

## 環境研究総合推進費 終了研究成果報告書

公 募 区 分 : 革新型研究開発 (若手枠)

研究実施期間 : 令和3 (2021) 年度 ~ 令和5 (2023) 年度

課 題 番 号 : 【5RF-2101】

体系的番号 : ( J P M E E R F 2 0 2 1 5 R 0 1 )

研究課題名 : 「温暖化・貧酸素化の適応策に資する二枚貝殻を用いた沿岸環境モニタリングと底生生物への影響評価」

Research Title : Monitoring of Coastal Environments and Assessment of Benthos Response to Global Warming and Hypoxia Based on Bivalve Sclerochronology

研究代表者名 : 西田 梢

研究代表機関名 : 筑波大学

研究分担機関名 : 東京都市大学、金沢大学

研究協力機関名 : ミキモト真珠研究所、東京大学、国立研究開発法人産業総合技術研究所、京都大学、公益財団法人海洋生物環境研究所

研究領域 : 安全確保領域

キーワード : 二枚貝類、安定同位体比、微量元素、貧酸素、環境影響評価

令和6 (2024) 年5月

## 目次

環境研究総合推進費 終了研究成果報告書.....	1
[課題概要].....	3
1. はじめに（研究背景等）.....	6
3. 研究目標.....	7
4. 研究開発内容.....	9
5. 結果及び考察.....	11
6. 目標の達成状況と環境政策等への貢献.....	40
(1) 研究目標の達成状況.....	40
(2) 研究成果の学術的意義と環境政策等への貢献.....	43
7. 研究成果の発表状況.....	45
(1) 成果の件数.....	45
(2) 誌上発表.....	45
(3) 口頭発表.....	46
(4) 知的財産権.....	47
(5) 「国民との科学・技術対話」の実施.....	48
(6) マスメディア等への公表・報道等.....	48
(7) 研究成果による受賞.....	48
(8) その他の成果発表.....	49
8. 国際共同研究等の状況.....	49
9. 研究者略歴.....	49
Abstract.....	51

別紙 公募審査・中間評価等への対応

## [課題概要]

## &lt;課題情報&gt;

公募区分：	革新型研究開発（若手枠）
研究実施期間：	令和3（2021）年度 ～ 令和5（2023）年度
課題番号：	【5RF-2101】
研究課題：	「温暖化・貧酸素化の適応策に資する二枚貝殻を用いた沿岸環境モニタリングと底生生物への影響評価」
研究代表者：	西田 梢（筑波大学、特任助教）
重点課題（主）：	【重点課題⑩】大気・水・土壌等の環境管理・改善のための対策技術の高度化及び評価・解明に関する研究
重点課題（副）：	【重点課題⑧】気候変動への適応に係る研究・技術開発
行政要請研究テーマ（行政ニーズ）：	（5-1）海域における底層環境に着目した新たな総合的な評価手法の開発及びそれに伴うモニタリング手法の開発
研究領域：	安全確保領域

## &lt;キーワード&gt;

二枚貝類
安定同位体比
微量元素
貧酸素
環境影響評価

## &lt;研究体制&gt;

サブテーマ1「二枚貝殻の成長線解析・同位体分析による環境解析と水産重要種に与える環境影響評価」

## &lt;サブテーマ1リーダー及び研究分担者&gt; 西田 梢

機関名	部署名	役職名	氏名	参画期間
筑波大学	生命環境系	特任助教	西田 梢	
金沢大学	国際基幹教育院 GS教育系	講師	佐藤 圭	

## ＜サブテーマ1 研究協力者＞

機関名	部署名	役職名	氏名
東京大学	大気海洋研究所	准教授	白井厚太郎
東京大学	大気海洋研究所	助教	漢那直也
海洋生物環境研究所	中央研究所	研究員	杉原奈央子
株式会社ミキモト	ミキモト真珠研究所	課長	樋口恵太
京都大学	人間・環境学研究科	准教授	石村豊穂
東京農工大学	生命工学科	特任助教	石川彰人
市川市漁業協同組合			小川慧
産業技術総合研究所	地質情報研究部門	主任研究員	井口亮

## サブテーマ2 「二枚貝殻の元素分析による貧酸素発生状況の時系列解析」

## ＜サブテーマ2 リーダー及び研究分担者＞ 田中健太郎

機関名	部署名	役職名	氏名	参画期間
東京都市大学	理工学部 自然 科学科	准教授	田中健太郎	

## ＜サブテーマ2 研究協力者＞

機関名	部署名	役職名	氏名
東京大学	大気海洋研究所	准教授	白井厚太郎
東京大学	大気海洋研究所	助教	漢那直也
海洋生物環境研究所	中央研究所	研究員	杉原奈央子
株式会社ミキモト	ミキモト真珠研究所	課長	樋口恵太
市川市漁業協同組合			小川慧

京都大学	人間・環境学研究科	講師	浅沼尚（2023年度）

< 研究経費（間接経費を含む） >

年度	直接経費	間接経費	経費合計
2021	4,154千円	1,246千円	5,400千円
2022	4,154千円	1,246千円	5,400千円
2023	4,154千円	1,246千円	5,400千円
合計	12,462千円	3,738千円	16,200千円

< 研究の要約 >

人為起源の二酸化炭素排出に伴い、地球温暖化や海洋の貧酸素化、海洋酸性化が地球規模で進行し、海洋生態系への負荷が危惧されている。このような環境問題や海洋生物の大量死がひとたび顕在化した際に、モニタリングデータの蓄積が無いために因果関係の解明や影響評価が困難で、有効な対応策の策定に時間を要してしまう場合が多い。調査船を傭船した現場観測や多項目水質計の設置などによる水質モニタリングは、労力や機器の購入・維持管理が高額であり、底層環境のモニタリングは難点も多い。そこで、水環境の保全に係る総合的な評価のためのモニタリング手法の開発・底層環境の把握のため、二枚貝の貝殻を活用した環境モニタリング手法の提案や底生生物への環境影響を定量的に評価する手法を提案した。二枚貝の酸素同位体比による温度履歴の復元法を提案し、殻の酸素同位体変動を活用した週～月単位の貝類の成長推定法を見出した（成果番号3、5、7、12、13、16、17）。このような手法により貧酸素による成長影響の評価や死亡個体の死亡時期特定、さらに長期の環境履歴の推定を実現した。また、貝殻の結晶観察と遺伝子発現解析を組み合わせた手法によって、環境ストレスに応答した結晶形態変異の分子メカニズムを解明したほか、環境モニタリングデータを組み合わせた新たなモニタリング基準を提言した（成果番号1、6、10-12、16、17）。英虞湾で垂下したアコヤガイと東京湾で採取したホンビノスガイの貝殻の微量元素を分析した結果、貧酸素水塊の消長を反映すると期待されていた貝殻のMn/Caは生息海域のDOと相関を示さなかったため、Mn/Caは貧酸素現象の指標として利用できないことを明らかにした。一方、貧酸素水塊の発生に伴い海水中濃度が上昇するモリブデンに着目し、貝類が生息する海域の溶存酸素濃度が低下した時期に形成された貝殻でモリブデン濃度が高い値を持つことを実証した（成果番号3、9、19）。

貝殻の殻皮に含まれる炭素、窒素、酸素の同位体比を季節スケールの解像度で分析する技術を新しく確立した。この新規的手法を東京湾で採取したムラサキガイに適用し、窒素同位体比から貧酸素現象の一因となる沿岸域の窒素負荷をモニタリングできること、炭素同位体比から海洋環境に応答して変化する貝類の代謝を推定できることを明らかにした（成果番号25、26）。また、貝殻の炭素同位体比については、ホンビノスガイにおいて海水の溶存無機炭素の炭素同位体比を反映するため、貧酸素の強度を推定する指標として活用できることを明らかにした（成果番号7）。

このようなモニタリング技術開発により、沿岸域の環境管理・生態系サービスの持続可能な利用・保全に資する技術を新たに提案することができた。

## 1. はじめに（研究背景等）

人為起源の二酸化炭素排出に伴い、地球温暖化や海洋の貧酸素化、海洋酸性化が地球規模で進行し（IPCC, 2021, 2022）、海洋生態系への負荷が危惧されている。このような環境問題や海洋生物の大量死がひとたび顕在化した際に、モニタリングデータの蓄積が無いために因果関係の解明や影響評価が困難で、有効な対応策の策定に時間を要してしまう場合が多い。一般的な水質モニタリング法としては、調査船を備船した現場観測や多項目水質計の設置が挙げられるが、前者は多大な労力が必要で観測頻度に制約があり数日で消長する貧酸素水塊の動態を捉えることが難しく、後者は機器や保守作業が高額で設置場所も限られるため空間的な分布の把握が困難である。よって、水環境の保全に係る総合的な評価のためのモニタリング手法の開発・底層環境の把握が急務である。

本研究は、環境変動が沿岸生態系に及ぼす負荷を正確に推定するため、地質学から発展した古環境解析の最先端の知見を新たに取り入れ、我が国の地域環境・海洋生態系の維持・発展に資するモニタリング手法を新たに提案する（図1）。二枚貝は様々な深度に生息し、一生を通じて定点の環境記録を殻に刻んでいる。殻形成時の水質環境を記録するため、殻の微量元素・同位体組成を分析することで過去に遡って環境復元ができる（e.g. マンガン濃度によるDO 履歴復元: Murakami-Sugihara et al., 2019, 酸素同位体比による水温履歴復元: Nishida et al., 2012）。我々はこれまで、地球化学分野において炭酸カルシウムからなる生物骨格の同位体・元素組成から過去の環境情報を抽出する多様な手法を開発してきた実績がある（e.g. Nishida et al., 2015; Tanaka et al., 2019; Zhao et al., 2021）。このような貝殻の化学組成に記録された環境バックアップデータを活用することで、様々な時間スケールで変動する水質環境と生態の複雑な情報を貝殻の成長線解析に基づき統一的な時系列に沿って評価できる。本研究では、地球化学・環境学・結晶学・分子生物学を含む多彩な専門分野の知見を融合した学際的枠組みで、環境モニタリング手法の提案や底生生物への環境影響を多角的に評価できる体制を構築し、沿岸域の環境管理・海洋生態系の保全に資する技術提案・情報発信を目指す。

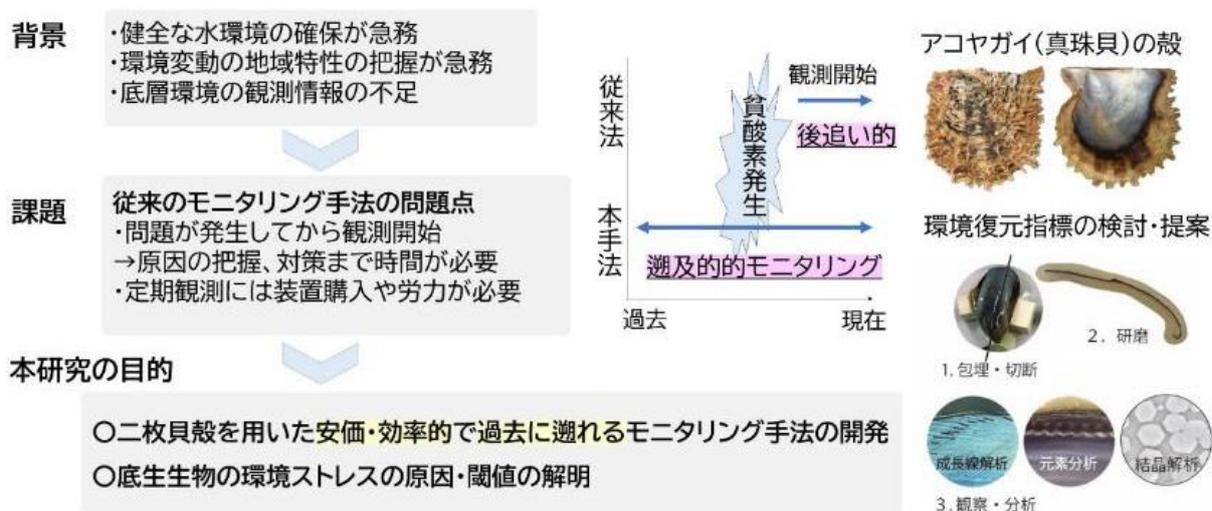


図1 本研究の背景と貝殻を用いた環境影響評価手法の提案

IPCC (2021), Climate Change 2021: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the 6<sup>th</sup> Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press.

IPCC (2022), Climate Change 2022: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the 6<sup>th</sup> Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press.

Murakami-Sugihara, N., et al. (2019), Mussel shell geochemical analyses reflect coastal environmental changes following the 2011 Tohoku tsunami. *ACS Earth and Space Chemistry*, 3(7), pp.1346-1352.

Nishida K., et al. (2012), Seasonal changes in the shell microstructure of the bloody clam, *Scapharca broughtonii* (Mollusca: Bivalvia: Arcidae). *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 363,

pp.99-108.

Nishida, K., et al. (2015), Thermal dependency of shell growth, microstructure, and stable isotopes in laboratory-reared *Scapharca broughtonii* (Mollusca: Bivalvia). *Geochemistry, Geophysics, Geosystems*, 16(7), pp.2395-2408.

Tanaka K., et al. (2019), Microscale magnesium distribution in shell of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*: an example of multiple factors controlling Mg/Ca in biogenic calcite. *Chemical Geology*, 511, pp.521-532.

Zhao L., et al. (2021) Identification of timing of scallop morphological deformity and mortality from shell oxygen isotope records. *Mar. Environ. Res.* ; 163: 105149.

