingo)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：90202043

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)：SIMS分析に適した試料を作製する前処理技術を検討した結果、サイズの異なるダイヤモンド粒子を用いた三段階研磨を施すことにより試料表面を平滑に保ったまま核を露出することに成功した。確立した前処理技術を用いて作製した試料(計5個)の耳石核から縁辺部までの ^{18}O をSIMSにより測定した結果、第一年輪周辺部(最初の冬を迎える時期)において1‰以上(PDB)の ^{18}O 値の増加が認められた。これは、実際に個体が経験した水温を反映していると考えられる。本研究で確立された試料作製前処理技術は、SIMS分析のデータの質を確保していることが実証された。

研究成果の概要(英文)：We developed a sample preparation protocol for SIMS measurements in which a sample is polished using different sized diamond pastes until an otolith core is exposed with a mirror surface. We measured ^{18}O from the core to the edge of 5 otolith samples by SIMS. The results showed more than 1‰ (PDB) increase in ^{18}O value around the first annuli where an individual experiences first winter. This result likely reflects the actual fluctuation in temperature experienced by fish. The sample preparation protocol developed in the present study thus adequately ensures the quality of SIMS measurements.

研究分野：水産海洋学

キーワード：クロマグロ 酸素同位体比 SIMS 温暖化 耳石 イオンビーム 産卵水温

1. 研究開始当初の背景

クロマグロ *Thunnus orientalis* は国際的に重要な水産魚種であり、日本は世界のクロマグロ漁獲量のおよそ 7 割を消費している。しかし、その資源量は 1960 年代以降減少の一途をたどっており、本種の資源変動に関する科学的データに基づく持続的資源管理の導入が急務となっている。本種の主要産卵海域は、東シナ海南西諸島周辺海域と日本海の 2 つの海域が知られているが、近年、地球温暖化に伴う海水温上昇による産卵場の北上や仔稚魚の生残率の低下が示唆されている (Kimura et al., 2010)。そこで、本種資源を適切に管理していくには、どちらの産卵海域で産卵しているかを経年的に調査し、正確に把握することが必要不可欠である。

質量分析計を用いた研究が身近になり、耳石の安定同位体比分析による環境履歴の復元が多くの魚類を対象に行われている。耳石を構成する炭酸カルシウム (CaCO_3) は、代謝回転が極めて小さく、含まれる微量元素は魚の死後も保存されることが知られている。既往研究から、耳石酸素安定同位体比 (^{18}O) はクロマグロ仔魚期の経験水温の指標として有効であることが示されている。産卵海域の変化を明らかにするためには、高年齢までの異なる年齢個体の耳石核 ^{18}O を用いて仔魚期の経験水温を明らかにし、東シナ海産卵群なのか日本海産卵群なのかを特定することが重要であると考えられるが、そのような研究事例は未だ存在しない。

2. 研究の目的

そこで本研究では、高分解能である二次イオン質量分析計 (SIMS: Secondary Ion Mass Spectrometry) を用いて、クロマグロ耳石 ^{18}O 分析による産卵水温および産卵海域の推定と、そのための技術確立を目的に研究を進めた。

3. 研究の方法

東京都築地市場および和歌山県那智勝浦町のマグロ仲卸業者から冷凍クロマグロ頭部 (ヨコワ含む) を計 134 個体入手した。全解凍した頭部から実験室にて解剖を行い、左右の耳石をピンセットで摘出し、Milli-Q 水で洗浄した後、乾燥させマイクロチューブに保管した。

左右の耳石はそれぞれ樹脂に包埋し、年齢査定用および ^{18}O 分析用に耳石薄片を作製した。耳石 ^{18}O 分析には、加速イオンビームを試料固体表面に照射し、引き剥がされてイオン化した試料物質を質量分析計に導入して計測する分析器である SIMS を用いた (牛久保, 2016)。本分析器は、sub から数十 μm の領域で微小試料の同位体比や元素濃度を

