

総説 REVIEW

炭素，窒素安定同位体自然存在比による河川環境の評価

高津文人^{1)*}・河口洋一²⁾・布川雅典³⁾・中村太士³⁾

1) 独立行政法人科学技術振興機構 〒520-2113 滋賀県大津市上田上平野町字大塚509-3

2) 独立行政法人土木研究所自然共生研究センター 〒501-6021 岐阜県羽島郡川島町笠田町官有地無番地

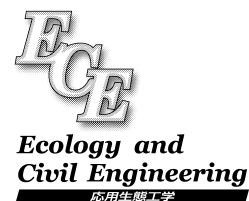
3) 北海道大学大学院農学研究科森林管理保全学講座 〒060-8589 札幌市北区北9条西9丁目

Ayato KOHZU¹⁾, Yôichi KAWAGUCHI²⁾, Masanori NUNOKAWA³⁾ and Futoshi NAKAMURA³⁾ : Estimation of stream ecosystems by ¹³C and ¹⁵N natural abundances. *Ecol. Civil Eng.* 7(2), 201-213, 2005.

1) Japan Science and Technology Agency, Kyoto University Aza Otsuka 509-3, Hirano-cho, Kamitanakami, Ohtsu 520-2113, Japan

2) Aqua Restoration Research Center, Public Works Research Institute, Mubanchi, Kasada, Kawashima, Hashima-gun, Gifu 501-6021, Japan

3) Department of Forest Science, Graduate School of Agriculture, Hokkaido University Kita 9 Nishi 9, kita-ku, Sapporo 060-8589, Japan



Abstract: Stream restoration has been conducted in the Shibetsu River in northern Japan, which aims at the recovery of its river-floodplain ecosystem altered dramatically in the last 40 years. Well-designed monitoring before and after restoration should be conducted to evaluate the effects of the stream restoration on its ecosystem. An analysis of stable isotope ratios (δ -values) is one of the most effective methods for monitoring material cycling in river ecosystems. Because product δ -values are roughly dependent upon their source δ -values, we can trace material flows by comparing the δ -values of various compounds. In the first section of this review, we introduced a basic concept of the δ -value analysis by using an analogy from various diffusion patterns of salt water. The second section described how to calculate δ -values and discussed the difference between the analyses of natural stable isotope ratios and the tracer analyses (another powerful tool for material flow analysis). The third section presented the theoretical basis of mechanisms which change the δ -values. A product δ -value becomes different from its source δ -value in two kinds of processes: isotope exchange equilibrium and kinetic isotope fractionation. The magnitude of this difference ($\Delta\delta$ -value: $\delta_{\text{product}} - \delta_{\text{source}}$) tells us about the processes and activities of the reactions. The fourth section introduced specific examples from the carbon and nitrogen δ -values ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$) of aquatic organisms to infer the degree of eutrophication and carbon recycling at ecosystem levels as well as to determine food web structures and photosynthetic activities at biological interaction levels. In the fifth section, we presented the result of our study indicating differences in food web structure between a main-stream channel and oxbow lake in the Shibetsu River watershed when their $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values of diverse aquatic organisms were compared. The advantages and limitations of the stable isotope analysis in environmental assessment were also discussed.

Key words: fish community, lentic fish, lotic fish, oxbow lake, rehabilitation

はじめに

人間社会は河川生態系から日々多くの恩恵をうけている。しかしながら、高度成長期以降の大幅な河川改修に伴い、河川環境は大きく変化し、恩恵の質、量はともに大きな影響を受けた。北海道の標津川では、過去 40 年間で急速に変化した自然環境の復元を目的として、試験的な蛇行復元の実験が行われた。この復元事業の河川生態系への影響を、事業実施前と後で比較可能なモニタリングを行うことにより、評価することが求められた。従来の生態環境モニタリングでは、その場の生物の種構成や種の個体群サイズの変化を評価することが多かった。しかしながら、近年、河川環境は河川の生物のみならず、物理構造⇔水質⇔生物という相互作用しあう各環境要素の総体として捉えられている。その意味で河川環境の診断を総合的に行うにはこれらすべての環境要素の変化を解析しうるパラメーターが望ましい。従って、網羅的な河川環境のモニタリングを行うには以下のような利点をもった新たな方法を積極的に適応していかなければならない。1、無機態から有機態まで幅広い物質、生物を対象に分析でき、サンプリングに適した時間や場所の制約が少ない。2、物理構造、水質、生物という互いに異なる環境質の解析に適用できるためには物質動態解析に広く使用される分析手法がよい。3、低コスト、高精度ですばやく自動分析できる。

安定同位体比 (δ 値) 測定法はこうした要求を満たしている。生成物の δ 値は基質 (ある反応を経て生成物がつくられる際にその元となる物質) の δ 値によって大きく規定されることから、さまざまな物質の δ 値を比較することで物質の流れを解析できる。同位体測定が生態系のモニタリングの最も簡便で正確な方法のひとつとなることを期待して、同位体測定法の世界の解析能力を、標津川の例を引用して議論した。

総説の構成は大きく二つに分かれる。前半の第一節および第二節では、安定同位体比の基礎知識を一般的な同位体解析手法の考え方から同位体の変動メカニズムを支配する理論に関することまで概説する。後半の第四節では、実際に河川環境とくに食物網構造の評価に同位体解析を利用した例を用いて、同位体比のデータの解釈方法、その有効性と限界について議論する。前半と後半をつなぐ節として設けた第三節では、河川環境の評価の際に同位体比の測定対象となる水生生物の同位体特性を支配する要因について概説する。

第一節 安定同位体自然存在比を測定するとは

安定同位体自然存在比測定法を環境評価の重要な解析ツールとして使用するために、同位体比をコップの塩水の濃さに例えることで、安定同位体自然存在比を測定することで何がわかるかについて簡単に説明する。

世の中には重い同位体と軽い同位体の存在する原子が数多くある。同位体とは質量が異なるが、化学的性質が同じ原子のことをいい、この質量の違いが異なる同位体にさまざまな違いを生み出す。質量が違えば同じ温度条件下でも原子の振動数に違いが現れ、軽い同位体の方がよりはやく振動しているため、軽い同位体の結合は重い同位体を含んだ結合に比べ切れやすくなっている (和田 1986; 酒井ほか 1996)。例えば、重水素でできた水を数リッター以上飲むと通常の大人の健康は著しく害されると言われている。それは生物代謝のもっとも基本的な反応の多くが、分子間の水素結合の強さによって調節されているため、水素原子の多くが重水素に置換されてしまうと、水素結合が非常に強くなってしまい、スムーズな代謝反応が起きなくなるためと考えられている。

もちろん、自然界でこのように極端に重い同位体が多くなることはまず起きない。それは、生物や大気、水圏での反応によって、分子はすばやく分解、再合成され循環しているため、各生物や無機物などの同位体比はよく似た同位体比になるからである (和田 1993)。例えるなら、塩辛いコップの水とほんの少ししか辛いコップの水を半分ずつ入れ替えていくことを、何度も繰り返していくと、両方とも同じような塩辛さになっていくこととよく似ている。

しかしながら、非常にわずかな同位体比の差を議論するとすれば、生物や無機物がまったく同じ同位体比になることはほとんどない。コップの塩水をそのままにしておくと、どんどん蒸発し塩水の量は減ってその濃さが濃くなる現象のように同位体比も変化する。塩水の場合、水だけがコップの外へ蒸発し塩類は残るため、塩分濃度が高くなるのは言うまでも無いが、蒸発に限らず多くの反応で重い同位体が残るといった同様の現象は幅広く知られている。水溜りの水がどんどん干上がる場合、蒸発する水蒸気には水溜りの水より一定した分だけ重水素が少ないため、残った水溜りの水にはどんどん重水素が蓄積される。こうした反応に伴う同位体分布の偏りを引き起こす理論的メカニズムについては、第二節でレイリーの式を用いて詳しく説明する。では、生物、有機物、無機物の同位体比がある値に維持されるメカニズムについて