## 2. 研究開発目的

本研究では、深刻化する温暖化・貧酸素化の地域影響を適切に把握するため、貝殻の化学分析（元素・安定同位体比）や成長線解析を駆使した遡及的モニタリング手法により、簡便かつ高精度に水温や溶存酸素濃度などの環境情報を復元する手法を新たに提案し、貝殻に記録された環境履歴の復元を行う。また、対象とする二枚貝類について、貧酸素・高水温などの環境ストレスが体成長や個体群維持に与える影響の解析、遺伝子・結晶学的情報を活用した環境ストレスの指標の提案、閾値の評価を行うことで、沿岸域の環境管理・海洋生態系の保全に資する技術提案および情報発信を行う。

2つのサブテーマに分かれ、サブテーマ①「二枚貝殻の成長線解析・同位体分析による環境解析と水産重要種に与える環境影響評価（筑波大学・金沢大学）」では、水温指標開発と水温履歴復元（酸素同位体比分析）・貝類への環境影響評価（成長解析・遺伝子発現解析・結晶構造解析）を実施する。また、サブテーマ②「二枚貝殻の元素分析による貧酸素発生状況の時系列解析（東京都市大学）」では、二枚貝殻の元素分析（マンガン濃度、モリブデン濃度）や有機物試料の炭素・窒素同位体比分析により、溶存酸素濃度や栄養塩履歴の復元手法を提案し、貧酸素発生状況の時系列解析や栄養塩や炭素源などの物質循環の履歴解析を行う。

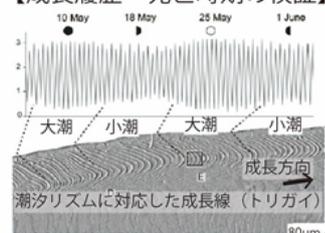
## 3. 研究目標

<p>全体目標</p>	<p>本研究のアウトプットとして、深刻化する温暖化・貧酸素化の地域影響を適切に把握するため、貝殻の化学分析（元素・安定同位体比）や成長線解析を駆使した遡及的モニタリング手法により、簡便かつ高精度に水温や溶存酸素濃度などの環境情報を復元する手法を本研究にて新たに提案し、東京湾・伊勢湾にて過去数十年スケールの水質復元を行うことを目標とする。また、対象とする底生生物の二枚貝類については、貧酸素・高水温などの環境ストレスが体成長や個体群維持（大量死）に与える影響の解析や遺伝子情報を活用した殻形成への環境影響評価を実施することで、沿岸域の環境管理・海洋生態系の保全に資する技術提案・情報発信する。</p> <p>本研究では海洋表層に生息する種（アコヤガイ・イガイなど）と底層に生息する種（アカガイ・アサリなど）を活用し、野外採取個体やアーカイブ標本を用いて環境情報復元指標の開発を行い、さらに、提案した環境指標を用いて海洋表層・底層の数十年スケールでの水質復元を行う。サブテーマ①「二枚貝殻の成長線解析・同位体分析による環境解析と水産重要種に与える環境影響評価（筑波大学・金沢大学）」では、水温指標開発と水温履歴復元（酸素同位体比分析）・時系列解析のための日単位の成長線解析・貝類への環境影響評価（遺伝子発現解析・結晶構造解析）を実施する。また、サブテーマ②「二枚貝殻の元素分析による貧酸素発生状況の時系列解析（東京都市大学）」では、二枚貝殻の元素分析（マンガン濃度）や有機物試料の炭素・窒素・硫黄同位体比分析により、溶存酸素濃度や栄</p>
-------------	---

	<p>養塩履歴の復元手法を提案し、貧酸素発生状況の時系列解析や栄養塩や炭素源などの物質循環の履歴解析を行う。</p> <p>①②で復元した海洋表層・底層それぞれの数十年スケールの環境情報を取りまとめ、底生生物への貧酸素・高水温などの環境ストレスの閾値の評価を行い、環境管理・海洋生態系の保全に資する統合的環境データの情報発信を行う。本研究の遡及的モニタリング手法は、それまで環境観測が実施されていない海域・時代でも過去に遡って環境履歴を安価に推定できる。そのため、貝殻をアーカイブするか、ないしは事後のサンプリングによって、ひとたび環境問題が起こった際に、迅速に環境因の調査を実施することができる。前処理・分析方法の具体的提案や殻の化学分析値からの環境データ（水温・溶存酸素濃度など）の換算式の提示を行い、環境行政への普及（アウトカムへの貢献）を目指した情報公開を実施する。</p>
	<p><b>本研究のアウトプット目標</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 簡便・安価な遡及的モニタリング手法の開発と普及に向けた情報発信</li> <li>2. 東京湾・伊勢湾の水質の長期変動の解明</li> <li>3. 底生生物の環境ストレスの原因・閾値の解明</li> <li>4. 二枚貝のストレス応答のメカニズム解明</li> </ol>

サブテーマ 1	「二枚貝殻の成長線解析・同位体分析による環境解析と水産重要種に与える環境影響評価」
サブテーマ 1 実施機関	筑波大学、金沢大学
サブテーマ 1 目標	<p>生物源炭酸塩から形成時の水温を推定できる手法である酸素同位体比分析を行い、数十年間の時系列の水温履歴を明らかにする。研究対象の二枚貝類は潮汐による2週間1周期の成長線を刻むため、分析した部位の形成日時を1日以下の解像度で特定でき、貝殻の同位体比から得られた水温情報を1日レベルで対応させることが可能である。生貝と死殻の成長線を比較し類似したパターン同士を照合することで（パターンマッチング法、図1）、死に殻の死亡時期の特定を行う（筑波大）。さらに、異常水温や貧酸素の発生状況と貝類の死亡時期を対比することで、環境ストレスが底生生物への死（大量死）を引き起こす閾値（ストレスの強度と期間）を定量的に推定でき、本研究では環境基準として定められた溶存酸素量が生物種の個体群維持に有効か判断する（筑波大）。また、貝殻の結晶構造解析、貝殻形成制御遺伝子の発現解析を実施し、低酸素・異常水温に応じた結晶品質の変異と、これに関与する貝殻形成遺伝子の特定を行うことで環境ストレスの指標として活用できる遺</p>

【成長履歴・死亡時期の検証】



● 二枚貝の死亡時期と死因推定の例

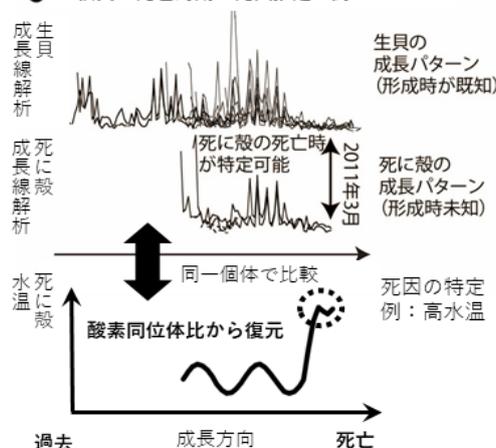
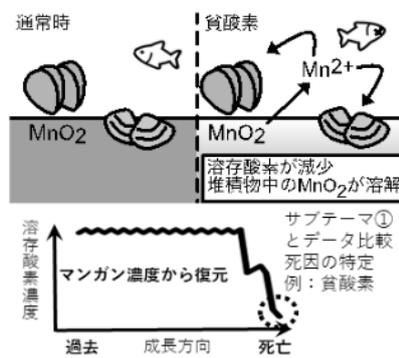


図1 貝殻に刻まれた成長線（上図）と死に殻の死亡時期特定方法（パターンマッチング法）（中図）、死因の特定例（下図）。

	伝子・結晶学的情報を提案する（金沢大学）。地球化学分析から復元された多項目の環境情報と真珠の結晶構造を比較し、真珠品質など殻形成へ悪影響を与える環境条件を解明する（筑波大・金沢大学）。
--	--

サブテーマ 2	「二枚貝殻の元素分析による貧酸素発生状況の時系列解析」
サブテーマ 2 実施機関	東京都市大学
サブテーマ 2 目標	<p>二枚貝殻の化学分析により、過去の貧酸素発生状況を時系列に沿って解析し、貧酸素水塊の発生・消滅機構や個体影響評価を行う。レーザーアブレーション誘導結合プラズマ質量分析法（LA-ICPMS）を用いて、溶存酸素濃度を反映する優れた指標である殻のマンガン濃度などを成長軸に沿って定量し、溶存酸素濃度の時系列変化を復元する手法を開発し、高時間解像度で環境変動を復元する。また、貝殻と同様に付加成長する殻皮有機物の硫黄同位体比は貧酸素水塊に伴う硫化水素の発生を記録する新規的指標として、さらに、殻皮の炭素・窒素同位体比は貧酸素の要因となる一次生産や栄養塩の流入を記録する指標として期待される。貝殻のLA-ICPMS分析で貧酸素の記録が検出された個体を中心に殻皮有機物の炭素・窒素・硫黄同位体比分析を行い、貧酸素や栄養塩流入の履歴を復元する指標として提案を行う。</p>  <p>図2 貧酸素時は二酸化マンガンからマンガニオンが発生し、貝殻に取り込まれる(上)。マンガン濃度から溶存酸素濃度が推定可能。</p>

#### 4. 研究開発内容

＜【サブテーマ 1】「二枚貝殻の成長線解析・同位体分析による環境解析と水産重要種に与える環境影響評価」の研究開発内容＞

サブテーマ 1 では、東京エリアや伊勢エリアで採取した、環境履歴が既知の二枚貝を用いて、環境復元法・成長解析法・環境ストレス評価手法の開発を行った。2021年度はミキモト真珠研究所のご協力の下、英虞湾で二枚貝類の垂下試験を実施し、2022年度～2023年度は市川漁業協同組合（以下、市川漁協）のご協力の下、東京湾の環境モニタリングエリアから貝類の定期採取を行った（いずれもサブテーマ 2 と合同調査）。

英虞湾・東京湾において環境データが既知のサンプルの貝殻を用い、沿岸域の貝類へ適用するための酸素同位体比（ $\delta^{18}\text{O}$ ）による水温履歴の換算法の提案を行った（筑波大学）。また、貝殻の $\delta^{18}\text{O}$ の情報と観測水温情報を対比することで成長時期を特定し、週～月単位の貝類の成長量推定法を見出した。例えば、英虞湾では貧酸素水塊が発達し、溶存酸素濃度（DO）が $2\text{mg/l}$ 以下の期間が長く続いた底層付近において、貝類が著しく成長を低下させていることを明らかにした。この成長推定法は二枚貝に広く適用可能で、時系列に沿って成長量の変化できるため、環境変動に対して貝類がどのように応答したのかを定量的に解明することが可能となる。したがって、本手法は底生生物への環境影響評価に活用することができる。なお、サブテーマ 1 で同位体分析の時系列情報を挿入したサンプルをサブテーマ 2 と共有し、サブテーマ 2 では同一の殻を用いて元素分析による貧酸素動態の復元を行った。

また、遺伝子発現解析と結晶観察を組み合わせることで、貝類のストレス応答を遺伝的・形態学的オーダーで探索し、環境変動への生物影響をモニタリングする新たな指標の開発に取り組んだ（金沢大学）。英虞湾では、真珠貝として知られる表在性二枚貝のアコヤガイに着目した。DO低下の程度が異

なる3地点に垂下した個体についてRNA-seqによる遺伝子発現解析とSEMを用いた結晶観察を実施したところ、貧酸素環境下の個体でストレスの指標となる遺伝子の発現量が有意に変動し、貝殻形成に寄与すると考えられている貝殻基質タンパク質遺伝子の発現量が低下することを明らかにした。さらに、貧酸素環境下のみでアコヤガイの真珠構造を構成する結晶形に異常が観察された。このデータを元に、アコヤガイの真珠養殖における適切なモニタリングのためのDO基準を設定し、真珠構造の異常をストレス応答の指標として利用する方法を提案する。真珠構造は貝類で広く観察される結晶の構造であり、例えば真珠貝であるイガイやアワビなど沿岸域の主要な貝類を活用して、結晶観察から貧酸素などの環境ストレスへの応答を定量的に評価する手法に応用できると期待される。東京湾では、内在性二枚貝であるホンビノスガイを対象としてアコヤガイと同様の手法で研究を推進した。この結果、ホンビノスガイのストレス指標となりうる発現変動遺伝子として、複数種のheat shock protein遺伝子を特定した。また、ホンビノスガイは成長停滞時に、通常時に作る微細構造以外の複数の特殊な構造をイレギュラーに作ることが明らかとなった。ホンビノスガイの貝殻基質タンパク質の同定に至らなかったため今後の検討が必要ではあるが、この微細構造の作り分けは、アコヤガイと同様に貝殻基質タンパク質遺伝子の発現パターンの変化によってもたらされると予想される。ホンビノスガイの微細構造作り分けのパターンは多岐にわたるため、環境ストレスと微細構造種が紐づけられれば、強力なモニタリングツールになりうると期待される。

#### <【サブテーマ2】二枚貝殻の元素分析による貧酸素発生状況の時系列解析の研究開発内容>

サブテーマ2では英虞湾と東京湾における野外調査(サブテーマ1と合同)と貝殻の化学分析を実施し、海洋における貧酸素現象と人為的な窒素負荷の履歴を時系列に沿って把握する手法の開発に取り組んだ。貝殻など炭酸カルシウムを主成分とした海洋生物硬組織の同位体比や微量元素組成など化学的情報は、その生物が成長した海洋環境を反映することが知られている。この関係に基づき、DOの減少で海洋における値が変化すると期待される微量元素(マンガンやモリブデンなど)と同位体比に着目し、海水および貝殻の微量元素の定量分析および海水の溶存無機炭素の炭素安定同位体比分析を実施した。

サブテーマ1と連携した英虞湾の水質調査の結果から、DOの減少により海水中のマンガン濃度が上昇する傾向を明らかにした。さらにpHと海水に溶存する無機炭素の炭素同位体比も同時に低下した。英虞湾の試験区で垂下されたアコヤガイの貝殻を対象に複数の微量元素の定量分析を行い、DOの指標となりうる元素を検証した。これらの分析結果に基づき、貧酸素水塊の発生が海水と貝殻の微量元素濃度に与えるメカニズムを検証し、貧酸素イベントの履歴を反映する指標として貝殻中のモリブデン濃度が有用であると結論した。

東京湾で実施した水質調査の結果から、底層水でDOが低下した時期はマンガン濃度が高かったことを実証した。一方、貧酸素水塊が発生しない冬季は他の時期と比較してマンガン濃度が非常に高く、塩分と正の相関を示した結果から、冬季に河川を通じて東京湾に供給されるマンガンが増加することを明らかにした。また、英虞湾と同様に東京湾でも貧酸素水塊ではpHと海水に溶存する無機炭素の炭素同位体比が同時に低下することを明らかにした。

さらに、貧酸素水塊が発生した海域から採取した複数の貝類を対象に、貝殻の微量元素濃度を分析し、サブテーマ1が行なった成長線解析の結果と組み合わせ、貧酸素水塊を反映する指標を検討した。その結果、貝殻のマンガン濃度は河川から流入するマンガンを反映し、貧酸素が起きた夏頃よりも冬季に高いことを明らかにした。夏季に形成される成長阻害輪付近で、貝殻のモリブデン濃度が上昇していたことから、モリブデン濃度が貧酸素現象を反映する指標となりうる可能性を示した。このように、環境が異なる東京湾と英虞湾で、生態が異なる別種の貝類を分析した結果、両者に共通してモリブデン濃度とDOに関連が認められた。このことは、環境が異なる海域に生息する表在性および内在性二枚貝の貝殻に記録された微量元素濃度を指標として活用し、貧酸素現象を過去にさかのぼって推定できる可能性を示唆している。

サブテーマ1が対象とする貝殻の酸素同位体比分析では炭素同位体比も同時に分析される。貝殻を構成する炭酸カルシウムの炭素は、海水中に溶存する無機炭素由来と代謝由来の炭素の2成分混合であり、

前者と後者では同位体比が大きく異なる。そのため、貝殻の炭素同位体比の変動は環境の変化と環境変化と関連した代謝の変化を複合的に反映すると考えられる。そこで、サブテーマ1と連携し東京湾で採取されたホンビノスガイ貝殻の炭素・酸素同位体比を比較し、炭素同位体比を貧酸素や代謝の指標として利用できるか検討した。サブテーマ1で得られた成長速度の季節変化も考慮して解析し、貧酸素水塊の発生と連動した海水中の溶存無機炭素の同位体比の変化が、貝殻の炭素同位体比の変化として記録されていることを明らかにした。そのため、ホンビノスガイの炭素同位体比は貧酸素を間接的に反映する指標となりうる。

貝殻の外層を覆う殻皮は主に有機物と炭酸カルシウムで構成され、イガイ類などで厚く発達する。殻皮など貝類が生産する有機物の炭素・窒素安定同位体比は、生息環境周辺への陸起源物質の流入や一次生産量などを記録しうる。殻皮に含まれる有機物と炭酸カルシウムの炭素・窒素・酸素の同位体比を同一時間面から取得できれば、沿岸環境の時間変化をモニタリングできる。これまで殻皮の安定同位体比の分析手法はまだ確立されていないため、サブテーマ2ではイガイ類の殻皮の分析法を確立した（殻皮の有機物・炭酸カルシウム含有量の定量と分離法の検討、同位体比分析による精度検証）。この分析手法を用い、東京湾で採取したムラサキイガイの殻皮を分析した。その結果から、殻皮の同位体比の時系列変化は人間活動に由来する窒素負荷とムラサキイガイの代謝を反映すると結論した。ムラサキイガイを含むイガイ類は国内に広く分布し採取も容易なため、本手法を応用することで簡便に沿岸域の窒素負荷を過去にさかのぼって推定できると期待される。