分析することが可能である。一方、分析精度が試料表面の形状の影響を強く受けてしまうことから、核を露出させる際には試料表面を極めて平滑になるよう鏡面仕上げを施した。核の露出した耳石サンプルを複数並べて樹脂包埋し SIMS を用いて核の ^{18}O を測定することが総測定時間の短縮のためには望ましいが、同じ高さに測定面を固定することが難しいので当面は単体で測定することにした。

最終的には、Kitagawa et al. (2013) で既に確立されているクロマグロ仔魚耳石 ^{18}O と経験水温の関係式を用いて測定した ^{18}O から仔魚期の経験水温を復元し、産卵海域の水温データと比較することにより、東シナ海産卵群と日本海産卵群を識別した。

4. 研究成果

(1) SIMS 分析前処理技術の確立

クロマグロの耳石を対象とした SIMS 分析自体の技術を確立させるため、複数の耳石核を一つの樹脂に埋めそれを 1 サンプルとして分析するのではなく、まず一つの耳石を用いて、それを 1 サンプルとして切断・樹脂包埋、切削・研磨および標準試料の調整を検討した。それぞれの作業工程から分かったことや課題点を以下に記す。

切断・樹脂包埋

スライドガラスにクリスタルボンドで固定した耳石を倒立顕微鏡で観察し、核の位置から両側 $250\mu\text{m}$ の位置に線を引いた。自動精密切断機 (IsoMet5000, Buehler 社) を用いて線の位置で切断し、カットしたガラスの上のせた標準試料 (UWC-3, カルサイト) とともにエポキシ樹脂 (エポキュア 2, Buehler 社) に包埋した。樹脂に埋める素材の硬さが異なると切断速度にムラが出てしまうため、標準試料を置く台は樹脂で作製することが適切であることが分かった。

切削・研磨

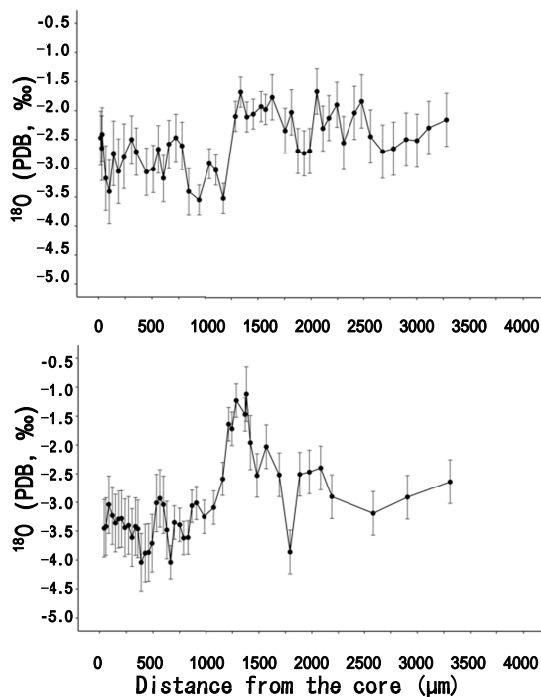
核までの残りの厚みが約 $50\mu\text{m}$ になるように精密研磨機 (Discoplan, Struers 社) を用いて切削・研磨を行った。次に、異なるサイズのダイヤモンド粒子をスプレーした研磨円盤 (MD-Largo, Struers 社) を用いて 3 段階研磨を行ったところ、SIMS 分析に適した表面の平滑性を確認することができた。

標準試料の検討

標準試料は形状や大きさが異なるため、画像処理ソフトを用いてすべて測定した。大きさは約 $300\text{--}700\mu\text{m}$ であったため、耳石核が位置する $300\mu\text{m}$ まで研磨しても残る高さを考慮し、 $100\mu\text{m}$ の高さの試料台を樹脂で作製することが適切であることが分かった。