考える。例えて言うなら、コップの塩水はそのままだと蒸発して塩類が蓄積し、塩辛くなる。それを防ぎ、ある一定の塩辛さに保つ方法を考えるのに似ている。それは、1) コップにラップか蓋をしてこれ以上蒸発しないようにするか、2) 塩辛くなりすぎた分、水を注ぎ足し、また蒸発すればその分補充し続けるか、のいずれかである。実際に自然界で同位体比が維持されているメカニズムとしてはこの両維持機構が同時に働いている場合も少なくない。ラップをされたコップの中の塩分濃度が一定に保たれる理由はもちろんコップの外に水が蒸発していかないからである。しかし、塩水の表面から蒸発が起こっていないかという点と正確にはそうではない。蒸発しているが、ラップと塩水に挟まれた閉じた空間の中の水蒸気圧が飽和してしまい、蒸発した分の水が塩水に戻っていく平衡状態になっている。ラップをされたコップのような閉じた系では、同位体の動きも平衡状態に達する。他方、蒸発すればその分、補充し続ける系の場合、つねにコップの外からは水のインプットがあり、塩水の表面からはコップの外に水蒸気が抜けている。この場合、前者と異なり、系は閉じてはおらず、蒸発による塩水を濃くしようとする働きが外部からの水の流入によって見かけ上、相殺されている。同位体の場合も同じで、外部からの流入がなければ、レイリーの式に従って徐々に重い同位体が濃縮されるプールが、系外からの軽い同位体比の流入によって、ある同位体比に維持されている場合がある。

次に、このようにして維持されたある場所のさまざまな生物や無機体の同位体比を測定、比較することの意義について考える。それは、屋外に置いてある数多くのコップの塩水の濃さを味見しているのに似ている。塩辛いコップの場合、1) 元から塩辛い水が入っており、ずっとラップで蓋されていた、2) 元はそれほど塩辛くなかったが、水が蒸発し塩辛くなった時点でラップがかけられ、その状態が維持されていた、3) 元はそれほど塩辛くなかったが、その後蒸発して今より塩辛くなったが、最近降った雨がコップの中に入り、今の塩分濃度まで薄まった、などの推論ができる。この3種類の推論のどれが正しいかは、最初の塩水の量と残っていた塩水の量が分かっている場合、ある程度絞り込める。1) の場合、塩水の量は最初と味見の時点でほとんど変化していないのに対し、2) および3) の場合、味見時点の塩水の量は最初の時より減少しているはずである。また、そのコップにラップが掛けられたかどうかから2) と3) を区別できる。ここで、大切なことは塩辛さだけでは3つのプロセスのどれによってその塩辛さになったか絞り込め

ないが、塩水の量やコップがラップされていた期間の有無などの情報を組み合わせることでより深い解析が可能となる点である。

同位体比の解析にもよく似た特徴があり、物質の同位体比の情報に加えて、その物質の量や生成、分解メカニズムを考慮することで、より深く食物連鎖構造や物質循環プロセスを解明できる。

例えの1) の場合のように、閉じた系と考えられる場合、その物質の同位体比は温度や体積など物理パラメーターから予測可能な同位体比の変動パターンを示す。地球全体レベルの空間的広がりをもつ、大気中のガスと海洋中の溶存ガスの同位体比の違いは気相と液相の間に成立する同位体交換平衡によって大まかには説明できることから、過去の大気中のガスや堆積物中の物質の同位体比の変化から地球の平均気温の推移を再現できたりする。

例え2), 3) の場合はより複雑で、雨(例え)にあたる外部から系内への物質の流入があるかどうかやそれがどれぐらいの頻度で系内の同位体組成にどの程度の大きな変化をもたらしたか、の情報を得ることができる。しかし、流入する物質の量、頻度を見積もる場合、最低でも系の大きさ、影響の受けやすさ、流入物質と流入前の物質の同位体比の違いなどに関する情報が必要となる。例えるなら、最初から入っていた塩水の量が多かったり、コップが壺のような形状で塩水の空気に触れる面積が体積にくらべて非常に小さかったりした場合には、他のコップと同じ時間野外に置かれていたとしても、蒸発の影響は受けにくい。また、同じ一滴の雨でも小さなコップの塩辛い塩水は大きく薄められるが、大きなコップのそれほど塩辛くない塩水はあまり変化しないといった現象と似ている。生物を含めた有機物、無機物の同位体比はこの例え2), 3) によく似たプロセスで決まっている。ある種の生物の窒素同位体比に着目した場合、生物体は餌より約3.3%だけ重い窒素同位体(^{15}N)を蓄積しているが、これは餌より ^{15}N を少ししか含まない物質を排泄し、生物体に ^{15}N を蓄積させる働き(例えでは蒸発に相当)と生物体より ^{15}N を少ししか含まない餌由来の物質が生物体に入ってくる効果(例えでは雨水が入るに相当)とが釣り合った均衡点である。そういう意味で生物の窒素同位体比は例え3) のようなメカニズムによって維持されている。

従って、ある生物体の同位体比が大きく低下した場合(例えでは塩分濃度が大きく薄まった場合)、低い同位体比の餌を食べるようになった(例えでは雨が大量に降ってきた)と考えられる。しかし、その生物が小さく、高

い活性をもっている場合には (たとえば小さなコップの塩辛い水のケースに相当), たまたま同位体比の違う餌を最近一回食べたに過ぎないかもしれないし, 逆にサイズが大きく, 代謝の低い生物の場合には, 長年にわたる餌資源の変化という生物学的に非常に意義深いものを示唆している.

第二節 安定同位体自然存在比 (δ (デルタ) 値) の定義とその変動メカニズム (理論的側面)

安定同位体自然存在比の計算方法

同位体には放射性同位体と安定同位体が存在する. 例えば炭素原子には, 放射性同位体である ^{14}C と安定同位体である ^{13}C と ^{12}C の計3種類の同位体が存在する. 放射性同位体は放射線を放出し, 原子固有の半減期で崩壊していくが, 安定同位体はきわめて安定で地球全体の炭素, 窒素安定同位体の量, 比はその形成当時から変化していないと考えられている. 生元素 (生物体の中に豊富に含まれる元素) の中ではリン以外の多くの元素で複数の安定同位体の存在が確かめられている. 例えば, 水素(D, H), 炭素(^{13}C , ^{12}C), 窒素(^{15}N , ^{14}N), 酸素(^{18}O , ^{17}O , ^{16}O), 硫黄(^{34}S , ^{33}S , ^{32}S)といった安定同位体が存在する (和田 1997).

測定試料の炭素の安定同位体自然存在比は

$$\delta^{13}\text{C} = \{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C}_{\text{試料}}) / (^{13}\text{C}/^{12}\text{C}_{\text{PDB}}) - 1\} \times 10^3$$

測定試料の窒素の安定同位体自然存在比は

$$\delta^{15}\text{N} = \{(^{15}\text{N}/^{14}\text{N}_{\text{試料}}) / (^{15}\text{N}/^{14}\text{N}_{\text{大気}}) - 1\} \times 10^3$$

で表される. 質量の重い同位体と軽い同位体の試料中の存在比を標準試料中の存在比で割った値の1からの差異を‰ (1000 分比) で表したものである. 標準物質としては多量にあって, 変化の少ないものが選ばれており, 炭素同位体比の場合はアメリカカリフォルニア州のPD層という地層中のベレムナイトという CaCO_3 を主成分とする生物化石 (PDB), 窒素同位体比は大気中の窒素ガスである. 同位体存在量の微小な変動を扱う安定同位体自然存在比の研究では atom % のかわりにこの δ 値を使用する. 標準物質と同じ安定同位体比であれば, δ 値はゼロになり, 重い同位体が多く含まれていればプラスになり, 軽い同位体が多ければマイナスになるパラメーターである (和田 1993).

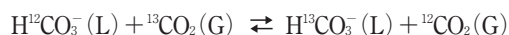
安定同位体自然存在比の変動メカニズム (理論的側面)

あらゆる物質の安定同位体自然存在比はそれを生み出した基質となる物質の自然存在比に強く影響されるのは

もちろん, 物質が生み出される過程での2つのメカニズム, 同位体交換平衡と速度論的同位体効果により強く規定される. 同位体交換平衡も速度論的同位体効果もすべて, 重い安定同位体と軽い安定同位体の反応速度が異なることに起因し, その簡単なイメージは塩水の蒸発の例えで先述した.

同位体交換平衡

平衡状態にある反応では, 平衡の右辺と左辺の物質中の同位体比は, 様々な平衡状態で異なることが知られている (Wada et al. 1995). 例えば, 炭酸ガスと炭酸水素イオンが以下のような平衡状態にある場合,



$$\text{平衡定数} K = \frac{[\text{H}^{13}\text{CO}_3^- (\text{L})] \cdot [^{12}\text{CO}_2 (\text{G})]}{[\text{H}^{12}\text{CO}_3^- (\text{L})] \cdot [^{13}\text{CO}_2 (\text{G})]}$$

ただし, L: 液相, G: 気相である.