## 5. 結果及び考察

<【サブテーマ1】「二枚貝殻の成長線解析・同位体分析による環境解析と水産重要種に与える環境影響評価」結果及び考察>

### (1) 英虞湾での二枚貝類の垂下試験による環境観測の概要と貝類生存率の調査（伊勢エリア）

2021年度に貝殻を用いた環境復元法・環境ストレス評価手法の開発を行うため、サブテーマ1と2で合同で英虞湾にてフィールド調査を実施した。英虞湾での調査地点を図2に示す。6月下旬に、カルセイン染色を施したアコヤガイを英虞湾の貧酸素が発生する海域（赤崎）と非発生海域（研究所前）に温度・溶存酸素ロガー（Onset社HOB0 U26溶存酸素ロガー）とともに垂下した（赤崎では水深2m, 5m, 海底から1m（B-1と呼ぶ）の3地点、研究所前ではB-1mの1地点）。水深2m、5mは養殖用いかだ（図2）からかごを吊るし、海底から1m（B-1m）の試験区はおもりをつけて固定し、1mの深度で飼育を実施した。B-1mは潮汐によって水深が変化し、貧酸素発生海域で約6-8m、非発生海域（以下、Control海域と呼ぶ）で約5-7mの水深であった。

アコヤガイは、遺伝的差異を除外するため同一株を使用し、各飼育カゴに15個体ずつ入れた。7-9月は英虞湾で貝の清掃や現場の水質調査を実施し、11月に垂下していた貝殻を回収した。

温度・溶存酸素濃度の連続観測の結果、貧酸素発生海域では、水深が深くなるほど夏季のDOが低くなり、9月には貧酸素水塊（DO < 2mg/l）が頻発していた（図3）。海底堆積物を採取した結果、貧酸素発生海域の底質は泥であり、一方、control海域は礫や貝殻片を多く含む泥底であった。

また、垂下試験の生存個体数の推移を図4に示す。貧酸素発生海域では、5か月間の垂下試験において水深が深くなるほど（海底に近くなるほど）生存率が低下することが分かった。貧酸素発生海域の海底から1m地点では、図3に示すように夏季を通じて貧酸素が度々起こっており、9月は溶存酸素の濃度がおよそ2 mg/l前後まで低下した時期が3週間程度連続していた。このような貧酸素の頻発によって、海底面付近では貝類の生存率が低下したと考えられる。

図2 英虞湾においてアコヤガイ垂下試験を実施した2地点（貧酸素発生海域、非発生海域（control海域））。貝類と温度・DOロガーを養殖かごに入れ、各地点で垂下実験を行った。

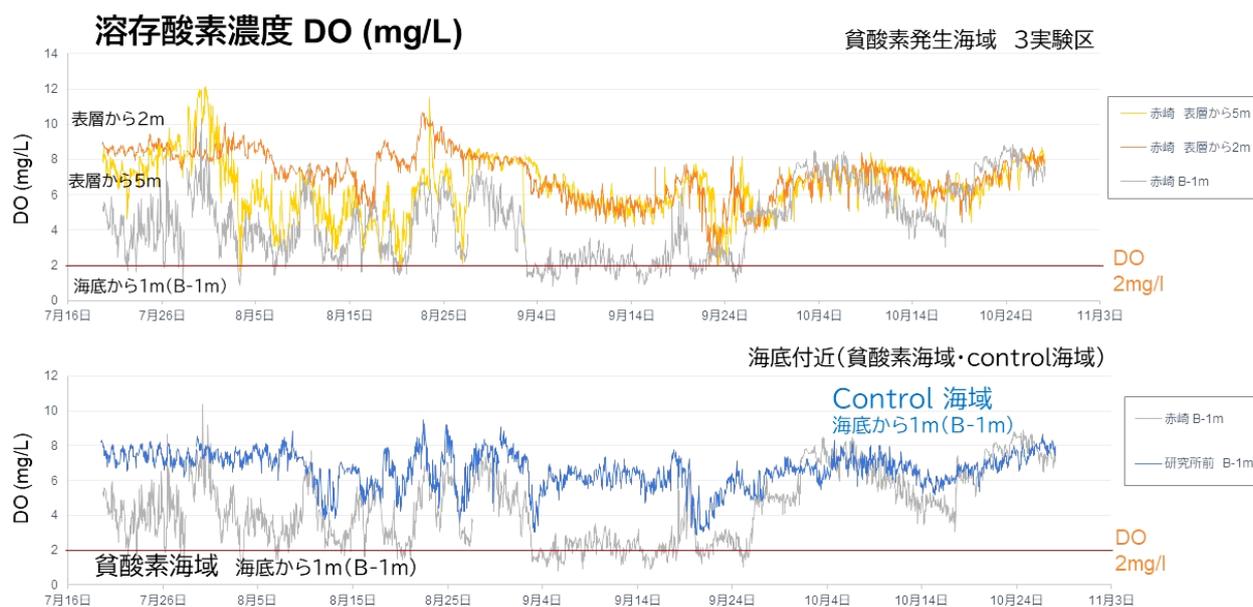


図3 垂下試験地点（貧酸素発生海域、control海域の海底面から1m）の水温・溶存酸素濃度（DO）の時系列推移。

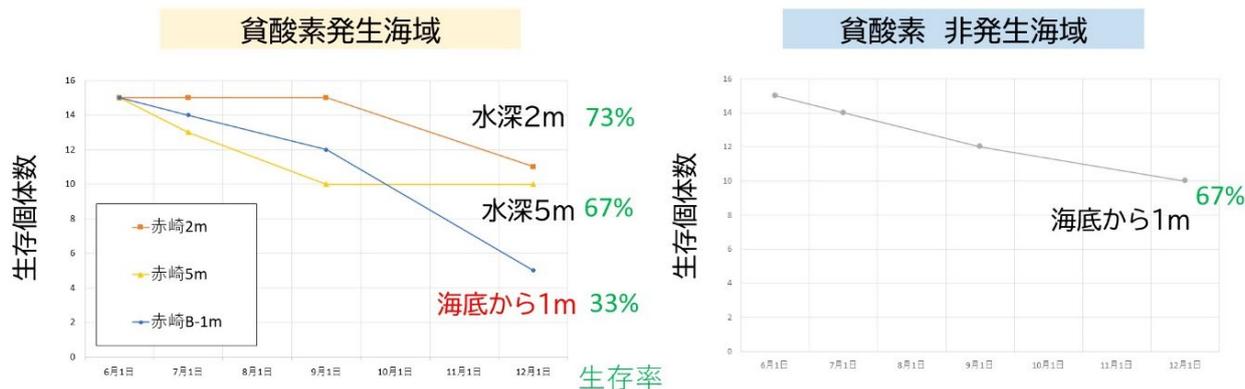


図4 貧酸素発生海域・非発生海域のアコヤガイの生存率の推移。

## (2) 二枚貝殻の酸素同位体比分析による温度履歴と殻成長量の推定法の提案 (伊勢エリア)

### 2-1. 時系列の酸素同位体履歴の復元と温度履歴推定法の検討

サブテーマ1 (筑波大学) は、英虞湾で飼育実験を行った二枚貝殻を用いて、貝殻の温度履歴推定法の検討を行った (成果番号3、5、12、17)。

生物の炭酸カルシウム殻の酸素同位体比 ( $\delta^{18}\text{O}$ ) は、生息環境の温度や水の同位体比を記録し (Urey, 1947, *Journal of the Chemical Society*; McConnaughey, 1989, *Geochimica et Cosmochimica Acta*)、以下の関数で表される。

$$\delta^{18}\text{O}_{\text{shell}} - \delta^{18}\text{O}_{\text{seawater}} = a \times \text{温度}(\text{°C}) + b \quad (\text{式1})$$

$\delta^{18}\text{O}_{\text{shell}}$  : 貝殻の $\delta^{18}\text{O}$ 、 $\delta^{18}\text{O}_{\text{seawater}}$  : 海水の $\delta^{18}\text{O}$ 、 $a$ と $b$ はそれぞれ傾きと切片を表わす。傾き $a$ および切片 $b$ は鉱物種や生物分類群ごとに異なるため、本研究では先行研究で報告されている複数の水温換算式を検証することで、調査海域の貝類を利用した温度復元に最適な計算式の検討を行った。

まず、貝殻を用いた水温復元では、式1に示すように、海水の $\delta^{18}\text{O}$ が温度の見積もりに影響を与えるため、英虞湾における水の $\delta^{18}\text{O}$ の分布を調べた。調査地点をはじめ、英虞湾の海水や周辺の河川水の定期採水を行い、PICARRO社L2130-Iキャビティリングダウン分光方式酸素水素安定同位体比分析装置 (京都大学) を用いて海水の水素・酸素安定同位体比の分析を行った ( $N=112$ 、分析誤差は $\pm 0.1\text{‰}$ )。図5A、5Bに調査期間の貧酸素発生海域の表層海水の $\delta^{18}\text{O}$ ・塩分の時系列変化を示す。 $\delta^{18}\text{O}$ は $-3.2\text{‰}$ から $-0.2\text{‰}$ 、塩分は17-32の間で推移した。8-9月は雨天や台風の影響で、塩分・海水の同位体比が低くなった。英虞湾および周辺の河川水を分析し、海水の水素・酸素同位体比と塩分の相関を調べた結果、いずれも有意に正相関を示した。水の $\delta^{18}\text{O}$ と塩分 (S) の関係式は以下の式で表される

$$\delta^{18}\text{O}_{\text{seawater}} = 0.19 \times S - 6.67 \quad (\text{式2})$$

本研究で提案した塩分— $\delta^{18}\text{O}$ の関係式により、貝殻の $\delta^{18}\text{O}$ を用いて水温を推定する際に、ロガーで観測した高次間解像度の塩分データを利用し、水の $\delta^{18}\text{O}$ の影響を厳密に補正することが可能となった。

図5 英虞湾における水の酸素同位体比( $\delta^{18}\text{O}$ )と塩分の関係。貧酸素発生海域の表層海水の(A)  $\delta^{18}\text{O}$ と(B)塩分の時系列変化。(C) 英虞湾および周辺の河川水の $\delta^{18}\text{O}$ と塩分の関係。

次に、垂下試験を実施したアコヤガイの貝殻について、Thermo社同位体質量分析計（東京大学）を用いて $\delta^{18}\text{O}$ 分析を実施した（N=10個体）。図6に貧酸素発生海域の表層から2m、海底から1mで飼育した個体の殻の $\delta^{18}\text{O}$ 分析結果の一例を示す。 $\delta^{18}\text{O}$ が低いほど高水温、高いほど低水温を示す。図6より、貧酸素水塊の影響がほとんどない、表層から2mに垂下した個体は、垂下開始から11月に採取されるまで、夏に高く冬に低い水温の季節変化を記録していることが分かった。一方、海底から1mに垂下した個体は、垂下期間の成長幅が小さく、夏の高水温を示す $\delta^{18}\text{O}$ の値が記録されていなかったことから、夏季に成長速度が低下していたことが読み取れた。その要因の一つとして、海底から1mでは貧酸素（ $\text{DO}<2.0\text{mg/l}$ ）が頻発していたため（図3）、殻成長が停滞していたことが考えられる。貧酸素水塊に垂下した個体群は、死亡率が高く、かつ飼育期間の成長量が半減しているため、真珠生産を行う際は貧酸素の発生しない海域を選んで垂下することが重要である。次章では、この同位体データを活用した成長量推定法の検討内容について述べる。

図6 貧酸素発生海域のアコヤガイ 2 個体の殻の酸素安定同位体比。

## 2-2. 酸素同位体比を活用した成長量推定法の提案と貧酸素が二枚貝の成長へ及ぼす影響評価

酸素同位体水温計で水温履歴を復元するためには、まず、最適な水温換算式を検討する必要がある。そこで、日々の観測水温と、観測塩分から式2により推定した水の $\delta^{18}\text{O}$ を基に、これまでに提案されている炭酸塩同位体比を用いた複数の温度換算式を精査した (e.g. Kim and O'Neil, 1997, *Geochimica et Cosmochimica Acta*; Watkins et al., 2014, *Earth Planetary Science Letters*)。その結果より、本種のカルサイト殻での温度推定にはWatkins et al. (2014)を推奨したい。

Watkins et al. (2014)の式に、図6の下図に示すように、ロガーで記録した温度・塩分から(2)式を使って算出した水の同位体比の条件を入力し、環境から予想される貝殻(カルサイト)の同位体比を推定した。この推定値と貝殻の同位体比(分析値)を対比することで、日レベルで貝殻の分析点に時系列情報を挿入することが可能である。このように時系列情報を挿入することで、月毎の成長量を推定した(図7、成果番号3、5、12、17)。アコヤガイは、8、9月をピークとし、水温低下に従って成長量が低下する成長パターンを持つが、貧酸素水塊が発生した海底面付近で飼育した個体は9月に著しく成長量が低下していることが分かった。この時期はDOが2mg/L以下の積算日数が23日間にもおよび、アコヤガイの死亡率の上昇と著しい成長低下をもたらしたことが明らかになった。これらの結果から、貧酸素現象がアコヤガイの生存率や成長速度に与える影響を定量的に解明できた。また、貧酸素の程度が異なる海域で取得したデータを比較することで、貧酸素(2 mg/l)の積算日数が少なくとも23日程度になると、成長が阻害されることを明らかにした。これらのデータは、貧酸素水塊の消長が二枚貝類に与える影響を評価するうえで重要な知見となる。貝殻の断面観察の結果、アコヤガイは日ごとの成長線が不明瞭で観察が難しく、成長線解析による時系列情報の解析は出来ない種であることが分かった。アサリ、ハマグリ、ムラサキイガイなどは潮汐周期で成長線が形成されるため日単位の成長線解析が可能である一方、日ごとの成長線が不明瞭で観察が難しい種は実は多く(アワビ、タイラギ、アカガイなど)、二枚貝の成長量推定のネックとなっていた。しかしながら、本研究の $\delta^{18}\text{O}$ による成長量推定法を用いれば、さまざまな貝類で週～月程度の成長量変化を簡便に解析することが可能となり、底生生物への環境影響の定量評価手法として活用できる。

図7 貧酸素発生海域における貝殻の酸素同位体比から推定したアコヤガイの月ごとの成長量の推移と調査海域の各月のDO観測値の比較。

### (3) 東京湾における貝類採取と海洋観測の概要

東京湾の定点モニタリングが行われている浦安沖にて、市川市漁業協同組合のご協力の下、貝類の採取、遺伝子解析用試料の採取と海上での水質調査、および水の安定同位体比・溶存Mn濃度分析用試料の

採取を実施した（サブテーマ1と2の合同調査）。調査実施日は2022年6月21日、9月4日、10月2日、2023年2月12日、2023年9月12日である。市川市漁業協同組合の漁業者にご協力いただき、大まきと呼ばれる漁具でホンビノス、サルボウ、カガミガイなどの生貝および死殻が採取された。いずれの調査でも生貝と共に死殻が多く採取され、死亡して間もない個体もみられた。

図8に東京湾の浦安沖地点で観測されている定点観測データを示す（東京湾水質連続観測ウェブページ <https://www.tbeic.go.jp/MonitoringPost/ViewGraph/>）。浦安沖地点では、環境省の環境基準であるDOが2mg/l以下に達する時期が、2022年の5月上旬から10月上旬まで、約5か月間にわたり断続的に観測され、無酸素になった時期も認められた。7月～10月上旬は、貧酸素の継続時間が長くなり1～数日程度貧酸素が続く場合も見られた。DOが低下している時期は海水のpHも著しく低下しており、底生生物は貧酸素と酸性化の複合的な環境ストレスを受けていたと思われる。

図9に調査時の観測データを示す。また、揚水ポンプを用いて各深度の海水試料を採取し、海水の溶存無機炭素（DIC）の $\delta^{13}\text{C}$ 分析を実施した（図9）。底層付近ではDICの $\delta^{13}\text{C}$ が低く、有機物の分解由来のDICの影響により、海水のDICの $\delta^{13}\text{C}$ が低下したことが示唆された。サブテーマ2の（5）にて、貝殻の $\delta^{13}\text{C}$ と海水DICの $\delta^{13}\text{C}$ の対比を行った。