(2)SIMS ^{18}O 分析

高知コア研究所のSIMS (CAMECA IMS 1280-HR)を用いて鏡面仕上げを施した耳石試料5個の ^{18}O 分析を行った。Cs⁺イオンビームの大きさを約10 μm に設定し、耳石核から縁辺部までを1試料あたり42~78点測定した。その結果、全てのサンプルにおいて、核から第1年輪周辺(約800 μm ~)までの間に約1~2‰の ^{18}O の増加が認められた。第1年輪周辺は水温の低下し始める秋~冬の時期に相当し、 ^{18}O の増加は実際に個体が経験した水温を反映していると考えられる。このことから、本研究にて確立した試料前処理手法は、SIMS分析で得られるデータの精度を十分に発揮できたものと判断できる。また、産卵後数ヶ月とみれる期間の ^{18}O は、6ヶ月以上経過したとみれる期間に比較し ^{18}O が約2‰高く、これは季節変動に伴う水温の低下とともに、さらに高緯度の低水温帯にクロマグロが移動したことを示す結果と推定できる。さらに、産卵後2ヶ月程度の期間には0.5‰程度(約2)の差が個体間に認められ、この差が東シナ海産卵群と日本海産卵群の違いを表している可能性があることが分かった。図は分析したクロマグロ耳石の核から距離に対する ^{18}O 値の一例であり、上述した状況を示すものである。



クロマグロ耳石の核からの距離に対する ^{18}O 値。

上段の試料は下段に比較し、産化初期により低水温を経験していると考えられる。

(3)まとめ

本研究により、クロマグロの産卵水温を定量的に推定できる技術が確立され、産卵海域が特定されることにより地球温暖化などの海洋環境変動に対応した資源管理方策の策定が可能になると考えられる。一方で、SIMSを用いた耳石酸素同位体比分析による手法は精度が高いが故に汎用性の高い手法とは言えず、技術的な諸問題を抱えている。とくに、複数の耳石を同時に計測できるようにして、1回の分析個体数を飛躍的に高めることができれば、クロマグロだけでなく他の魚種への応用が容易になり多方面での活用が期待できる。そのためには、標準試料の研磨法の技術検討など、サンプル前処理技術の改善に取り組みプロトコルを確立させることが重要である。また、SIMS分析から得られる測定値は、耳石試料(アラゴナイト)と標準試料(カルサイト)の組成の違いから生じるマトリクス効果や生物起源有機物の影響を受けることから相対値として扱う必要があり、今後は同位体比質量分析計(IRMS: Isotope Ratio Mass Spectrometry)を用いて同試料の ^{18}O 分析を行うとともに補正係数を決定し、絶対値を確定する必要がある。今回入手した試料とともにクロマグロ試料の入手を継続して産卵年ごとの個体数を増加させた上で分析に供し、東シナ海産卵群と日本海産卵群の割合の経年変化を分析する予定である。

<引用文献>

- Kimura, S., Kato, Y., Kitagawa, T. and Yamaoka, N. (2010) Impacts of environmental variability and global warming scenario on Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*) spawning grounds and recruitment habitat. *Progress in Oceanography*, 86, 39-44.
- Kitagawa, T., Ishimura, T., Uozato, R., Shirai, K., Amano, Y., Shinoda, A., Otake, T., Tsunogai, U., Kimura, S. (2013) Otolith ^{18}O of Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* as an indicator of ambient water temperature. *Marine Ecology Progress Series*, 481, 199-209.
- 牛久保孝行 (2016) 二次イオン質量分析計を用いた高精度局所同位体比分析手法の開発と応用. *ぶんせき*, 10, 390-396.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計3件)

- Hane Y., Kimura S., Yokoyama Y., Miyairi Y., and Ushikubo T. (2017) Estimating spawning temperature of Pacific bluefin tuna using otolith ^{18}O by

SIMS. Joint Symposium on Ocean Coastal, and Atmospheric Sciences.

Hane Y., Kimura S., Yokoyama Y., Miyairi Y., and Ushikubo T. (2017) Development of methodology for analyses of larval ambient water temperature of Pacific bluefin tuna using SIMS. PICES-2017 Annual Meeting.

Hane Y., Kimura S., Yokoyama Y., Miyairi Y., Ushikubo T., and Ogawa N. (2017) The application of SIMS ^{18}O analysis for estimating spawning temperature of Pacific bluefin tuna using otolith. 6th International Otolith Symposium. National Museum of Marine Science & Technology.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 伸吾 (KIMURA, Shingo)
東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授
研究者番号：90202043

(4) 研究協力者

羽根 由里奈 (HANE, Yulina)