平衡定数 K は 30℃で 1.0071 であるため, 平衡は右に片寄っており, $\delta^{13}\text{C}$ 値は液相に溶け込んだ炭酸水素イオンにおいてより高い. この事実は地球上の生物の炭素安定同位体比 ($\delta^{13}\text{C}$) に重要な影響を与えており, 水生植物と陸生植物の $\delta^{13}\text{C}$ の違いの一因ともなっている. (和田 1986). 同様の同位体交換平衡は粘土粒子に吸着したアンモニウム塩と液相に溶存したアンモニウム塩などミクロスケールでも多数存在しており (Högberg 1997), 生物が基質として利用する物質の同位体比を支配している.

速度論的同位体効果

速度論的同位体効果は生物体内の代謝, 微生物による無機化反応, 酸化還元反応などあらゆる反応で生じる. 反応の基質と生成物の同位体組成が異なる場合に速度論的同位体効果が存在するといひ, その程度は $\delta_{\text{生成物}} - \delta_{\text{基質}}$ で表示される. 基質の一部が反応して生成物となるような反応では常になんらかの速度論的同位体効果が生じている. この速度論的同位体効果は重い安定同位体と軽い安定同位体の反応速度が異なることに起因し, その反応速度の違いは同位体分別係数 α (生成物中の重い同位体と軽い同位体の存在比÷基質中の重い同位体と軽い同位体の存在比) で表示され, 反応固有の値である (Mariotti et al. 1981; 田瀬 1997; 和田 1986). $\alpha > 1$ の反応では重い同位体が, $\alpha < 1$ の反応では軽い同位体により速く反応することを意味し, $\alpha < 1$ の反応では, $\delta_{\text{生成物}} - \delta_{\text{基質}}$ はマイナスの値 ($\div 1000 \ln \alpha$ (‰)) になる. α 自体は酵素反応固有の値であり, 酵素の種類が変わらない限り変化せず, 基質や生成物の濃度に影響されない値である. しかしながら, 実際の生物反応などが速度論的同位体効果

によって決まっていると言ったとしても、同じ酵素系で代謝している生物では、生物種に関係なく見かけの生成物と基質の同位体比の差が $1000 \ln \alpha$ (‰) と一定しているわけではない。その詳しい理由は次の見かけの同位体分別効果の説明を参照して頂きたい。

見かけの同位体分別（レイリーの非定常モデルを引用して）

生物体内では基質の濃度は常に高濃度ではなく、時には生物種、時間、場所によって基質の利用される割合 f が異なっていたり、酵素反応部位までの拡散抵抗が異なっていたりする。その場合、 α 自体は酵素反応固有の値であり、変化しないが、基質と生成物の見かけの同位体比の差 (Δ 値) は、基質の供給速度と生成物へと反応する基質の割合によってさまざまな値をとりうる。一般に、基質中の f が反応して生成物となり、残りの $1-f$ が基質として残っている場合、

$$\begin{aligned}\delta_{\text{生成物}} &= \delta_{\text{基質}, t=0} + (\alpha - 1) \times 10^3 \times ((1-f)/f) \times \ln(1-f) \\ \delta_{\text{基質}} &= \delta_{\text{基質}, t=0} - (\alpha - 1) \times 10^3 \times \ln(1-f)\end{aligned}$$

となる (Mariotti et al. 1981; 田瀬 1997)。当然、すべての基質が生成物となった場合 ($f=1$)、 $\delta_{\text{生成物}}$ は反応開始前の $\delta_{\text{基質}, t=0}$ と等しくなり、見かけ上、速度論的同位体効果は起こらない。このモデルはレイリーモデルと呼ばれ、閉じた系で反応が進行する際の同位体比の変化を記述した非定常モデルである。しかしながら、この考え方自体は、先の同位体交換平衡や速度論的同位体効果が複雑にからみあった生物反応自体での生成物の同位体比の変化を予測するのに有効である。例えば、反応が基質供給速度によって律速されているような場合には、非常に小さな効果しかもたないことを意味する。逆に反応速度に比して基質が無限に多いと仮定できる場合 ($f \rightarrow 0$) にもっとも大きく現れる (和田 1986; 吉岡 1997)。通常、定常モデルで記述される光合成の場合も、実際は光合成活性や拡散抵抗といった光合成環境の変化により、一枚の葉の中でもさまざまな新しい定常状態へと変化し続けている。その際の同位体比の変化を推理する際にレイリーモデルは非常に有効である。例えば、光合成活性が非常に高い時や水ストレスを受けて気孔を閉じている植物では、光合成基質が欠乏し、見かけの同位体効果が小さい。Rubisco による光合成反応の α は 0.970 と小さく、 $\delta^{13}\text{C}_{\text{生成物}}$ は基質である大気由来の炭酸ガスの $\delta^{13}\text{C}$ 値より低くなるが、見かけの同位体効果が減少するということは $\delta^{13}\text{C}_{\text{生成物}}$ が上昇することを意味する。植物体の $\delta^{13}\text{C}$ 値が光合成活性や水ストレスと正の相関をするのはそうした理由から

である (Farquhar et al. 1989; Hanba et al. 1996, 1997)。

第三節 水生生物群集の $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ を決定する要因

水生生物の $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ は究極的にはその生態系を支える一次生産者（植物）の δ 値によって支配されている。そこで、はじめに水草や藻類をはじめとする植物体の $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ を規定する環境要因について議論し、次に従属栄養生物の δ 値の変動要因について述べる。

植物体の $\delta^{13}\text{C}$

植物体の $\delta^{13}\text{C}$ は光合成基質である溶存無機炭素の $\delta^{13}\text{C}$ と無機態炭素の拡散抵抗および光合成反応での同位体分別によって決定される。同位体交換平衡の項目で説明したように、陸生植物の $\delta^{13}\text{C}$ は一般的に海産藻類および植物プランクトンのそれより低くなっており、陸域起源の推定に使用される (Coffin et al. 1994; Fry & Sherr 1984)。しかし、海洋と異なり湖沼など小水系では、大気中の炭酸ガスと同位体交換平衡になっていないことが多い。底泥から有機物の分解によって発生する炭酸ガスの $\delta^{13}\text{C}$ (大気由来の溶存無機炭素の $\delta^{13}\text{C}$ より 10-20‰低い) の影響を強く受け、溶存無機炭素の $\delta^{13}\text{C}$ が -20‰程度まで低下することがあり (Finlay 2003)、湖沼や河川の水生植物（水草、藻類など）は陸生植物の $\delta^{13}\text{C}$ より必ずしも高くなるわけではない (France 2000)。底泥付近の沈水植物の $\delta^{13}\text{C}$ が非常に低い値になることがあるのはこのことによる。また、光合成の際の同位体分別に関して言えば、Rubisco により炭酸ガスを固定する C_3 植物（すべての樹木と広葉草本、水草のほとんど）では、基質の炭酸ガスより 10 から 20‰ほど低くなるのに対し、PEP カルボキシラーゼによって炭酸ガスを固定する C_4 植物では、高い CO_2 利用効率のために同位体分別がほとんど生じない。その結果、 C_4 植物の $\delta^{13}\text{C}$ は C_3 植物に比べ 15‰程度高くなることから、従属栄養生物の $\delta^{13}\text{C}$ を測定することで、どちらがどの程度食物連鎖を支えているかを議論することができる (Michener & Schell 1994)。

植物体の $\delta^{15}\text{N}$

植物体の $\delta^{15}\text{N}$ は基質である無機態窒素の $\delta^{15}\text{N}$ によって大きく規定される。例えば、マメ科植物の多くは大気中の N_2 ガス ($\delta^{15}\text{N} = 0$ ‰) を窒素固定によって取り込むことから、その $\delta^{15}\text{N}$ は 0 ‰付近の値となる (木庭ほか 1999; 米山ほか 1994)。一方、その他の植物は一般に硝酸態やアンモニア態といった無機態窒素を窒素源として吸収し同化する。植物によってはアンモニア態窒素と硝

酸態窒素を吸収させた際の見かけの同位体分別の異なる場合も知られており(米山ほか 1994; Yoneyama et al. 1991), 各種植物の $\delta^{15}\text{N}$ 値から窒素栄養塩としてどちらが重要か知ることができる可能性がある。アンモニア揮散や脱窒と呼ばれる無機化過程においても速度論的同位体分別が存在し(高橋 1996; 和田 1986), こうした無機化反応が促進される汚水や富栄養化した湖では, 硝酸の $\delta^{15}\text{N}$ は 10% を超える程度にまで上昇し, ひいては植物体の $\delta^{15}\text{N}$ も高くなる (Mizutani & Wada 1985; 和田 1986). 窒素欠乏下では供給律速になるため, 同位体分別は生じにくい (山田・吉岡 1999). また, 河川上流や貧栄養湖では, 主たる窒素供給が $\delta^{15}\text{N}$ の低い窒素固定や降水中の無機態窒素に依存しているため, 植物体の $\delta^{15}\text{N}$ は 0% 以下の低い値を示すことが多い (Bauer et al. 2000; 和田 1986).