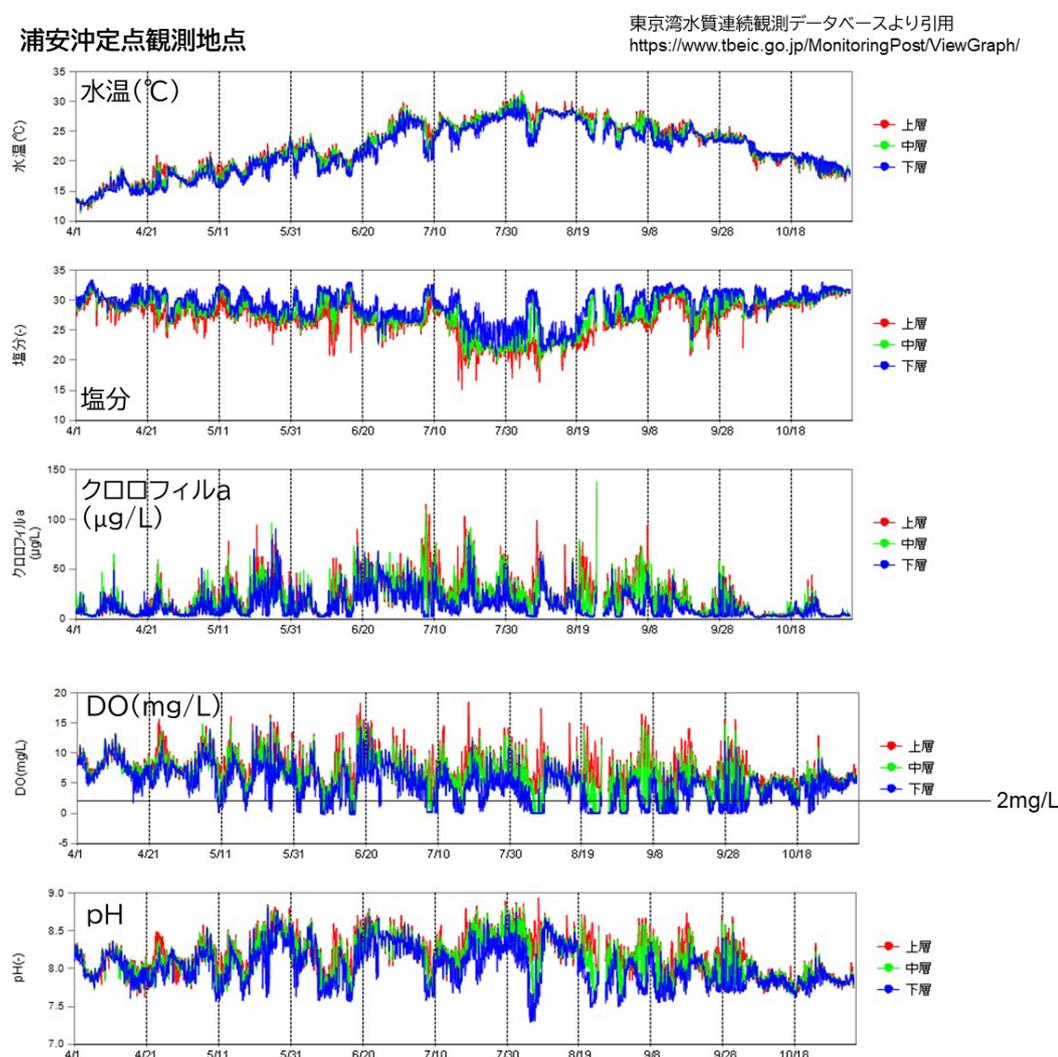


図8 東京湾浦安沖定点観測地点の水温・塩分・クロロフィルa濃度、溶存酸素濃度（DO）、pHの観測データ（東京湾水質連続観測データより引用、<https://www.tbeic.go.jp/MonitoringPost/ViewGraph/>）

図9 調査実施日の海洋観測データと海水の溶存無機炭素 (DIC) の炭素同位体比 ( $\delta^{13}\text{C}$ )。(A)水温、(B)塩分、(C)溶存酸素濃度、(D)DICの $\delta^{13}\text{C}$ 、(E)表層および底層のDICの $\delta^{13}\text{C}$ の季節変化。

#### (4) 二枚貝殻の酸素同位体比分析による温度履歴推定と殻成長量の推定法の提案 (東京エリア)

##### 4-1. 酸素同位体比分析による温度履歴・殻成長量の推定

東京湾で採取された二枚貝類 (ホンビノスガイ、サルボウ、カガミガイなど) について、安定同位体比から温度履歴や殻の成長量を推定する手法の提案を行った。また、貝殻断面で観察された成長障害輪の形成要因の検証を行った (成果番号7、16)。

2022年~2023年に東京湾での調査で採取されたホンビノスガイ、サルボウについて、炭素・酸素同位体比分析を実施した (N=10)。図10に同位体分析結果の一部を示す。ホンビノスガイ、サルボウとも、2~3年の同位体履歴が記録されており、酸素安定同位体比から水温の季節周期を読み取ることができた。太平洋においては、海水の酸素同位体比-塩分換算式がSakamoto et al. (2019) *Methods in Ecology & Evolution* によって提案されているため、観測塩分データを基に、海水の酸素同位体比を日スケールの解像度で推定した。

つぎに、過去に提案されている複数のアラゴナイトの温度換算式 (e.g, Grossman and Ku, 1986, *Chemical Geology*; Kim et al., 2007, *Geochimica et Cosmochimica Acta*; Nishida et al., 2015, *Geochemistry, Geophysics, Geosystems*; Morissette et al., 2023, *Methods in Ecology & Evolution*) の検証を行い、東京湾産の二枚貝類に最適な計算式を検討した。ホンビノスガイやカガミガイにはMorissette et al.(2023)、サルボウにはNishida et al. (2015)の水温換算式がよくフィットした。マルスダレガイ科貝類についてはMorissette et al. (2023)の式が、フネガイ科貝類についてはNishida et al. (2015)の式による温度復元を推奨する。

このようにして水温の時間変化 (図8) を使って推定した同位体比の時系列変化と殻成長方向に沿った同位体比の変化を照合し、図6のアコヤガイの例と同様に、貝殻に時系列情報を挿入した (図10B,E)。この時系列のフィッティング作業により、図10A、10Dの同位体データを横軸を時間とした図10B,10Eのグラフの作成が実現できる。同一産地から採取されたホンビノスガイ・サルボウはいずれも同じような炭素・酸素同位体プロファイルを示し、時系列情報が挿入された環境履歴データを取得できる。さらに得られた同位体比の時系列変化を基に、貝殻の成長速度 (mm/day) の推定を行った (図10G,H)。ホンビノスガイについては、3-6月によく成長し、7-10月は成長が著しく低下していた (図10G)。一方、サルボウについては、5-8月は成長が少なくなり、9月以降から冬場にかけてよく成長していることが分かった。貧酸素水塊は7月から10月上旬にかけて強く発達していたが、サルボウは後述のように成長障害輪等も見られず、貧酸素への耐性が強いことが示唆された。このような成長推定手法は二枚貝類で広く応用でき、東京湾産の個体では1週間~1か月程度の成長量の変化を時系列に復元することができた。船舶や潜水による1か月おきなどの定期的な生物調査をしなくても、1年以上の成長履歴を調べることが

でき、より高時間解像度に生物の成長変化を調査することができる。

また、貧酸素を経験した貝類の貝殻（ホンビノスガイ、サルボウ）を用い、環境ストレスによる成長低下・停滞で形成される成長障害輪の分布を貝殻の断面観察から調べた。ホンビノスガイにおいて、貝殻断面や表面で貝殻が黒みを帯び、貝殻外表面で段差を伴う成長障害輪（阻害輪）が、夏季に2本～5本程度断続的に形成されていることが分かった。成長障害輪は一般的に、成長の著しい低下や停滞が起こった際に形成される成長輪であることが知られている。一方、サルボウにおいては成長障害輪の形成は確認されなかった。図10Gより、ホンビノスガイは夏季に著しい成長の低下が起こっていることから、DOの低下により短時間の成長停滞を繰り返していた可能性が考えられる。サルボウについては、5-8月にかけて成長が鈍化する傾向はあるが（図10H）、DOの低い期間が長期で続いた9-10月においてもこのような成長障害輪は見られず、貧酸素への耐性が強いことが示唆された。同位体比計測と成長線解析の結果から貧酸素が二枚貝に与える影響の種依存性を明らかにすることができた。

図10 東京湾産貝類の酸素同位体比分析結果。(A, B)ホンビノスガイの酸素同位体比、(C)ホンビノスガイの炭素同位体比、(D, E)サルボウの酸素同位体比、(F)サルボウの炭素同位体比、(G)ホンビノスガイの殻成長速度、(H)サルボウの殻成長速度

図11 ホンビノスガイ貝殻断面の観察結果。周辺の白色部と比較して濃い暗色の成長線が成長障害輪である。(A) 貝殻断面の全体写真。(B)Aの拡大写真。(C) 貝殻断面の拡大写真。

図12 東京湾産貝類の酸素同位体比分析結果と。灰色のハッチ部分は成長障害輪が卓越した部位を示す。下図は東京湾浦安沖地点における定点観測データ（水温、D0）を示す。

#### 4-2. 死殻の酸素同位体比分析による死亡時期の推定

ホンビノスガイやカガミガイの死殻の同位体比分析を行った結果（N=10個体）、老成した個体は死亡時期直前の酸素同位体比に特定の傾向はみられなかったが、1～3歳の若い個体は全て、死亡直前に形成された貝殻の酸素同位体比が $-3.5\text{‰}$ ～ $-4\text{‰}$ を示した(図13)。生貝の酸素同位体比と比較した結果から、1～3歳の個体は夏季に死亡が集中しており(図13)、温度換算すると約 $26^{\circ}\text{C}$ ～ $28^{\circ}\text{C}$ に相当する。ホンビノスガイの成長停滞水温は $30^{\circ}\text{C}$ 以上とされているが（Kennish, 1980 in *Skeletal Growth of Aquatic Organisms*）、2020年～2022年の期間で $30^{\circ}\text{C}$ 以上は観測されていないため、高温で死亡した可能性は低い。そのため、高温ストレスではなく、夏季に起こった貧酸素などの環境変化により死亡した可能性が高い。2022年の定点観測データより(図8)、貝類が死亡したと予想される7、8月頃は貧酸素の継続期間が1日～数日と長くなった時期にあたり、貧酸素水塊への暴露時間が二枚貝類の生存に大きく影響を与えていることが示唆された。貧酸素などの環境要因により若い個体の生存に影響が及んでいることは、本海域の

個体群維持に深刻な影響を与えるため、定期的なモニタリングが必要であると思われる。(成果番号7)

このように、死殻の酸素同位体比記録を調べることで、死亡時期を特定することができ、どういったタイミングで、どのような環境条件で死亡したか、大量死の因果関係を検証することに活用できる。水温換算をする際は科ごとに最適な温度換算式を選択することを推奨するとともに、成長速度の見積もりについてはどの種も共通した手法により、1週間から1か月のスケールで成長量を推定することができる。高水温の頻発、貧酸素水塊の発達などの環境問題と、近年沿岸域で多発する海洋生物の大量死の因果関係を検証することは持続可能な生態系サービス利用において非常に重要である。

図13 東京湾産貝類の生貝（2個体）と死殻（4個体）の酸素同位体比の比較。死殻はいずれも夏季に死亡していることが明らかになった。

## (5) 遺伝子解析・結晶解析による環境変動が生物に与える影響評価手法の提案

### 5-1. 結晶形態観察による水温・溶存酸素濃度の生物影響の評価手法の提案

アコヤガイは真珠養殖の重要種であり、その貝殻は二層構造で、外層を構成する層（外層）はカルサイト結晶からなる稜柱構造、内側を構成する層（内層）はアラゴナイト結晶からなる真珠構造と呼ばれる構造単位で構成されている。貝に挿入された異物がこの真珠構造でコーティングされたのがいわゆる真珠である。サブテーマ1（金沢大学）では、走査型電子顕微鏡を用いて、様々な条件下で生育した貝類の真珠構造の結晶形態を観察し、環境変動の生物影響評価の指標としての有効性を検証した（成果番号1、6、9-11、15）。

a 水温の影響評価：ミキモト真珠研究所（control海域）に垂下したアコヤガイを2018年1月～12月の期間毎月3個体ずつ採取し、これらを貝殻微細構造観察に用いた。真珠構造の結晶が最も成長するのは、外層と内層の境界部である。この結晶化最前線を観察するため、アコヤガイの左殻後背部をおよそ10×20mm四方に切り出し、走査型電子顕微鏡（S-3400N, Hitachi, 早稲田大学）で真珠構造の結晶観察を実施した（観察倍率：×500～2000、未蒸着）。一般にアコヤガイは水温16℃以下で貝殻形成を停止（冬眠）するといわれる（和田, 1961, 国立真珠研究所報告）。control海域付近に設置されている水温ロガーのデータによると、実験期間中のアコヤガイ垂下地点の水温はおおよそ10～30℃の範囲で季節変動を示した。このロガーの記録と対応させることで真珠構造形成への水温影響を検証した結果、アコヤガイは冬眠明けの4月頃、通常真珠構造と比較して結晶形が歪で空隙の多い層を作り、このときの貝殻は真珠光沢が失われていることが分かった（図14左；冬季異常殻）。一方、5月以降は、底面が円状もしくは六角形状の薄板結晶が形成され、干渉色を生み出す成層した結晶層が観察された（図14中央、右）。8、9月の高温期においても、貧酸素が発生しない地点では、4月のような真珠形態の変異は見られず、30℃程度の高水

温では真珠形成への影響は小さいことが示唆された。よって、本種は4月頃に特殊な結晶形態を示すことから、結晶形態で低温期の時期を特定することが可能である。一連の研究成果については、Sato et al. (2022, *Frontiers in Ecology & Evolution*) (成果番号1) にて報告した。

図14 アコヤガイの貝殻内表面からみた真珠構造の電子顕微鏡写真。低温期は結晶が発達せず、真珠光沢のない殻が形成された。Sato et al. (2022, *Frontiers in Ecology & Evolution*)にて報告。

b 貧酸素環境の影響評価：一方、2021年の9月～12月の期間に貧酸素発生海域に垂下した個体（アコヤガイは水深2m、5mおよび海底から1mの3地点に設置）について、貧酸素水塊が最も拡大した9月に採取したアコヤガイの貝殻の観察を先程と同様の手法にて行った結果、DOの高い表層付近（水深2mと5m）では通常の真珠結晶の形態を示すが、貧酸素が観測された海底付近（海底から1m）では低温環境下でみられたものと類似の、結晶に空隙が多い異常殻が観察された(図15)。このような空隙の多い構造によってつくられる真珠は真珠光沢が失われてしまうため品質の面で大きく欠陥があると考えられる。さらに、貝殻本体もこの構造の空隙によって脆くなり、生体にとっては外敵や付着生物からの防御能力も低くなるといった弊害が生じる可能性がある。水深5mではDOが2.98mg/Lであったが、海底付近の個体のような異常殻は観察されなかった。このことから、少なくとも一般的に貧酸素環境の基準（Diaz, 2001, *Journal of Environmental Quality*）となっているDOが2mg/L以下の条件で異常殻が作られると推測できる。

以上より、真珠構造形成と水温・DOとの関係を調べた結果、低水温時と貧酸素発生時には、真珠結晶が十分に発達せず、真珠品質の低下を招く可能性があることが分かった。この異常殻を基準とする貝殻の結晶構造の変化は低水温と貧酸素によるストレスを表わす指標として利用できる可能性がある。

図15 アコヤガイの貝殻内表面における真珠構造の電子顕微鏡写真。水深2m、通常の溶存酸素濃度の実験区の個体では規則的な結晶がみられたが、DOが2mg/Lを下回る海底付近で垂下した個体では、空隙の多い結晶が観察された。

## 5-2. 貝殻形成制御遺伝子の発現解析による環境影響評価法の提案（伊勢エリア）

二枚貝の貝殻は、90%強の炭酸カルシウムと10%弱の有機物からなる。この貝殻中にわずかに含まれる有機物（貝殻基質タンパク質）が、貝類の殻形成を制御していると考えられている（e.g. Suzuki et al., 2009, *Science*）。複数の異なる生育環境下にある個体間において、貝殻形成に関与する貝殻基質タンパク質発現遺伝子をはじめ、遺伝子の発現パターン（遺伝子発現量の量的変化）を網羅的に解析することで、任意の生息環境下で可塑的に発現する遺伝子の特定が可能となる。この発現変動遺伝子の機能解析

をすることで、環境の変化に対する生物の生理的応答と、その結果として貝殻に現れる真珠構造の変異のメカニズムを定量的に評価することができる。

(5-1b)の解析を実施した貧酸素発生海域に垂下したアコヤガイの個体群（水深2m、5mおよび海底から1mに垂下した3種類の個体群）を用いてRNA-seq解析（NovaSeq 6000, Illumina）による網羅的な遺伝子発現解析を行った。解析対象は、貝殻形成に関与する軟組織（外套膜外側：外層形成部位/内側：内層形成部位）、貧酸素の影響を強く受けると予想される部位（閉殻筋・鰓）の4部位である。

図16 アコヤガイの真珠構造形成領域における発現変動遺伝子（N=1071）の発現パターンを表すヒートマップ図。上3サンプルが水深2m飼育個体、下3サンプルが海底から1m上に垂下した個体のデータを示す。各遺伝子の発現パターンに基づくクラスタリング結果を画面上、個体のクラスタリング結果を画面右に示す。

図17 発現変動遺伝子のエンリッチメント解析の結果。遺伝子は細胞の構成要素（緑）、分子機能（青）、生物学的プロセス（赤）の3カテゴリに分類され、各カテゴリでさらに細分化して遺伝子数をカウントしている。a: 外套膜外側（外層形成部位）、b: 外套膜内側（内層形成部位）、c: 鰓、d: 閉殻筋。

RNA-seq解析の結果、3実験区×3個体×4部位の試料から、アコヤガイ全ゲノムの発現パターンのデータを取得した。得られたデータは酸素濃度の影響を検証するため、水深2m個体と海底から1m個体の2群間のデータセットについて有意差検定を行った結果、各部位ごとに2実験区間で発現量に有意な差（ $p < 0.05$ ,  $q < 0.05$ ）がみられる遺伝子が500種前後見いだされた。発現変動遺伝子が最も多く見つかったのは真珠構造をつくる外套膜内側で、その数は1071におよんだ（図16）。発現変動遺伝子について、エンリッチメント解析（図17）とBLAST検索にて機能解析済みの既知の遺伝子の探索を行った。例えばATP bindingの機能をもつ遺伝子は代謝量の低下と関係して発現量を変動させている可能性がある。heat shock protein遺伝子はストレス応答時に典型的に発現する遺伝子である。また、貧酸素環境下では堆積物から鉛やカドミウムなど重金属イオンが放出される（Liu et al., 2019, *Science of Total Environment*）傾向がみられることから、heavy metal-binding遺伝子はこの水質の変動と関係している可能性がある。

表 1 発現量が変動する貝殻基質タンパク質遺伝子一覧



さらに、これまで報告されているアコヤガイの貝殻基質タンパク質の発現パターンの解析を実施したところ、23の貝殻基質タンパク質の遺伝子が2群間で発現量を有意に変異させていたことが明らかとな

った(表1)。興味深いことに、先行研究で真珠構造の結晶形制御に寄与していることが明確に実験的に示されている貝殻基質タンパク質の多く(e.g. Pif, Pf-SCP, SPARC, ACCBP)は貧酸素環境下で優意に発現量を低下させていた。また、真珠構造の結晶形成を抑制する機能のある遺伝子(PfN44)は逆に貧酸素環境下で発現量を低下させていた。以上の結果を総合すると、アコヤガイは貧酸素環境下でストレス環境に対する生理的な反応を示し、この結果が真珠構造の結晶形異常として現れたと考えられる。したがって、上述のPifを始めとした貝殻基質タンパク質群の遺伝子発現量は、真珠構造の品質を示す指標とみなすことができるだろう。たとえば、2m, 5m, 海底から1m(B-1m)の発現変動貝殻基質タンパク質遺伝子の発現量と各水深のDOを対応させると、図18のようなデータが得られる。真珠構造の結晶形の変異は2mと5mの個体ではみられなかったため、5mとB-1mのDO・遺伝子発現量の間には真珠結晶制御の閾値が存在すると見積もることができる。結晶形の制御は複数の遺伝子が複合的に作用することによってもたらされると考えられるため、今後様々な条件下の実験が必要だが、以上のように環境観測データと、前述の発現変動がみられる貝殻基質タンパク質をはじめとした遺伝子発現量解析データを組み合わせることで、産業的に重要な貝類に対する環境の影響を定量的に評価することが可能となるだろう。真珠構造をもつ貝類はアコヤガイのような真珠貝の他、イガイやアワビ、サザエなどでもみられるため、これらの種に同じモニタリング手法を応用するという展望も期待ができる。以上の研究成果は国際学会等で成果発表を行い(成果番号6、10、11、15)、現在国際誌への投稿を準備中である。

図18 調査地点水深2m、5m、B-1m(底層付近)に垂下されたアコヤガイの貝殻基質タンパク質の発現量(棒グラフ)と各水深の溶存酸素濃度(折れ線グラフ)の比較。エラーバーは3個体の標準誤差。A: PfSCP. B: Pif。同様の傾向は他の貝殻基質タンパク質でも確認されている。

### 5-3. 貝殻形成制御遺伝子の発現解析による環境影響評価法の提案(東京エリア)

ホンビノスガイは高温や貧酸素環境といった劣悪な環境に強い(e.g. Knight, 2016, *Journal of Experimental Biology*)ため、環境モニタリングの指標種としてふさわしい二枚貝の一つといえる。東京湾ではこのホンビノスガイに注目し、アコヤガイと同様に電子顕微鏡を用いた貝殻微細構造観察とRNA-seq解析を組み合わせることで、環境変動の生物影響評価の指標の探査を目的とした研究を推進した。ホンビノスガイは内在性二枚貝で、アコヤガイのように垂下飼育が行われているわけではないため、市川港近辺の同じ地点で貧酸素水塊が発生している時期(DO=2.73mg/L; 2022年9月)としていない時期(DO=10.69mg/L; 2022年6月)にそれぞれ天然個体各4個体をサンプリングしてRNA-seq解析を行ない、この2群間で微細構造と遺伝子発現パターンを比較した。

A 貝殻微細構造観察結果: 他のサブテーマにて分析用に切り出した貝殻切片を利用して走査型電子顕微鏡(KSM-6010lv, JEOL、金沢大学)による観察を実施した。ホンビノスガイの貝殻は大きく分けて3層構造で、外側から混合稜柱構造、交差板構造、そして均質構造と呼ばれる異なる構造単位で構成される(Taylor et al., 1973, *Bulletin of the British Museum (Natural History)*)。9月採取個体について観察を実施したところ、外側の混合稜柱構造の層にはしばしば成長障害輪がみられ、この障害輪付近では稜柱構造の有機物量に変異したり、稜柱ではなく交差板構造や球晶構造が発達する様子がみられた(図19)。このような微細構造の変異は、アコヤガイと同様に環境の変異を反映した遺伝子の可塑的発現によっても

たらされたと推測することができる。この微細構造の変異は肉眼レベルでも認識が可能（例：図11）であり、環境モニタリングの指標として有用である。

#### B 遺伝子発現パターン解析結果：

貧酸素水塊の発生時と非発生時にそれぞれで天然個体各 4 個体を採取し、各個体について 3 部位（外套膜外側・閉殻筋・鰓）を解剖し、RNA-seq解析を実施した。この結果に対して統計解析を実施した結果、

ホンビノス全遺伝子（3542825遺伝子）中、2群間で有意（ $p < 0.05$ 、 $q < 0.05$ ）に発現量が変異した遺伝子はそれぞれ687（外套膜外側）、241（閉殻筋）、1103（鰓）であった（図21）。P値上位100遺伝子には多数のheat shock protein遺伝子を始めたとしたストレス環境で発現する遺伝子や、低酸素環境の代謝変化に関係していると考えられるモノカルボン酸トランスポーター遺伝子などが含まれた。この遺伝子発現パターンの変異が微細構造の可塑的発現をもたらしたと予想できるため、localBLASTによって既知の貝殻タンパク質の類似遺伝子を持つ

か探索をしたところ、ヒットする遺伝子は見つからなかった。つまりホンビノスガイは未知の遺伝子機構で貝殻微細構造を制御している可能性があり、貝殻微細構造の可塑的発現のメカニズムの解明のためにはこの点においてさらなる解析が必要ではある。しかし、一連の研究成果によって、ホンビノスガイは環境の悪化に伴う生理的な変化に応じて貝殻微細構造を作り分けている可能性が強く示唆された。図19に示す通り、成長停滞時にホンビノスガイは複数種類の微細構造を作り分けていた。それぞれの微細構造種を制御する分子メカニズムが解明できれば、ホンビノスの貝殻をもちいた高解像度の遡及的モニタリングが実現できると期待される。また、研究成果で特定された、発現変動を示す複数のheat shock protein遺伝子の発現パターンは、ホンビノスガイの環境影響のモニタリング指標として活用できる。（成果番号16）

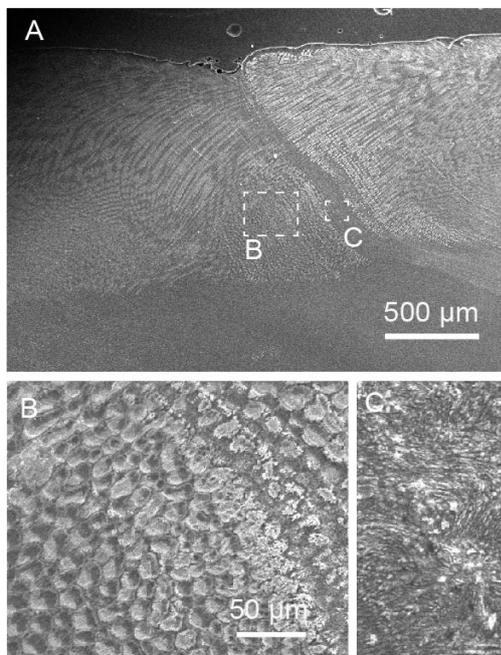


図19 ホンビノスガイ微細構造観察結果。ホンビノスガイの外層は混合稜柱構造で構成される（A）が、成長障害輪付近では球晶構造や交差板構造（C）が発達する。

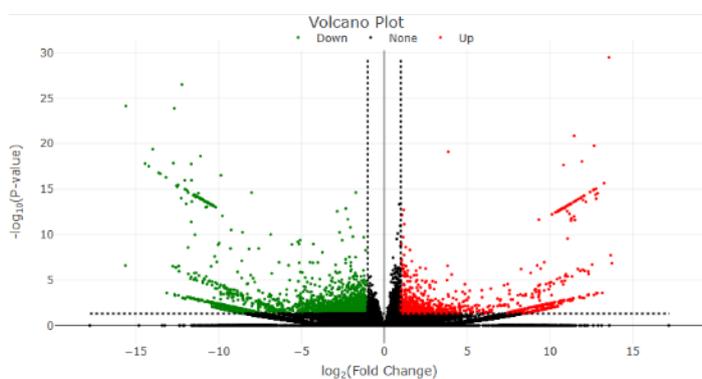


図20 ホンビノスの貝殻形成領域における発現変動遺伝子（N=687）の発現パターンを表すヒートマップ図。

### <【サブテーマ2】「二枚貝殻の元素分析による貧酸素発生状況の時系列解析」>

#### (1) 海水中微量元素濃度と溶存二酸化炭素濃度の関係

アコヤガイを垂下した英虞湾の4つの試験区において、2021年6、7、8、12月に採水した海水のMn濃度を図21に示す。赤崎でDOが低かった6月と7月にMn濃度は底層水で高い値を示したが、DOが比較的高かった8月と12月はいずれの水深でも低い値 (<50  $\mu\text{mol}$ ) を示した (図21A)。一方、貧酸素水塊が発生しなかった研究所前では6月から12月までMn濃度は44 nmol/kg以下の低い値を示した (図21B)。採水時に現場で測定したDOと海水のMn濃度には負の相関が認められた (図21B) ( $p < 0.05$ )。一方、マンガン以外の微量元素 (鉄、亜鉛、ニッケル、銅、鉛) はDOと有意な相関を示さなかった ( $p > 0.05$ , データは割愛)。赤崎の3つの水深におけるMn濃度と溶存酸素濃度の関係は次式で近似される:  $\text{Mn (nmol/kg)} = -51 \times \text{DO (mg/l)} + 548$  ( $r^2 = 0.35$ )。これらの結果から、DOの低下で海底堆積物中の二酸化マンガン ( $\text{MnO}_2$ ) の溶解反応が進行し底層水でMn濃度が上昇したと考えられる ( $\text{MnO}_2 \rightarrow \text{Mn}^{2+} + \text{O}_2$ )。

一般的な傾向として、Mn濃度は表層海水よりも河川水で高いため (赤木・原口, 1984, *地球化学*)、沿岸域のマンガン濃度は河川流入量の影響も受ける。しかし、英虞湾は周囲に大規模な河川がないため河川由来のMn供給は限定的で、海洋のDOがマンガン濃度を制約する主要な要因だったと考えられる。しかし、両者の相関は弱く (図21B)、Mn濃度は現場で測定したDO濃度以外からも影響を受けていると示唆された (成果番号9、19)。

**図21 (A) 赤崎の海水中マンガン濃度の鉛直分布と季節変化.  
(B) 溶存酸素濃度(DO)と海水中マンガン濃度の関係**

貧酸素環境下で二酸化マンガンの溶解反応が進行するまでには数日程度の時間差があり (Kristiansen et al., 2002, *Estuar. Coast. Shelf. Sci.*)、この時間差がMn濃度の変動に影響する可能性がある。時間差による影響を検証するため、赤崎のデータを対象にマンガン分析用の海水を採水日以前の3日間および9日間のDO濃度をそれぞれ積算しマンガン濃度と比較したが、DO濃度の積算値 (3日間および9日間) とMn濃度の相関係数 ( $r^2 = 0.20, 0.22$ ) は採水時のDOとMn濃度の相関係数 (図21B,  $r^2 = 0.35$ ) より小さかった。そのため、DOとMn濃度の関係に対する溶存反応の時間差は小さいと考えられる。

**図22 東京湾浦安沖で観測された(A)DO, (B)Mn濃度,(C)2022年2月以外のMn濃度の鉛直プロファイル,(D)DOとMn濃度の関係, 挿入図は2022年2月に観測した塩分とMnの関係, (E)2022年2月以外の DOとMn濃度の関係. (F) DOとDICの $\delta^{13}\text{C}$ の関係**

東京湾で観測したDOとMn濃度の関係を図22に示す (図22Aは図9と同じデータ)。2022年2月のDOは表層から底層までほぼ一定の値を示し (図22A)、Mn濃度は他の時期よりも非常に高く、表層から底層にかけて低下した (図22B)。2022年2月は塩分が他の時期より低く (図9)、塩分とMn濃度には負の相関が認められた (図22Dの挿入図)。これらの結果から、2022年2月はMnに富む河川水の流入により、海水の塩分が低下しMn濃度が上昇したと考えられる。2022年2月以外では、表層より底層でDOが低く (図