従属栄養生物(動物や微生物)の $\delta^{13}\text{C}$

動物の $\delta^{13}\text{C}$ は, 食物資源である植物由来の有機物の $\delta^{13}\text{C}$ とほぼ同じ値(正確には平均で 0.8% 程度の濃縮)をとることが多いことから, 食物連鎖を支える一次生産者を特定するのに使用される(南川 1997; 小川ほか 1997). しかしながら, 真菌類の中には分解基質に対して 5.0% 程度の濃縮を示すものがあり, 微生物食物網 (Microbial loop) の解析の際には注意を要する (Kohzu et al. 1999). また, 魚類の一部では体脂肪率の非常に高い種がしばしば存在する. $\delta^{13}\text{C}$ の低い炭素原子が脂肪合成に使用されるため (DeNiro & Epstein 1977; 和田・半場 1994), 脱脂処理を行わずにこういった脂肪含有率の高い身体の一部のみを解析すると餌資源の $\delta^{13}\text{C}$ を誤って推定する可能性が高い.

従属栄養生物(動物や微生物)の $\delta^{15}\text{N}$

従属栄養生物の $\delta^{15}\text{N}$ も餌資源の $\delta^{15}\text{N}$ に大きく規定されているが, 従属栄養生物は, $\delta^{15}\text{N}$ の低いアンモニア, 尿酸, 尿素を排出するために生物体は食物資源に比べて, 3.1 から 3.5% 程度 $\delta^{15}\text{N}$ が高くなる. 水生生物の場合, 平均で食物連鎖栄養段階 (TL) が 1 段階上がるごとに 3.3% 程度濃縮する. 例えば, 植物プランクトン (一次生産者; TL=1), 動物プランクトン (一次消費者; TL=2), 魚類 (二次消費者; TL=3) の単純な食物連鎖の場合,

$$\begin{aligned} \delta^{15}\text{N}(\text{動物プランクトン}_{\text{TL}=2}) \\ = \delta^{15}\text{N}(\text{植物プランクトン}_{\text{TL}=1}) + 3.3 \end{aligned}$$

$$\delta^{15}\text{N}(\text{魚類}_{\text{TL}=3}) = \delta^{15}\text{N}(\text{植物プランクトン}_{\text{TL}=1}) + 6.6$$

となる. 単純には, $\delta^{15}\text{N}(\text{生物}_{\text{TL}=n}) = \delta^{15}\text{N}(\text{一次生産者}_{\text{TL}=1})$

+ 3.3(n-1) となるため, ある生物とその生態系の一次生産者の $\delta^{15}\text{N}$ がわかっている時には,

$$\begin{aligned} \text{その生物の食物連鎖段階}(n) = \{(\text{その生物体の } \delta^{15}\text{N}) \\ - (\text{一次生産者の } \delta^{15}\text{N})\} / 3.3 + 1 \end{aligned}$$

という式が食物網解析ではよく使われる (南川 1997; Minagawa & Wada 1984; 小川ほか 1997). この ^{15}N の濃縮現象を生物体内のさまざまなアミノ酸ごとに調べるとその濃縮の程度は 0 から 7% とアミノ酸の種類により大きく異なる (McClelland & Montoya 2002; 米山ほか 2002). また, アミノ酸分画とタンパク質分画は良く似た $\delta^{15}\text{N}$ を示すが, キチン質の $\delta^{15}\text{N}$ は 8% 程度それより低い値を示すことが知られている (Högberg 1997; Taylor et al. 1997).

第四節 環境解析を目的とした安定同位体比の測定とその解釈および問題点

今後, さまざまな河川修復, 復元事業が日本各地で行われると期待されるが, 河川への働きかけが河川環境をどのように復元したかを適切に評価することが求められる. 第一節でも議論したように河川環境は河川の生物のみならず, 物理構造⇔水質⇔生物という相互作用しあう各環境要素の総体として捉えられている. その意味で河川環境の復元を適切に評価するには, これらすべての環境要素の変化を解析でき, 物質の起源やその生成プロセスに関する総合的な情報を与える安定同位体比の変化をモニタリングすることが, 今後ますます重要になると考えられる. 単に同位体比が簡単に測定でき, 環境変動を鋭敏に反映するという利点だけでなく, 同位体比の変動の多くは生物循環 (生物が関与する物質移動, 代謝などを含む) をモニタリングするのに適したパラメーターである. 以下では, 河川の蛇行復元実験の行われた標津川の例を交えながら, 将来的に復元状態の評価に資する同位体解析を目標に, 同位体比による解析を紹介する. ここでは特に「食う食われる」の関係による物質移動すなわち食物網構造について議論したい. 従来の生物学, 生態学では観察や胃内容物から生物の餌資源を特定してきたが (Nakano et al. 1999; Kawaguchi & Nakano 2001), これらはある一時点での情報にすぎず, 長期間にわたる調査をしなければ具体的にどの餌資源が重要かといった議論は困難であった. また, 実際にその餌資源が吸収されているかどうか (血や肉になっているかどうか) の検証は困難であった. 同位体比による解析では, こういっ

た欠点を補完できる。

同位体比による食物網構造の解析は $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$ によるものが主流であり、 $\delta^{13}\text{C}$ と $\delta^{15}\text{N}$ を両軸とした二次元散布図上に各生物種の同位体特性をプロットしていくことで解析される。生物体の δ 値はその生物体が消化吸収している餌資源の δ 値に大きく規定され、

$$\Delta\delta^{13}\text{C}(=\delta^{13}\text{C}_{\text{生物体}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{餌資源}}) \text{ は } -1 \text{ から } +2.0\%,$$

$$\Delta\delta^{15}\text{N}(=\delta^{15}\text{N}_{\text{生物体}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{餌資源}}) \text{ は } +2.0 \text{ から } +5.0\%,$$

程度の値をとる (Peterson & Fry 1987)。水系の生物では平均的には $\Delta\delta^{13}\text{C}=0.8\%$ 、 $\Delta\delta^{15}\text{N}=3.3\%$ 程度であることから、食う食われる関係が1:1対応している食物連鎖上の生物群集は $\delta^{13}\text{C}$ を横軸、 $\delta^{15}\text{N}$ を縦軸とした二次元上では傾き4.1(=3.3/0.8)の直線上にプロットされる (南川 1997; 山田・吉岡 1999; Yoshii et al. 1999)。したがって、単純にはこの傾き4.1のラインが何本あるかで、その食物網構造の中に何種類の食物連鎖が存在しているかを議論することが可能となる。また、幅広い食性をもった雑食の生物で占められた食物網構造だと、 $\delta^{13}\text{C}$

と $\delta^{15}\text{N}$ との二次元上ではそれほどきれいにラインが見えないことも多い (南川 1997)。こういった知見を活用することで、たとえばFig.1 (食物網構造の変遷に伴う生物体の炭素、窒素安定同位体比の変動パターンの模式図) に示すような河川環境改変後の食物網構造のさまざまな変化を検出することができる。実際に人為攪乱を受けた河川生態系では、これらの変化が複数組み合わせられた同位体分布パターンを示すことが多いと考えられる。

標津川の再蛇行化実験では、実験が河川の食物網構造に与えた影響を安定同位体比から導き出すことが目標の一つである。現時点では、連結前の本川と河跡湖の生物体の同位体特性には違いのあることが明らかになり、 $\delta^{13}\text{C}$ と $\delta^{15}\text{N}$ との二次元上で両者の食物網構造の違いを示すことができた (Fig. 2, 3)。具体的には、実験以前から存在する直線河川である標津川本川では、付着藻類の $\delta^{13}\text{C}$ が大きく変動するが、その分布中心は流下粒状有機物のそれとほぼ等しいと考えられた。また、これらの分布中心から伸ばした傾き4.1のラインが水生昆虫、魚類群集の分布中心を通ることも明らかなことから、付着藻類および流下粒状有機物がTL=1、水生昆虫がTL=2、