22A)、Mn濃度は高かった(図22C)。しかし、2022年2月以外のDOとMn濃度の間には有意な相関がなかった(図22E,  $p = 0.24$ )。一方、海水DICの $\delta^{13}\text{C}$ がDOに比例する傾向が認められた( $\text{DO} = 0.18 * \text{DO} - 1.9$ ,  $p < 0.05$ )。この相関は堆積物中の低い $\delta^{13}\text{C}$ を持つ有機物が分解されDOが低下していることを示唆する。

英虞湾と東京湾に共通して、底層でDOが低いとMnが上昇し $\delta^{13}\text{C}$ が低下する傾向が観測され(図9,21,22)た。しかし、東京湾ではDOとMn濃度に有意な相関が認められず、Mn濃度はDO以外の要因からも影響も受けると示唆される。貧酸素環境下でDO以外に海水のMn濃度に影響を与える要因として、間隙水から溶出したマンガンイオンが海水中で酸化される過程や底生生物による海底堆積物の攪乱でマンガン濃度が高い間隙水が底層に供給される過程などが報告されている(Pakhomova et al., 2007, *Mar. Chem.*)。

## (2) 貝殻の微量元素濃度と海水の溶存酸素濃度の関係

英虞湾及び東京湾で生育した二枚貝類の貝殻に含まれる微量元素の濃度をLA-ICPMSを使って分析し、貝殻の微量元素濃度が生息環境のDOを反映する指標として利用できるか検討した。

英虞湾のアコヤガイを対象とした研究では、次の2つのプロセスで解析を進めた。(1) DOが最も低かった試験区の個体を分析し、DOの指標として利用できる可能性を持つ微量元素を選出した。(2) DOの季節変化が異なる3つの試験区の垂下個体を分析し、(1)で選出した微量元素の濃度とDOの関係を検証し、DOの指標として利用できる微量元素を明らかにした。

東京湾を対象とした研究では、ホンビノスガイの微量元素濃度を分析し、サブテーマ1と連携し貝殻に刻まれる成長阻害輪から貝殻が形成された時期を特定し、貝殻の微量元素濃度とDOの季節変化が対応するか検討することで、DOの指標として利用できる微量元素を明らかにした。

### (2-1. DOの指標となりうるアコヤガイ貝殻の微量元素)

アコヤガイを垂下した試験区のうち、赤崎B-1 mでDOが最も低い値をとり、変動幅がほかの試験区より大きかった(図3)。英虞湾の貧酸素海域では、DOが低い時期に海水のMn濃度が上昇する傾向があり(図21B)、赤崎B-1 mにおけるDOの大きな季節変化を反映してアコヤガイ貝殻のMn濃度も大きく変動すると予想される。さらに、貝殻のMn濃度の変動パターンと同調して濃度が大きく変化する元素があれば、その元素もDOの指標として期待できる。そこで、赤崎B-1 mに垂下した個体の貝殻を分析し、Mnを含む複数の元素濃度の変動パターンを確認し、DOの指標となりうる元素を検討した。

赤崎B-1 mで垂下したアコヤガイの貝殻を分析した結果を図23に示す。貝殻の微量元素濃度は微量元素とカルシウムのモル比として表わす(例: マグネシウム濃度はMg/Ca)。貝殻のMg/Caは15-30 mmol/molの範囲で変動したのに対し、Mn/Caは13-141 mmol/molの広い範囲で変動した(図23上段)。Mg/CaとMn/Caの変動パターンは類似しており、両者には有意な正の相関が認められた( $p < 0.05$ ) (図24)。

過去の研究により貝殻のMg/Caは貝殻の成長速度や有機物など複数の要因から影響を受けて変動することが報告されている(Tanaka et al., 2019, *Chem. Geol.*)。しかし、海水のマグネシウム濃度はDOの影響を受けないため、貝殻のMg/CaもDOの影響を受けない。したがって、Mg/CaとMn/Caの間に観測された正の相関は、貝殻のMn/CaとMg/Caは共通の要因の影響を受けており、その共通の要因はDOではないことを示している(成果番号25)。

図23 貧酸素環境を経験したアコヤガイ貝殻の成長方向（右向き）に沿った微量元素濃度の変動（上段：Mn/Ca, Mg/Ca, 下段：Mn/Mg, Mo/Ca）。

図24 図23に示したアコヤガイ貝殻のマンガン濃度とマグネシウム濃度の関係。

モリブデン濃度（Mo/Ca）の変動を図23下段に示す。Mn/Caと同様にMo/Caには2つのピーク（ $>4 \mu\text{mol/mol}$ ）が観測された。Mn/Caが主にDOを反映すると仮定すると、Mn/Caと類似した変動パターンを示すMo/CaもDOを反映している可能性が示唆される。貝殻のMo/Caが貧酸素の指標として利用できるか検討するため、海洋におけるモリブデンの化学的動態を理解する必要がある。海洋のモリブデンはモリブデン酸イオン（ $\text{MoO}_4^{2-}$ ）として存在するが、有機物や鉄マンガン酸化物など海洋の懸濁粒子に吸着して海底面へと沈降し堆積する。したがって、懸濁粒子が共存する環境でモリブデン酸イオンの溶存態はほとんど存在しない。海底に堆積した懸濁粒子が分解すると吸着していたモリブデン酸イオンが遊離して間隙水や海水に溶存態のモリブデン酸イオンが供給されると考えられる（Sulu-Gambari, et al., 2017, *Chem. Geol.*）。成層化した海洋の底層で、有機物が大量に分解されると（図22A,F）DOが低下するとともにモリブデンの存在状態が吸着態から溶存態に変化して海水に供給され、貝殻にモリブデンが取り込まれると考えられる。したがって、貧酸素環境下におけるモリブデンの化学的動態に基づき、貝殻のMo/CaもDOの指標として利用できる可能性がある。

## （2-2 DOとアコヤガイ貝殻の微量元素の関係）

貝殻のMn/CaとMo/CaをDOの指標として利用できるか検討するため、DOが異なる試験区で垂下されたアコヤガイの貝殻を分析した。研究所前、赤崎 5 m、赤崎 B-1 mで垂下されたアコヤガイの貝殻を分析し、貝殻のMn/CaとMo/Caと各試験区のDOを比較した（赤崎 B-1 m では(2-1)で分析した個体とは別の個体を追加で分析した）。各試験区におけるDOの時間変化（図3）と貝殻の成長方向に沿った微量元素濃度の変化を時系列に沿って比較するため、サブテーマ1と協力し、水温の指標である $\delta^{18}\text{O}$ も同一個体で分析した。

同一個体から得られた微量元素濃度（Mg/Ca、Mn/Ca、Mo/Ca）と $\delta^{18}\text{O}$ を図25に示す。 $\delta^{18}\text{O}$ の温度依存性（高水温時に低く、低水温時に高い）に基づき、夏季（S）と冬季（W）に相当する貝殻の位置を推定し、それぞれオレンジと水色のハッチで示した。各試験区でロガーを用いてモニタリングしたデータを参照した結果、水温が高かった7月～9月上旬のDOは研究所前 > 赤崎5 m > 赤崎B-1 mの順で低かった（図3）。一方、夏季（S）に形成された貝殻のMn/Ca（図25B,E,H）は、赤崎5 m（ $60\text{--}70 \mu\text{mol/mol}$ ） > 研究所前（ $50 \mu\text{mol/mol}$ ） > 赤崎B-1 m（ $30 \mu\text{mol/mol}$ ）の順で低かった。そのため、(2-1)で予想されたようなDOと貝殻のMn/Caの相関は認められなかった。さらに、垂下期間における赤崎B-1 mのDO（図3）は、 $2\text{--}10 \text{mg/L}$ の広い範囲で変化していたにもかかわらず、同所に垂下したアコヤガイ貝殻のMn/Caは垂下期間を含む冬季（W）から採取日（横軸が0 mm）まで、ほとんど一定の値を示した（図25H）。同一個体の $\delta^{18}\text{O}$ と微量元素を併用し、貝殻に記録されたMn/Caの季節変化と試験区でモニタリングしたDOを比較した結果、当初の予想と反してアコヤガイ貝殻のMn/CaはDOを反映しないことが明らかとなった。

図25 (A - C) 研究所前、(D - F) 赤崎 5 m、(G - I) 赤崎 B - 1 m で垂下したアコヤガイの貝殻成長軸に沿った微量元素濃度の変化（貝殻の成長方向は左向き）。同一個体で得られた  $\delta^{18}O$  も示す（◇）。夏季 (S) と冬季 (W) に相当する貝殻の位置をそれぞれオレンジ色と青色のハッチで示す。

図25上段 (A,D,G) に貝殻のMo/Caを示す。夏季 (S) に着目すると、赤崎 5 mではMo/Ca の著しい上昇 ( $9 \mu\text{mol/mol}$ ) が見られた (図25D)。赤崎 B-1 mでは夏季 (S) より1 mm程度手前 (つまり夏季 (S) より早い時期) にMo/Ca のピーク ( $5 \mu\text{mol/mol}$ ) が見られた (図25G)。研究所前の個体では (図25A)、貝殻の腹縁付近でMo/Caがおよそ  $8 \mu\text{mol/mol}$  まで上昇したが、夏季 (S) に形成された貝殻のMo/Caは  $1 \mu\text{mol/mol}$  未満の低い値を示した。夏季のDOは赤崎 5 mより赤崎 B-1 mで低かったが、Mo/Caのピークは赤崎 B-1 mより赤崎 5 mで大きかった。その理由として、サブテーマ1で明らかとなった貧酸素によるアコヤガイの成長速度の著しい減少 (あるいは成長の停止) が考えられる。図25の冬季 (W) から0 mmまでの距離は垂下前の冬から垂下終了までの成長幅に相当し、この成長幅は研究所前 > 赤崎 5 m > 赤崎 B-1 mの順で大きかった。したがって、微量元素濃度を分析した個体でも、DOが低い試験区ではアコヤガイの成長速度が小さかったといえる。このことから、赤崎B-1 mの個体は水温が高くDOが著しく低かった9月頃 ( $DO \approx 2 \text{ mg/L}$ , 図3) に貝殻の形成を停止していた可能性が示唆され、夏季の海洋環境が貝殻に記録されなかったと推測される。一方、赤崎 5 mに垂下した個体では夏季 (S) に明瞭なMo/Caのピークが認められ、この試験区で最も水温が高くDOが低かった7-8月の環境を反映していると考えられる。

英虞湾で垂下したアコヤガイの貝殻を分析した結果から、Mn/CaはDOを反映しなかった。一方、Mo/CaはDOの低下に伴い上昇する傾向が確認できた。しかし、DOが高い環境で形成された貝殻でMo/Caが上昇するケースも観測されことから (図25A)、DO以外にも貝殻のMo/Caに影響を与える要因があると予想される。したがって、Mo/Caを使ってDOの履歴をより高精度で推定するためには、Mo/Caに対するDO以外の影響を把握することが重要といえる (成果番号19)。

### (2-3 東京湾の貧酸素現象を反映する貝殻微量元素の探索)

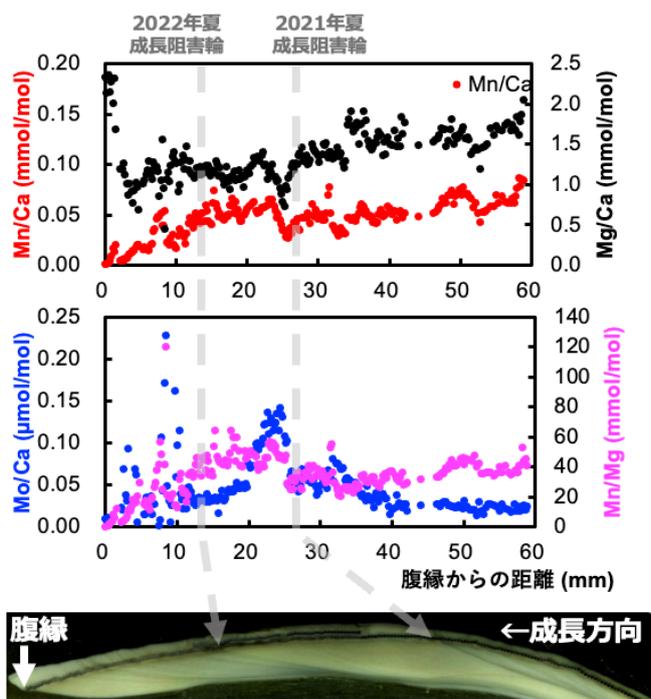


図26 東京湾で採種したホンビノスガイの微量元素濃度（上段：Mn/Ca, Mg/Ca, 下段：Mo/Ca, Mg/Ca）と分析した貝殻切断面の写真。

の成長が完全に停止しており、貝殻に海洋環境が記録されなかった可能性が示唆される。一方、他の時期に比べて成長速度は著しく小さいが、成長阻害輪付近でも貝殻が形成されていたと仮定した場合でも、浦安沖ではDOとMn濃度に有意な相関が認められなかったため（図22E）、海水の溶存Mn濃度及び貝殻のMn/Caに対するDOの寄与は小さく、貝殻のMn/CaはDOを反映しないと考えられる。したがって、ホンビノスガイのMn/CaはDOの指標として利用できないと判断した。

一方、貧酸素にともなう成長阻害輪から腹縁側に数mm移動した位置で貝殻のMo/Caが高い値を示した。貧酸素環境が解消された直後に形成された貝殻にモリブデンが多く取り込まれたといえる。（2-1）章で述べたように、貧酸素水塊が発生すると堆積物から間隙水へと溶存態のモリブデン酸イオンが溶出する。貧酸素で生じたモリブデン酸イオンが間隙水中に滞留し、成長速度が回復した段階で貝殻に取り込まれた可能性が考えられるが、詳細を把握するためには海水や間隙水のモリブデン濃度も測定する必要がある。

以上のように、サブテーマ2では、サブテーマ1の同位体比分析から特定された時系列情報を挿入することで、時系列の元素濃度の変動を復元し、その変動要因を解明した。本研究で分析した英虞湾のアコヤガイと東京湾のホンビノスガイに共通して、Mn/CaがDOを反映しないことを明らかにした。海域や貝類の種が異なると必ずしも貝殻のMn/Caを貧酸素の指標として利用できないことが分かったとともに、今回新たな知見として、英虞湾のアコヤガイと東京湾のホンビノスガイに共通して、貝殻のMo/Caが主にDOの変動を記録することが示唆された（図25D,26）。環境（大型河川や人為的汚染の有無、水温など）が大きく異なる東京湾と英虞湾で、生態が異なる別種の貝類（表在性のアコヤガイと内在性のホンビノスガイ）を分析した結果、両者に共通してモリブデン濃度とDOに関連が認められた。したがって、環境が異なる海域に生息する表在性および内在性二枚貝の貝殻に記録された微量元素濃度を指標として活用し、貧酸素現象を過去にさかのぼって推定できる可能性が示唆された。Mo/CaはDO以外からも影響を受けると予想されるため、貝殻のMo/Caをより高精度の指標として利用していくためには、今後の研究で海水や間隙水におけるモリブデンの挙動を把握する必要がある。

### (3) 殻皮の炭素・窒素・硫黄同位体比の測定方法の確立

殻皮には有機物と炭酸カルシウムが含まれ、それぞれに生息環境の窒素動態や水温などが記録される。

英虞湾とは対照的に複数の大型河川から淡水が流入する東京湾において、DOを反映する貝殻の微量元素濃度を検討した。サブテーマ1と共同で、東京湾浦安沖から採取したホンビノスガイ貝殻の微量元素濃度（Mn/Ca, Mg/Ca, Mo/Caなど）を分析した結果を図26に示す。サブテーマ1が実施した成長線解析の結果を共有し、図26では2021年及び2022年の夏季に形成された成長阻害輪の位置と微量元素濃度の変化を比較した。（2-1）章でDOを反映しうる微量元素として選出されたMn/CaとMo/Caについて議論する。