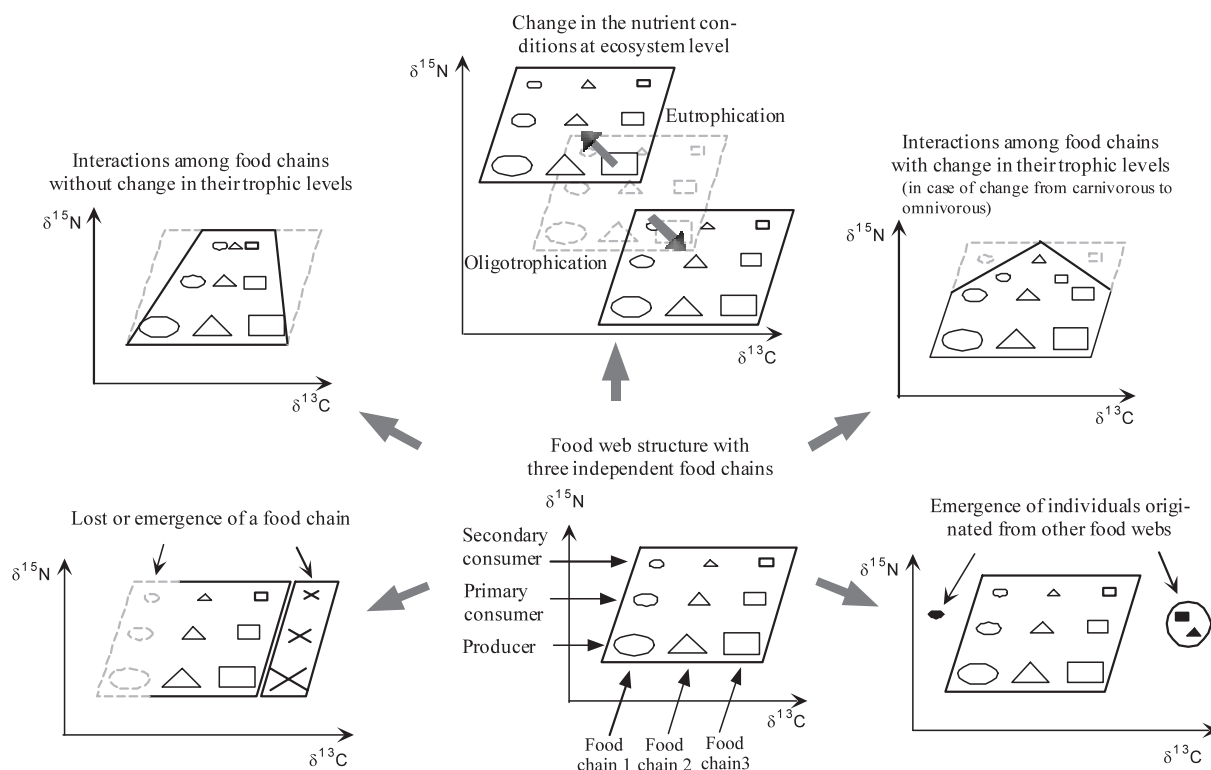


Fig. 1. Various patterns in isotopic shift of organisms indicating the transition of food web structure. Mid-lower diagram shows initial isotopic signature characteristic to a simple food web structure with three independent food chains. Each symbol corresponds to a functional group that depends on similar nutrition. Individual food chain consists of symbols with the same shape, whose size decreases with increasing trophic level.

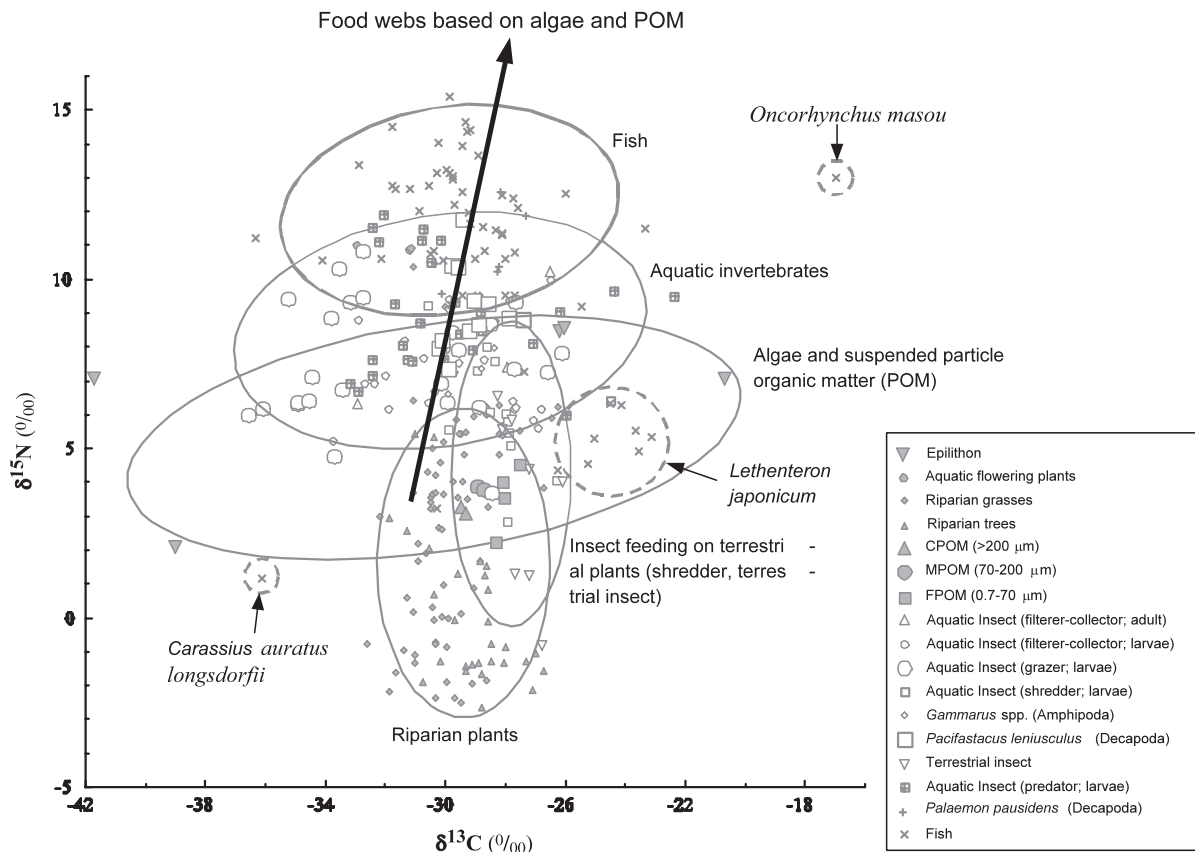


Fig. 2. Carbon and nitrogen isotope ratios of organisms collected during two survey periods (20th July–10th August in 2001 and 2002) in the Shibetsu River main stream. Isotopic signatures of representative primary producers, primary consumers and secondary consumers are shown on the $\delta^{13}\text{C}$ vs. $\delta^{15}\text{N}$ plots. Ellipses indicate rough distribution of different functional groups.

魚類が TL=3 の食物連鎖が形成されていることが分かった。一方, shredder と呼ばれる水生昆虫や陸生昆虫は河畔植物を主たる餌資源としていることが示唆された。また, ギンフナ (*Carassius auratus longsdorffii*) やサクラマス (*Oncorhynchus masou*) の一部の個体およびカワヤツメ (*Lethenteron japonicum*) のアンモニーテス幼生(懸濁有機物食)は魚類群集の分布中心とは大きく異なる同位体特性(破線の楕円で表示)を示したことから, こういった魚種では食性が大きく異なるか, 上流もしくは下流の異なる生態系から移動してきた個体と考えられた (Fig. 2)。一方, 河跡湖では $\delta^{13}\text{C}$ の高い水草やアオミドロが存在し, それと同程度に $\delta^{13}\text{C}$ の高いユスリカ群集の存在も確認された。また, 河跡湖の粒状有機物の $\delta^{13}\text{C}$ は低く, ミズダニやタヌキモなど動物プランクトンを餌資源としていると考えられる生物体の $\delta^{13}\text{C}$ も低いことから, 植物プランクトン起源の粒状有機物の $\delta^{13}\text{C}$ が低くなっていると考えられた。この粒状有機物の $\delta^{13}\text{C}$ vs. $\delta^{15}\text{N}$ 二次元

上での分布中心から伸ばした傾き 4.1 のラインが魚類群集の分布中心を通ることも明らかとなった (Fig. 3)。この相違点は止水生態系と流水生態系の違いに根ざすところが大きく, 以下のような食物網構造の違いがあると考えられた。

1. 植物プランクトンからはじまる食物連鎖が河跡湖には存在し, それが魚類群集を支えているが, 標津川本川の魚類群集は付着藻類や流下粒状有機物を餌資源とする水生昆虫によって支えられていた。

2. 標津川本川では明らかに河口からの遡上や, 上流から移動してきたと考えられる魚類個体が存在しているのに対し, 河跡湖ではそのような魚類個体はみられなかった。

3. 水草や大型藻類からはじまる食物連鎖が河跡湖には存在するが, 本川には存在しなかった。

以上, 今回は止水生態系と流水生態系という大きく物理環境の異なる 2 つの食物網構造の評価に同位体解析が

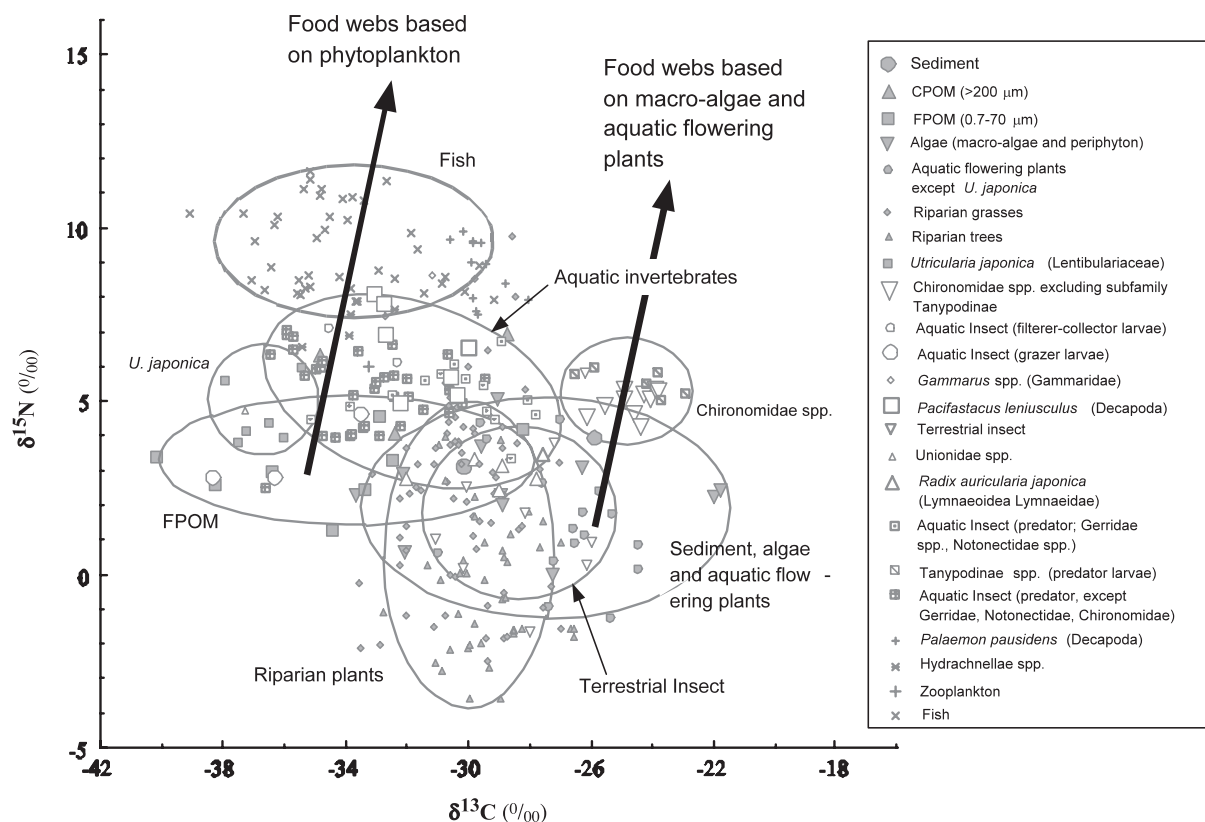


Fig. 3. Carbon and nitrogen isotope ratios of organisms collected during two periods of time (20th July–10th August in 2001 and 2002) in one of the oxbow lakes along the Shibetsu River. Isotopic signatures of representative primary producers, primary consumers and secondary consumers are shown on the $\delta^{13}\text{C}$ vs. $\delta^{15}\text{N}$ plots. Ellipses indicate rough distribution of different functional groups. Two kinds of food chains based on phytoplankton and aquatic macrophyte were identified as indicated by arrows.

有効であることを示した。今後、異なる流水生態系間の総合的環境評価に資する同位体解析を目指して、多様な河川生態系の生物、有機物、無機物の同位体分布パターンに関する知識の集積が求められている。

環境評価のツールとしての安定同位体比測定法の利点と限界

安定同位体自然存在比測定法の優れた点—トレーサー法としての同位体利用と比較して—

生態系内の物質の動きを調べるより有名な方法がトレーサー法によるものである。トレーサー法とは自然界に通常わずかしき存在しない原子や重い同位体を、研究対象に取り込ませ、その動きを調べる方法である。研究対象が生物の場合には、その生物に餌や栄養塩の形で施与し、吸収させトレーサー原子を生物体に同化させる。炭素動態の解析には放射性同位体 ^{14}C 、窒素動態なら安定同

位体の ^{15}N を取り込ませるのが一般的である（三井ほか1980）。トレーサー法の方が考え方が簡潔である分、データ解釈にも推測の入り込む余地は少ないが、安定同位体自然存在比測定法はトレーサー法にはない以下のような優れた点を持っている。

（１）物質添加による攪乱が無い：トレーサー物質を添加するという行為そのものが自然界を攪乱する。特に、トレーサー物質がその場の生物生産を律速しているような栄養塩である場合は物質循環を変化させる場合が多々あり、注意が必要である。ナチュラルトレーサーとよばれる安定同位体の自然存在比を測定するだけならば、こうした物質添加をして解析する必要が無い。

（２）大規模空間スケールの現象を扱える：トレーサー物質の添加はコストが高いため、大規模空間スケールの現象を扱うことは経済的に困難である。一方、自然存在比測定法では、固体粉末試料の場合、 $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$ の同時分析をサンプルあたり８分程度、コストも４００円以下で自

動でできるようになったため、多数の生物、有機物試料を解析する必要のある大規模空間スケールの現象を扱うことができる。

(3) 回転速度の遅い、物質フローを調査できる：トレーサー物質は一旦施与してしまうと、物質循環によりその場の生物、有機物のトレーサー濃度を上げてしまうため、何度もトレーサー物質を施与することはその場をトレーサー物質で汚染させる。トレーサー法で回転速度の遅い、物質フローを調査するには、長期に渡り、何度もトレーサー物質を施与しなければならないが、これは経済的コストが高いばかりでなく、トレーサー汚染を進行させ、バックグラウンドのトレーサー濃度を上げ、解析を困難にする。安定同位体自然存在比を測定するだけならば、こうした心配をする必要が無い。

(4) 過去の生態系を復元できる：標本や堆積物など限られた手がかりから過去の生態系を復元する場合、当然のことながら、その過去に生きていた生物や物質循環システムはその機能を停止し、それらの痕跡が分子や原子として標本や堆積物中に保存されているだけである。したがって、トレーサー物質を取り込ませなければならないトレーサー法はこうした解析には無力であるのに対し、同位体比測定法では標本や堆積物中に保存された分子や原子の同位体組成からそれらが機能し、生成された当時の環境を推測できる

以上のような理由により、安定同位体自然存在比測定法が生態系の物質動態研究のもう1つの重要な解析手法になりつつある。

安定同位体自然存在比測定法の優れた点—同位体を利用しない伝統的な解析法と比較して—

(1) 実質的な餌資源解析が可能：従来の胃内容物検査や糞内容物の分析では餌資源を明らかにできない生物が多い。例えば、大型動物の場合、捕獲解剖しなければならないので、餌資源は胃内容解析よりは摂食行動を観察したり、糞の内容物を分析することで明らかにされてきたが、警戒心の強いこうした動物は遠くからの観察をよぎなくされたり、糞の場合はいつどの個体のしたものなのか特定することが困難であった。また、プラナリアや小型節足動物のような胃内容や糞を観察してもその中身を特定できない生物や、菌類や植物のようにそもそも胃や糞といった観察対象が存在しない生物の場合にはこうした方法は使用できなかった。それに比べ、同位体比による解析法では、生物体を構成する元素からの情報であるので、伝統的手法のように摂食したことは明らかでも本当に消化吸收されたかどうかという点で疑問が残ると