図26に微量元素を分析したホンビノスガイ貝殻切断面の写真を示す。腹縁からの距離が12 mmと28 mmの位置でそれぞれ2022年と2021年の夏季に発生した貧酸素現象による成長阻害輪が観察された。ホンビノスが生息する底層でDOが低かった時期に形成されたこれらの成長阻害輪付近の貝殻でMn/Caの上昇は認められなかった。この結果から、貧酸素環境下で形成される阻害輪付近では貝殻

ムラサキガイを対象に殻皮有機物の炭素・窒素・硫黄安定同位体比 ( $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$ ,  $\delta^{34}\text{S}$ ) と炭酸カルシウムの炭素・酸素同位体比 ( $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{18}\text{O}$ ) を分析する手法を確立するため、殻皮の有機物濃度と炭酸カルシウムの比率を検証した。ハンドドリルを使ってムラサキガイ貝殻から削り取った殻皮の粉末を2つに分けた(図27)。一方の粉末には2% HClを滴下し炭酸カルシウムを除去(脱灰)し、元素分析計を使って有機物量を定量した。もう一方の粉末は安定同位体比質量分析計を使って炭酸カルシウム濃度を測定した。その結果、削り取った殻皮粉末は有機物と炭酸カルシウムをおよそ50%ずつ含むことがわかった。

次にムラサキガイ1個体の殻頂から貝殻先端まで成長方向に沿って、同時期に形成された殻皮からおよそ1-6 mgの粉末を削り取った。この粉末のうちおよそ0.2 mgを分取し、炭酸カルシウムの酸素同位体比を分析した。残りの粉末は脱灰して有機物のみの残渣を得た。このようにして得られた殻皮有機物の炭素・窒素・硫黄同位体比を安定同位体比質量分析計で分析した。

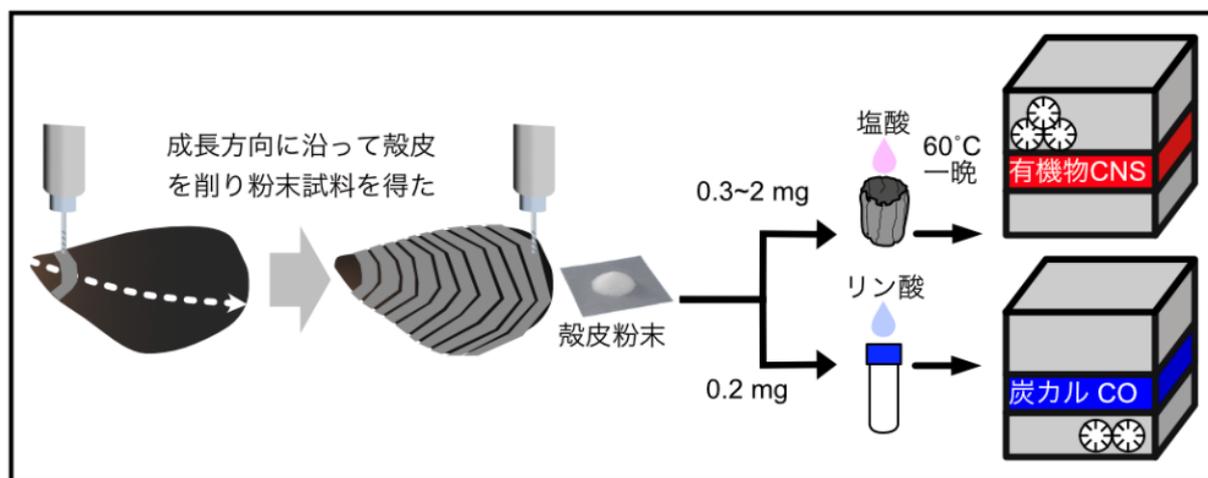


図27 殻皮の安定同位体比測定の作業工程

分析誤差 (1SD) は炭酸カルシウムの $\delta^{13}\text{C}$ と $\delta^{18}\text{O}$ で $\pm 0.1\%$ 、殻皮有機物の $\delta^{13}\text{C}$ と $\delta^{15}\text{N}$ でそれぞれ $\pm 0.1\%$ 、 $\pm 0.3\text{-}1.0\%$ で、環境モニタリングに必要な精度を達成できた。殻皮から十分量の粉末を採取できなかった場合も(2 mg未満)、分析は可能だったが $\delta^{15}\text{N}$ の誤差が比較的高くなった。そのため、殻皮粉末は少なくとも2 mg以上を目安に削り取ることが推奨される。一方、殻皮有機物の硫黄濃度は炭素と窒素の濃度よりも著しく低く、同位体質量分析計で十分な強度が得られず分析できなかった。この分析結果から、殻皮有機物の $\delta^{13}\text{C}$ と $\delta^{15}\text{N}$ と同時に $\delta^{34}\text{S}$ も分析するためには殻皮粉末が20 mg以上必要だと計算された。しかし、削り取る粉末の量を増やすと時間解像度が粗くなるため、今回は時間解像度を優先し硫黄同位体比の分析は行わなかった。これらの結果から、沿岸環境を記録しうる殻皮の複数の同位体比を効率的に分析する手法を確立できたといえる(成果番号26)。

#### (4) 窒素同位体比を活用した窒素動態の復元法の開発(東京湾)

次に、東京湾から採取された貝類を用いて、(3)章で確立した測定法により貝殻から窒素動態を復元する手法を開発した。東京湾に面する神奈川県金沢漁港(N=2)と久里浜漁港(N=3)からムラサキガイを2023年7月2日に採集した(図28)。東京湾と比較するため、新潟県佐渡市両津港で2018年5月23日に採取されたムラサキガイ貝殻(N=1)を研究協力者(白井)から譲り受けた。東京湾で採集した個体は冷凍で保管し、解剖の直前に解凍した。貝殻と軟体部を分離し、貝殻表面の付着生物などを除去した後、MQ水で洗浄し乾燥した。貝殻の成長方向に沿って殻皮を削り2 mg以上の粉末を得た。殻皮粉末を上記の方法(図27)で分析し、炭酸カルシウムの $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{18}\text{O}$ と有機物の $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$ を分析した。

貝殻(炭酸カルシウム)の $\delta^{18}\text{O}$ は水温と塩分(海水の $\delta^{18}\text{O}$ )を反映して変動するため、生息域の水温と塩分の季節変化に基づき、貝殻から得られた $\delta^{18}\text{O}$ から貝殻が形成された季節を特定できる。ムラサキガイ貝殻が形成された季節を特定するため、水温(東京湾環境情報センター、中ノ瀬航路)と降水量(気象庁、横浜)のデータを参照し、冬は水温が低く、降水量が少ないことを確認した(図28B, C)。

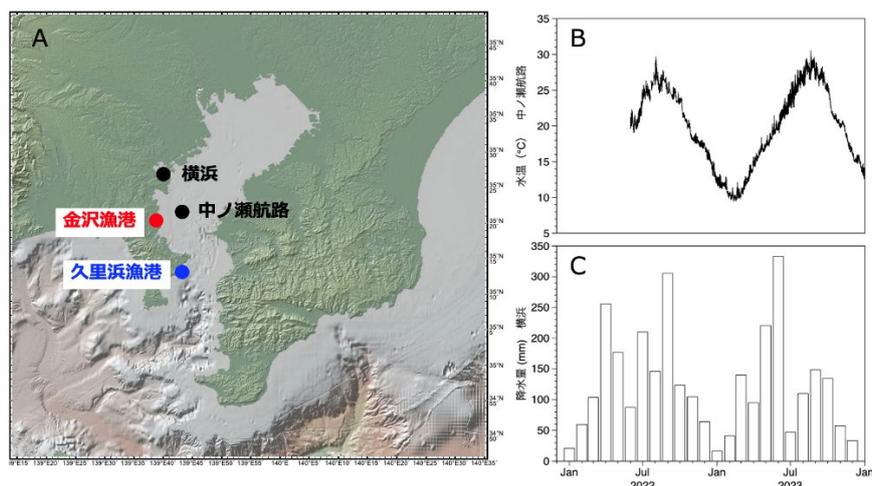


図28 (A)東京湾ムラサキイガイの採取地点と水温（中ノ瀬航路）と降水量（横浜）のデータが観測された地点．(B)水温と(C)降水量の季節変化（2022-2023年）．

殻皮有機物の $\delta^{15}\text{N}$ と貝殻の $\delta^{18}\text{O}$ の分析結果を図29に示す（炭素同位体比の結果は後述）。水温が低く降水量が少ない冬に $\delta^{18}\text{O}$ が極大値を取り、水温が高く降水量が比較的多い夏に貝殻の $\delta^{18}\text{O}$ が極小値をとることを踏まえて、図29に季節を示す点線を挿入した（佐渡ヶ島のデータは季節変動について議論しない）。東京湾と佐渡ヶ島の $\delta^{15}\text{N}$ を図30で比較する。金沢漁港12.5 ( $\pm 0.8$ ) ‰、久里浜漁港10.5 ( $\pm 0.9$ ) ‰、佐渡ヶ島6.0 ( $\pm 0.7$ ) ‰で、東京湾では佐渡ヶ島よりも $\delta^{15}\text{N}$ がおおよそ4-6‰高かった。

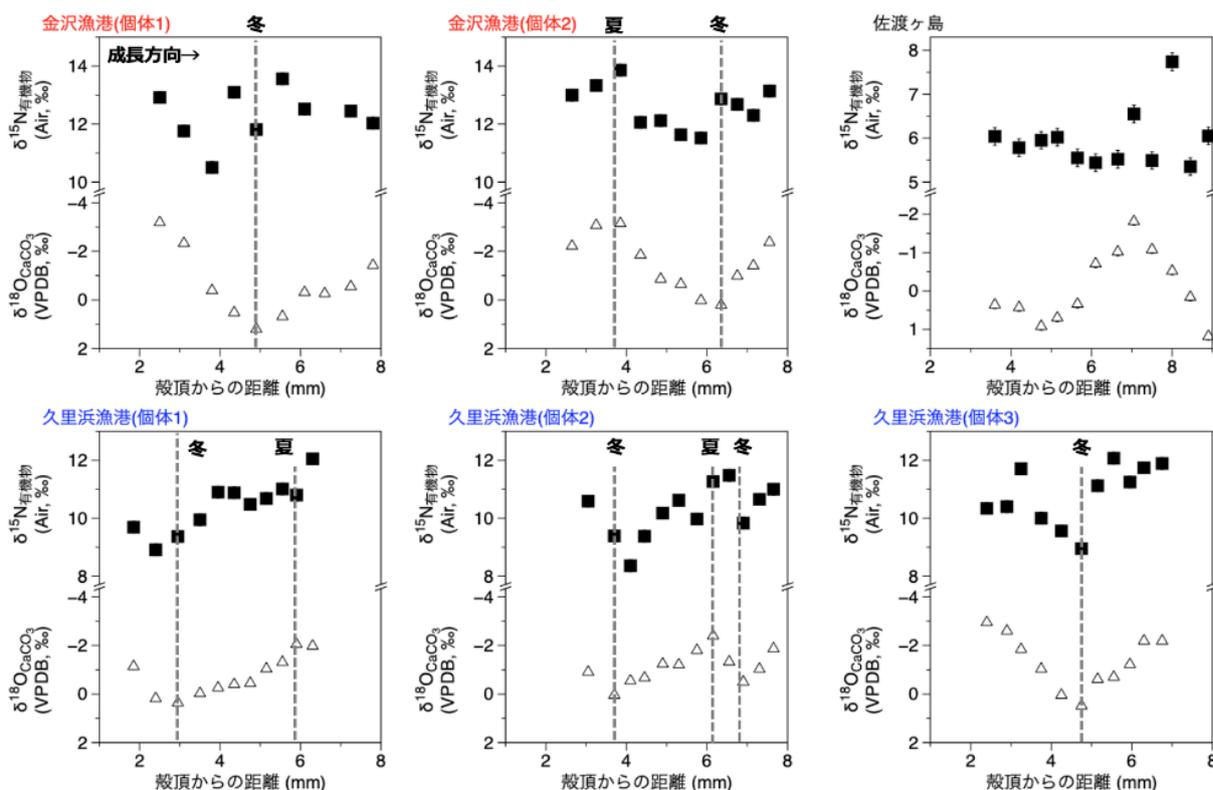


図29 ムラサキイガイ殻皮の有機物の $\delta^{15}\text{N}$  (■) と炭酸カルシウムの $\delta^{18}\text{O}$  (△, 縦軸の値を反転)

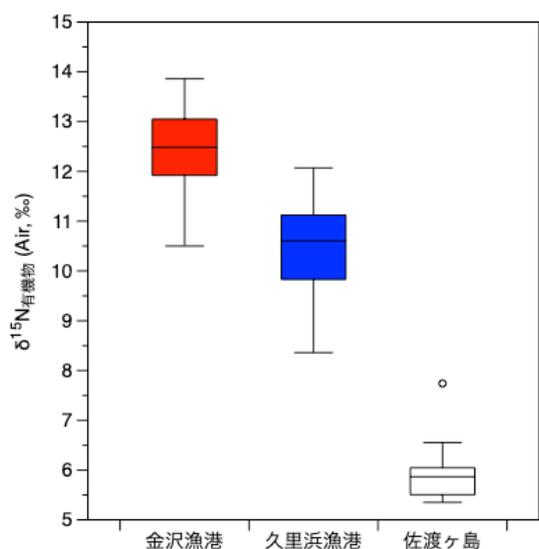


図30 ムラサキイガイ殻皮有機物の $\delta^{15}\text{N}$ を示す箱ひげ図.