いうことは無く、また植物、微生物、動物を含めた幅広い生物を対象としたより正確な物の流れとして食物網をとらえることができる。

(2) 複雑な食物網を視覚化できる：標津川での研究事例からも明らかなように、広範囲の生物試料、有機物の解析が可能のため、食物網の底辺から上位の生物に至る幅広く、複雑な食物網構造を $\delta^{13}\text{C}$ vs. $\delta^{15}\text{N}$ の二次元散布図上で視覚的にとらえることができる。各生物種のバイオマス量や出現頻度などのデータが利用できる場合は、各種の群集全体に対するバイオマス平均をとった群集全体の同位体比の平均値を算出でき、機能群集レベルの物質フローの変化を議論できる。

(3) 高い測定精度を前提条件とする同位体分析は環境変動を感度よく検出できる： $\delta^{13}\text{C}$ や $\delta^{15}\text{N}$ の測定精度は0.01‰の違いを明らかにできるレベルにまで向上している。これは有効数字7桁という非常に高い測定精度であり、いろいろな物質動態の変化が同位体比の変動となって検出できる。通常の生態学やマクロ生物学で用いられてきた個体数や長さといったパラメーターは有効数字の桁数が3桁程度で少なく、その場で起こっている現象のほんの一部しか反映しない。しかしながら、長さでも例えば μm レベルで樹木の胸高直径測定すれば、その日の天気や光合成活性(蒸散速度)、気温など多くの環境変化を反映する優れた環境解析パラメーターとなることが分かっていた(中静 未発表)。同様に、同位体比の自然界での変動幅は測定精度の数千倍近い大きさをもっており、潜在的にさまざまな環境変動を反映しうる優れた解析法である。

(4) 生物体に限らずガス態や溶存態の試料も解析できる：生態系の物質循環の多くは目に見えない微生物による無機化、ガス化、有機化などによって支えられている。こうした物質循環のすべてを含めた循環という意味で地球化学的循環という言葉を使うが、 $\delta^{13}\text{C}$ や $\delta^{15}\text{N}$ によって、以下のような地球化学的循環プロセスの解析ができる。メタン発酵のプロセス($\text{CH}_3\text{COOH} \rightarrow \text{CH}_4$ か $\text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4$)、メタン酸化($\text{CH}_4 \rightarrow \text{CO}_2$)の活性、光合成($\text{CO}_2 \rightarrow \text{Organic-C}$)の活性、脱窒反応($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$)やアンモニア揮散($\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NH}_3$)の活性(Grossman et al. 2002; Sugimoto & Wada 1993; 和田 1997; Boontanon et al. 2001; 和田 1986)。

生物、有機物の安定同位体解析の限界と対処方法

(1) 多時点、多地点の関連生物・物質の同位体解析が必要：先述の議論からもわかるように一般に同位体比の変動要因が複数考えられることがほとんどで、限られた

同位体比のデータからはその変動要因を絞り込めないことが多い。特に食物網解析の場合には、ある地点の一時点で採集された生物試料の同位体分析だけでは、複数の餌資源が同じような同位体比になり、その中でどれがより重要かを議論できないということがよくある。また、生物の餌資源のすべてを必ずしもサンプリングできるわけではないので、常に重要な餌資源の試料が得られていない可能性を考えなければならない。こういった場合には、別の季節にサンプリングしたり、調査地点を増やす必要がある。なぜなら、場所や時間が変化すると餌資源の同位体比はさまざまに変化し、そうした変化のうち、どの餌資源の同位体比に鋭敏に反応して生物の同位体比が変動するかを統計学的に分散分析や主成分分析をはじめとする多変量解析によって解析できるからである。それでも餌資源の間に十分な同位体比の違いの見られない場合には、 $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$ だけでなく $\delta^{34}\text{S}$ など他の同位体比のデータを増やすか、個々の餌資源中の必須アミノ酸の含有率などを計測し、生物体の必須アミノ酸の要求量から規定条件を増やす必要がある（南川 未発表）。

（２）有機物の同位体比だけでは限られた議論しかできない：特定の消費者の餌資源解析は餌資源候補の同位体比を測定するだけで可能であるが、植物などの一次生産者がどういった栄養を吸収しているか、細菌や真菌など微生物から始まる腐食連鎖を解析するためには、有機物の同位体比だけでは困難である。そのためには、重炭酸塩をはじめとする溶存無機炭素の $\delta^{13}\text{C}$ や硝酸態やアンモニア態で溶存している無機窒素の $\delta^{15}\text{N}$ を測定する必要がある。こうした無機態の炭素、窒素の同位体測定は有機態固形試料のそれに比べて、時間労力を必要とするが、無機態栄養塩とそれを吸収している生物体の同位体比の差（ $\Delta\delta$ 値）から、その栄養塩が成長を律速しているか否かを判断でき、無機態栄養塩の同位体比そのものからは栄養塩が何に由来するものかについての情報が得られる。

（３）同位体測定の困難な生物や有機物が存在する：食物連鎖の底辺を支える生物の中には細菌、真菌、植物プランクトンのように１個体１個体は非常に小さく、また挟雑物が混入しやすいため、その同位体比を正確に測定できないものが多い。しかしながら、こうした生物は有機物の分解、生成を行い、物質循環解析の上で非常に重要な機能群集であることから、今後こういった生物の同位体比をモニタリングすることが河川環境を評価する上で重要になると考えられる。現在のオンラインの同位体測定では、質量分析計のイオン化効率や真空度を上げることで、より微量の固体粉末試料で測定が可能となっ

ている。また、細菌、真菌、藻類などは固有の分子マーカーを持っていることが多く、前処理でそうした分子マーカーをある程度精製し、GC/C/IRMSなどで分離して同位体比を測定することも可能である。こうした最先端の分析技術を駆使することで、微生物も含めた生物循環を安定同位体比から明らかにしていく努力が求められる。

謝 辞

本調査を行うにあたって、北海道開発局釧路開発建設部治水課、ならびに釧路開発建設部標津川事業所には便宜を図っていただいた。野生鮭研究所の小宮山英重氏、標津サーモン科学館の市村政樹学芸員ならびに職員の方々には、室内分析において便宜をはかっていただいた。また、北海道大学水産学部の後藤晃助教授そして同研究グループの方々には、魚類の同定に関する多くの情報を教えていただいた。（財）河川環境管理財団、（財）リバーフロント整備センターには、本調査を行うにあたり必要な人員の確保をしていただいた。株式会社エコニクスの上田重貴氏、相内雄大氏をはじめとする調査スタッフの方々、そして桑原禎知氏には、現地での野外調査を遂行していただいた。ここに記して深謝の意を表す。なお、本研究の一部は、（財）河川環境管理財団の河川整備基金による研究支援を受けた。

摘 要

第一節では、なじみの薄い安定同位体自然存在比による解析の有用性と、どういう理屈でそういった解析ができるのかについて、コップの中の塩水の例えを交えながら簡単に説明した。第二節では安定同位体自然存在比（ δ （デルタ）値）の定義とその変動メカニズムの理論的側面を概説した。生物も含めたあらゆる物質の同位体比は、それが生み出される餌資源や基質の同位体比によって大きく支配されているが、その際に重要となる同位体交換平衡と速度論的同位体効果の理論的側面を説明した。第三節では安定同位体比による河川の環境評価の際に特に重要になる水生生物の $\delta^{13}\text{C}$ および $\delta^{15}\text{N}$ の変動メカニズムとそれから読み取れる環境変動の特質について議論した。水生植物の $\delta^{13}\text{C}$ および $\delta^{15}\text{N}$ からは光合成活性、炭素循環、窒素欠乏および富栄養化といった河川環境の変化を知ることができる。第四節では標津川の蛇行復元実験の行われた標津川の本流と河跡湖の水生生物の炭素、窒素安定同位体比（ $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$ ）の測定結果を水生生物の同

位体変動要因から解釈することで、本流と河跡湖の食物網構造の違いを明らかにした。最後に同位体分析法の優れた特質と限界について議論した。安定同位体比による環境評価は、その優れた側面と限界を意識したサンプリングおよび考察を行ってはいじめて、正確で総合的な環境評価パラメーターとなる。

引用文献

- Bauer G. A., Gebauer G., Harrison A. F., Hogberg P., Hogbom L., Schinkel H., Taylor A. F. S., Novak M., Buzek F., Harkness D., Persson T. & Schulze E.-D. (2000) Biotic and abiotic controls over ecosystem cycling of stable natural nitrogen, carbon and sulphur isotopes. In: Carbon and nitrogen cycling in European forest ecosystems (ed. E.-D. Schulze), pp. 190-202. Springer-Verlag, Berlin.
- Bootanon Narin・高津文人・和田英太郎 (2001) 安定同位体比からみた琵琶湖における N_2O の生成機構. 月刊海洋 **33**(7): 511-517.
- Coffin R. B., Cifuentes L. A. & Elderidge P. M. (1994) The use of stable carbon isotopes to study microbial processes in estuaries. In: Stable isotopes in ecology and environmental science (eds. K. Lajtha, R. H. Michener), pp. 222-240. Blackwell Scientific Publications, London.
- DeNiro M. J. & Epstein S. (1977) Mechanism of carbon isotope fractionation associated with lipid synthesis. *Science* **197**: 261-263.
- Farquhar G. D., Hubick K. T., Cordon A. G. & Richards R. A. (1988) Carbon isotope fractionation and plant water-use efficiency. In: Stable isotopes in ecological research (eds. P. W. Rundel, J. R. Ehleringer, K. A. Nagy), pp. 21-40. Springer-Verlag, New York.
- Finlay J. C. (2003) Controls of streamwater dissolved inorganic carbon dynamics in a forested watershed. *Biogeochemistry* **62**: 231-252.
- France R. L. (2000) Comparing $\delta^{13}C$ among littoral foodwebs using lake DOC. *Aquatic Ecology* **34**: 445-448.
- Fry B. & Sherr E. B. (1984) $\delta^{13}C$ measurements as indicators of carbon flow in marine and freshwater ecosystems. *Contributions to Marine Science* **27**: 13-47.
- Grossman E. L., Cifuentes L. A. & Cozzarelli I. M. (2002) Anaerobic methane oxidation in a landfill-leachate plume. *Environmental science and technology* **36**(11): 2436-2442.
- Hanba Y. T., Matsui K. & Wada E. (1996) Solar radiation affects modern tree-ring $\delta^{13}C$: observations at a cool-temperate forest in Japan. *Isotopenpraxis Isotopes in Environmental and Health Studies* **32**: 55-62.
- Hanba Y. T., Mori S., Lei T. T., Koike T. & Wada E. (1997) Variation in leaf $\delta^{13}C$ along a vertical profile of irradiance in a temperate Japanese forest. *Oecologia* **110**: 253-261.
- Högberg P. (1997) ^{15}N natural abundance in soil-plant systems. *New Phytologist* **137**: 179-203.
- 木庭啓介・高橋和志・高津文人 (1999) 安定同位体比を用いた森林生態系における植物—土壌間の窒素動態研究. 日本生態学会誌 **49**: 47-51.
- Kawaguchi Y. & Nakano S. (2001) Contribution of terrestrial invertebrates to the annual resource budget for salmonids in forest and grassland reaches of a headwater stream. *Freshwater Biology* **46**(3): 303-316.
- Kohzu A., Yoshioka T., Ando T., Takahashhi M., Koba K. & Wada E. (1999) Natural ^{13}C and ^{15}N abundance of field-collected fungi and their ecological implications. *New Phytologist* **144**: 323-330.
- Mariotti A., Germon J. C., Hubert P., Kaiser P., Letolle R., Tardieux A. & Tardieux P. (1981) Experimental determination of nitrogen kinetic isotope fractionation: some principles; illustration for the denitrification and nitrification processes. *Plant and soil* **62**: 413-430.
- McClelland J. W. & Montoya J. P. (2002) Trophic relationships and the nitrogen isotopic composition of amino acids in plankton. *Ecology* **83**(8): 2173-2180.
- Michener R. H. & Schell D. M. (1994) Stable isotope ratios as tracers in marine aquatic food webs. In: Stable isotopes in ecology and environmental science (eds. K. Lajtha, R. H. Michener), pp. 138-157. Blackwell Scientific Publications, London.
- 南川雅男 (1997) 安定同位体比による水圏生態系構造の解明. 水環境学会誌 **20**(5): 296-300.
- Minagawa M. & Wada E. (1984) Stepwise enrichment of ^{15}N along food chains: further evidence and the relation between $\delta^{15}N$ and animal age. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **48**: 1135-1140.
- Mizutani H. & Wada E. (1985) Ammonia volatilization and high $^{15}N/^{14}N$ ratio in a penguin rookery in Antarctica. *Geochemical Journal* **19**: 323-327.
- Nakano S., Kawaguchi Y., Taniguchi Y., Miyasaka H., Shibata Y., Urabe H. & Kuhara N. (1999) Selective foraging on terrestrial invertebrates by rainbow trout in a forested headwater stream in northern Japan. *Ecological Research* **14**: 351-360.
- 小川奈々子・木庭啓介・高津文人・和田英太郎 (1997) 自然生態系における炭素・窒素安定同位体自然存在比. *RADIOISOTOPES* **46**(9): 632-644.
- Peterson B. J. & Fry B. (1987) Stable isotopes in ecosystem studies. *Annual review of ecology and systematics* **18**: 293-320.
- 酒井均・松久幸敬 (1996) 安定同位体地球化学. 初版. 東京大学出版会.
- Sugimoto A. & Wada E. (1993) Carbon isotopic composition of bacterial methane in a soil incubation experiment: Contribution of acetate and CO_2/H_2 . *Geochimica Cosmochimica Acta* **57**: 4015-4027.
- 高橋和志 (1996) 安定同位体組成からみた森林の窒素循環. 日本生態学会誌 **46**: 45-52.
- 田瀬則雄 (1997) 水環境における安定同位体比の変動とその支配要因. 水環境学会誌 **20**(5): 286-291.
- Taylor A. F. S., Högbom L., Högborg M., Lyon T. J. E., Nösholm T. & Högborg P. (1997) Natural ^{15}N abundance in fruit bodies of ectomycorrhizal fungi from boreal forests. *New Phytologist* **136**: 713-720.
- 和田英太郎 (1986) 生物関連分野における同位体効果—生物界における安定同位体分布の変動—. *RADIOISOTOPES* **35**: 136-146.
- 和田英太郎 (1993) 安定同位体は何を語るか. 遺伝 **47**(5):

- 10-14.
- 和田英太郎 (1997) 安定同位体と生態システム. The TRC News **61**: 1-12.
- Wada E, Ando T. & Kumazawa K. (1995) Biodiversity of stable isotope ratios. In: Stable isotopes in the biosphere (eds. E. Wada, T. Yoneyama, M. Minagawa, T. Ando, B.D. Fry), pp. 7-14. Kyoto University Press. Kyoto.
- 和田英太郎・半場祐子 (1994) 生元素安定同位体自然存在比—その研究の現状と展望—. 生化学 **66**(1): 15-28.
- 山田佳裕・吉岡崇仁 (1999) 水域生態系における安定同位体解析. 日本生態学会誌 **49**: 39-45.
- 米山忠克・熊沢喜久雄 (1980) 高等植物における窒素の同化と循環. 「重窒素利用研究法」(三井進平・吉川春寿・中根良平・熊沢喜久雄編), pp. 93-110. 学会出版センター, 東京.
- 米山忠克・森田明雄・山田裕 (2002) 土壌—植物系における炭素, 窒素, 酸素, イオウ動態解析のための安定同位体自然存在比の利用: 1994 年以降の研究の展開. 日本土壌肥科学雑誌 **73**(3): 331-342.
- Yoneyama T., Omata T., Nakata S. & Yazaki J. (1991) Fractionation of nitrogen isotopes during the uptake and assimilation of ammonia by plants. Plant Cell Physiology **32**: 1211-1217.
- 米山忠克・笹川英夫 (1994) 土壌—植物系における炭素, 窒素, 酸素, 水素, イオウの安定同位体自然存在比: 1987 年以降の研究の進歩. 日本土壌肥科学雑誌 **65**(5): 585-598.
- Yoshii K., Melnik N.G., Timoshkin O.A., Bondarenko N.A., Anoshko P.N., Yoshioka T. & Wada E. (1999) Stable isotope analyses of the pelagic food web in lake Baikal. Limnology and Oceanography **44**(3): 502-511.
- 吉岡崇仁 (1997) 水環境における安定同位体比の変動とその支配要因. 水環境学会誌 **20**(5): 292-295.