ムラサキイガイの $\delta^{15}\text{N}$ は、(1)栄養段階と(2)海域ごとの一次生産者の $\delta^{15}\text{N}$ （ベースライン）を反映する。(1)について、生物の栄養段階が1つ上がると $\delta^{15}\text{N}$ は3.4‰程度上昇することが知られている。(2)について、一次生産者である植物プランクトンの $\delta^{15}\text{N}$ はその海域における硝酸の $\delta^{15}\text{N}$ によって決まる。硝酸の $\delta^{15}\text{N}$ は硝酸態窒素の起源ごとに特有の値を持つため、海域ごとに異なる。

濾過摂食者であるムラサキイガイの栄養段階は東京湾と佐渡湾でほとんど同じであり、殻皮有機物の $\delta^{15}\text{N}$ で観測された地域差は栄養段階で説明できない。したがって、殻皮有機物 $\delta^{15}\text{N}$ の地域差(図30)は海域ごとのベースラインの差を表わしており、東京湾と佐渡ヶ島では海洋に供給される硝酸態窒素の $\delta^{15}\text{N}$ (すなわち、硝酸態窒素の起源)が異なることが示唆された。

東京湾と佐渡ヶ島で観測された海水中の形態別窒素濃度を表2に示す(佐渡市, 2017; 東京湾岸自治体環境保全会議, 2019)。金沢漁港や久里浜漁港周辺の亜硝酸態窒素( $\text{NO}_2^-$ )と硝酸態イオン( $\text{NO}_3^-$ )は佐渡ヶ島周辺よりも非常に高い。東京湾には人為起源の窒素やリンが排出され富栄養化が起きていることが報告された(石井・大畑, 2010, 沿岸海洋研究)。東京湾に供給される硝酸態窒素など無機溶存窒素の起源として、河川を通じた排水の流入や底泥からの溶出など複数の要因が挙げられるが(風間・安藤, 2010, 地球環境)、下水処理場由来の窒素の寄与が大きいことが示唆された(石井・大畑, 2010, 沿岸海洋研究)。一方、東京湾周辺に比べて人口密度が低い佐渡ヶ島では人為起源の窒素流出が限定的で、窒素汚染の程度が小さい。特にヒト排泄物(下水)由来の硝酸態窒素は高次捕食者であるヒトの栄養段階を反映し高い $\delta^{15}\text{N}$ を持つため、下水由来の硝酸態窒素の影響により、東京湾の海水に溶存する硝酸態窒素の $\delta^{15}\text{N}$ は佐渡ヶ島周辺より高いと考えられる。ムラサキイガイ殻皮有機物の $\delta^{15}\text{N}$ はこのような人為的な窒素の流入と関連したベースラインの地域差を反映していると示唆される。このようにムラサキイガイ殻皮有機物の $\delta^{15}\text{N}$ は沿岸表層における硝酸態窒素の起源を反映するため、人為起源の窒素流入による富栄養化の指標として利用できる。

表2 東京湾及び佐渡市の海洋における形態別窒素濃度 (mg/L)

海域	備考	観測年	$\text{NH}_4^+$	$\text{NO}_2^-$	$\text{NO}_3^-$	全窒素
金沢漁港	東京湾 C 類型	2019	0.14	0.045	0.49	1.06
久里浜漁港	東京湾 B 類型	2019	0.08	0.037	0.30	0.74
佐渡ヶ島(両津湾)	-	2015	-	<0.01	0.02	-

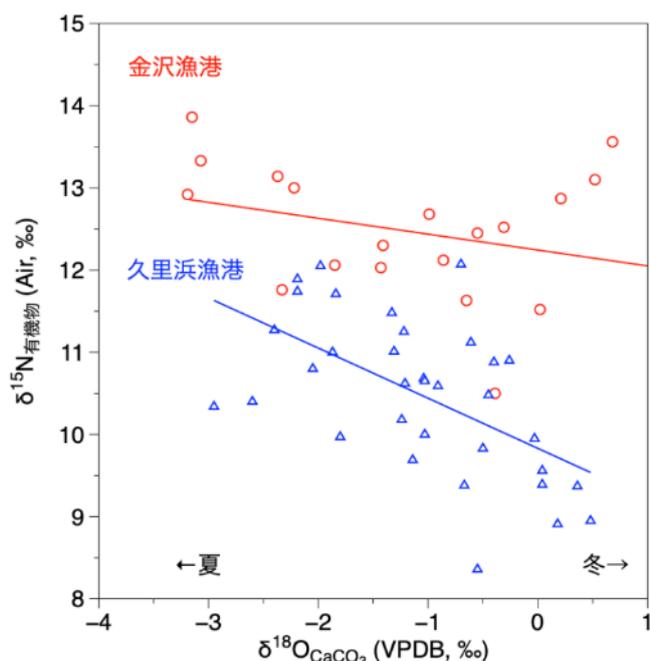


図31 東京湾から採取したムラサキイガイの炭酸カルシウムの $\delta^{18}\text{O}$ と殻皮有機物の $\delta^{15}\text{N}$ の関係。

海域では $^{14}\text{N}$ が生物によって優先的に固定されるため、海水に残る硝酸態窒素の $\delta^{15}\text{N}$ が増加し、食物連鎖を通じて殻皮有機物の $\delta^{15}\text{N}$ も増加すると考えられる。これらの複合的な要因によって東京湾表層に溶存する硝酸態窒素の $\delta^{15}\text{N}$ は季節変化を持つと示唆される。表層海水に溶存する硝酸態窒素の $\delta^{15}\text{N}$ の季節変化はムラサキイガイ殻皮有機物の $\delta^{15}\text{N}$ に反映されるため、殻皮を利用することで高い時間解像度（季節スケール）で沿岸域に流入する人為起源窒素の増減を把握できる。（成果番号26、29）

#### (5) 貝殻の炭素同位体比を活用した貧酸素動態の解明

海洋底層において、海底堆積物に含まれる生物起源の有機物が分解されて貧酸素水塊が形成されると、生物由来の低い $\delta^{13}\text{C}$ を持つ $\text{CO}_2$ が海水に供給されて海水の $\delta^{13}\text{C}_{\text{SW}}$ が低下し、ホンビノスガイなど底層に生息する貝類の $\delta^{13}\text{C}_{\text{CaCO}_3}$ も低下する可能性がある。また、海洋表層では河川を通じた栄養塩の流入や一次生産などの影響を受けて、 $\delta^{13}\text{C}_{\text{SW}}$ および貝殻の $\delta^{13}\text{C}_{\text{CaCO}_3}$ が変動すると考えられる。したがって、貧酸素や海洋表層における一次生産の指標として貝殻の $\delta^{13}\text{C}_{\text{CaCO}_3}$ を利用できる可能性がある。そこで、東京湾で採水した海水のDIC（図22F）とホンビノスガイおよびムラサキイガイの貝殻の $\delta^{13}\text{C}_{\text{CaCO}_3}$ を比較し、 $\delta^{13}\text{C}_{\text{CaCO}_3}$ を環境の指標として利用できるか検討を行なった。

海洋生物が形成する炭酸カルシウムの炭素には、海水由来の溶存無機炭素（DIC）と呼吸由来の二酸化炭素（ $\text{CO}_2$ ）が利用されるため、炭酸カルシウムの炭素同位体比（ $\delta^{13}\text{C}_{\text{CaCO}_3}$ ）は次式で表される（McConnaughey et al., 1997）。

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{CaCO}_3} - \varepsilon = R_M \times \delta^{13}\text{C}_M + (1 - R_M) \times \delta^{13}\text{C}_{\text{SW}} \quad (3)$$

ここで、 $\varepsilon$ は定数（+2.7‰）、 $R_M$ は呼吸由来の炭素の寄与率（%）、 $\delta^{13}\text{C}_M$ は生物の呼吸に由来する炭素の $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^{13}\text{C}_{\text{SW}}$ は海水DICの $\delta^{13}\text{C}$ を表わす（ただし、一般的に $\delta^{13}\text{C}_M < \delta^{13}\text{C}_{\text{SW}}$ の関係が成り立つ）。この式は、 $\delta^{13}\text{C}_{\text{CaCO}_3}$ が(1)  $R_M$ 、(2)  $\delta^{13}\text{C}_M$ 、(3)  $\delta^{13}\text{C}_{\text{SW}}$ の影響を受けて変化することを示す。このうち(3)のみが実測可能で、(1)と(2)は実測が困難である。しかし、貝類の生態や本研究で観測した海洋環境の変化から、(1)と(2)の定性的な変化を推測可能であり、本研究では(3)式に基づいて $\delta^{13}\text{C}_{\text{CaCO}_3}$ の変動に影響を与える主な要因を明らかにした（図32）。

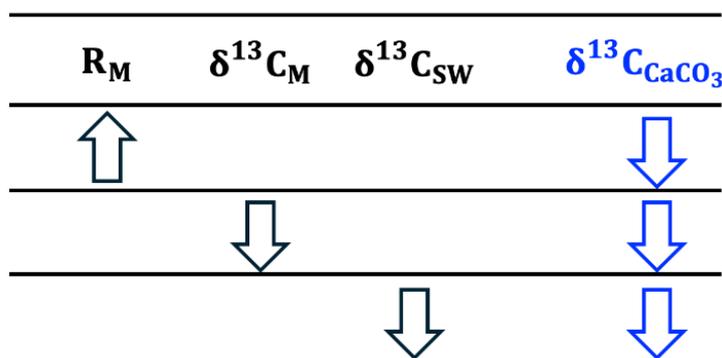


図32 (2)式に基づき $R_M$ 、 $\delta^{13}C_M$ 、 $\delta^{13}C_{SW}$ が $\delta^{13}C_{CaCO_3}$ に与える影響を模式的に示す。  
 $R_M$ の上昇、 $\delta^{13}C_M$ の低下、 $\delta^{13}C_{SW}$ の低下により $\delta^{13}C_{CaCO_3}$ が低下する。

図9に示したように、春から秋の間（6, 9, 10月）は表層より底層でDO及び $\delta^{13}C_{SW}$ が低かく、両者に比例関係が認められた（図22F）。一方、冬季（2023年2月）は表層から底層にかけてDOと $\delta^{13}C_{SW}$ がほぼ一定だった（図9）。この結果は、海底に堆積した生物由来の低い $\delta^{13}C$ を持つ有機物が消費され底層で貧酸素水塊が形成されると同時に $\delta^{13}C_{SW}$ が低下したことを示唆する。

図33にホンビノスガイ貝殻の $\delta^{13}C$ と $\delta^{18}O$ を比較した。ホンビノスガイの貝殻の $\delta^{13}C_{CaCO_3}$ は、0.0‰から-4.5‰の範囲で変動し、夏に低く冬に高い傾向を示した。上述のようにホンビノスガイが生息する底層では夏季にDOの低下と連動して $\delta^{13}C_{SW}$ も低下した（図22F）。さらに、 $\delta^{13}C_{SW}$ の低下によって(3)式から貝殻の $\delta^{13}C_{CaCO_3}$ も低下したと判断できる。

一方、貝類など海洋生物の呼吸で生じる $CO_2$ の $\delta^{13}C_M$ は海水の $\delta^{13}C_{SW}$ より低い値を持つ。そのため、代謝が制限され呼吸量が低下（すなわち、(3)式の $R_M$ が低下）するような環境では、貝殻の $\delta^{13}C_{CaCO_3}$ に対する $\delta^{13}C_{SW}$ の寄与率（(3)式の $(1-R_M)$ ）が相対的に高くなり $\delta^{13}C_{CaCO_3}$ が増加する。貝殻の成長量の推移（図10）から示されたように、ホンビノスガイは3-6月に最も成長しており、夏や冬は著しく成長が低下した。この結果から、3-6月は代謝が活発で $R_M$ が高く、夏や冬は $R_M$ が低かったと推定される。このような $R_M$ の季節変化が貝殻の $\delta^{13}C_{CaCO_3}$ に強く影響すると仮定すると、貝殻の $\delta^{13}C_{CaCO_3}$ は春に最も低くなり、夏と冬は高い値を示すと予想される。しかし、ホンビノスガイ貝殻の $\delta^{13}C_{CaCO_3}$ は夏に低く冬に高い傾向を示した（図33）。この結果は、 $R_M$ の影響は比較的小さく、上述したような貧酸素水塊の形成に伴う $\delta^{13}C_{SW}$ の低下が $\delta^{13}C_{CaCO_3}$ に大きく寄与していることを示す。したがって、ホンビノスガイ貝殻に記録される $\delta^{13}C_{CaCO_3}$ の季節変化は底層における貧酸素と連動した $\delta^{13}C_{SW}$ の変化を主に反映し、間接的に貧酸素の程度を示す指標として利用できる。

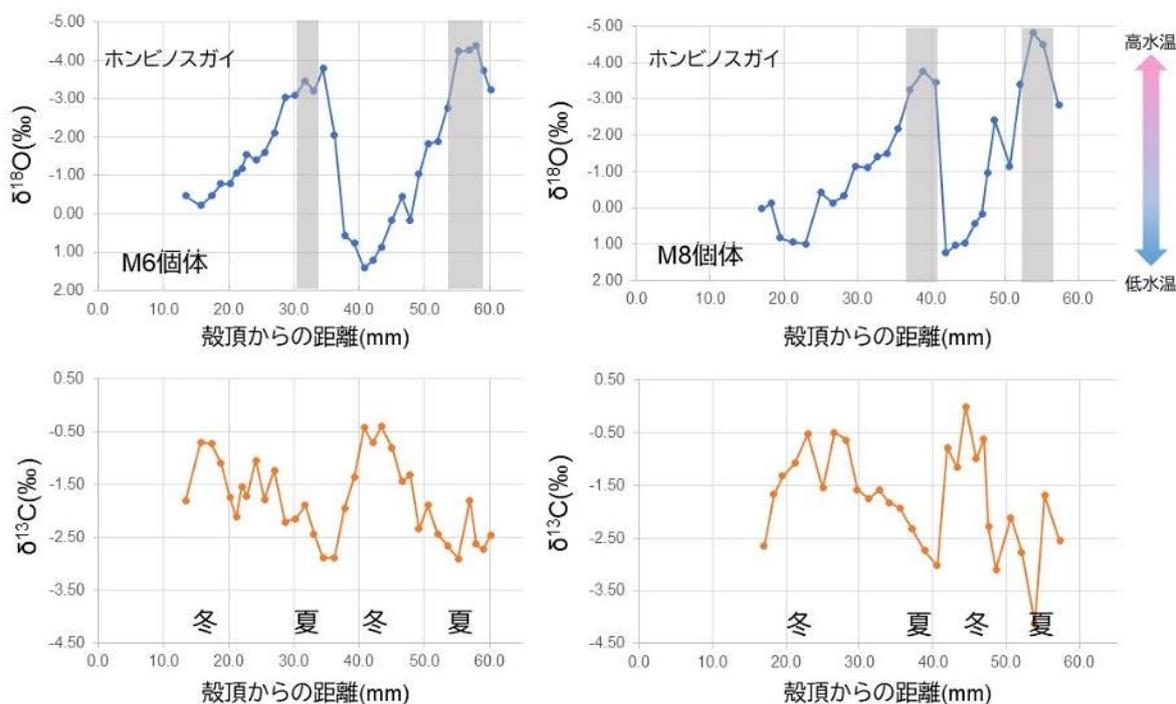


図33 ホンビノス2個体の殻の炭素・酸素同位体比 ( $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{18}\text{O}$ )。灰色のハッチ部分は成長障害輪が形成された部位を示す。

図34に東京湾の表層（潮間帯）で採取したムラサキガイの殻皮有機物の $\delta^{13}\text{C}$ 、炭酸カルシウムの $\delta^{13}\text{C}_{\text{CaCO}_3}$ 、 $\delta^{18}\text{O}_{\text{CaCO}_3}$ の分析結果を示す。また、有機物と炭酸カルシウムの $\delta^{13}\text{C}$ の季節変化を明らかにするため、殻皮が形成された季節を表わす $\delta^{18}\text{O}_{\text{CaCO}_3}$ と殻皮有機物の $\delta^{13}\text{C}$  (図35A) 及び貝殻の $\delta^{13}\text{C}_{\text{CaCO}_3}$  (図35B) の関係を示す。ムラサキガイの $\delta^{18}\text{O}_{\text{CaCO}_3}$ が低い時期(夏)に $\delta^{13}\text{C}_{\text{CaCO}_3}$ が低く、 $\delta^{18}\text{O}_{\text{CaCO}_3}$ が高い時期(冬)に $\delta^{13}\text{C}_{\text{CaCO}_3}$ が高い季節的な傾向を示した(図34,35)。図9に示すように、表層付近(0 m)の $\delta^{13}\text{C}_{\text{Sw}}$ は0-2%の範囲で変動し、一次生産が活発な春頃(2023年6月21日)に最大値が観測された。表層で一次生産が活発な時期は $\delta^{13}\text{C}$ が低いDICが優先的に光合成で固定されるため、海水に残るDICの $\delta^{13}\text{C}$ が上昇すると予想される。 $\delta^{13}\text{C}_{\text{Sw}}$ がムラサキガイの $\delta^{13}\text{C}_{\text{CaCO}_3}$ をコントロールする主要因と仮定した場合、(3)式に基づき一次生産が活発な春～夏にかけて $\delta^{13}\text{C}_{\text{CaCO}_3}$ が高いと予測される。しかし、冬に $\delta^{13}\text{C}_{\text{CaCO}_3}$ が高い結果が得られており、 $\delta^{13}\text{C}_{\text{CaCO}_3}$ に対する $\delta^{13}\text{C}_{\text{Sw}}$ の影響は比較的小さく、他の要因( $R_M$ と $\delta^{13}\text{C}_M$ )の影響が大きいと判断できる。

一次生産の増加に伴い $\delta^{13}\text{C}_{\text{Sw}}$ が上昇すると、植物プランクトンの $\delta^{13}\text{C}$ も上昇するため、捕食者であるムラサキガイの軟体部や殻皮を構成する有機物の $\delta^{13}\text{C}$ も上昇すると予測される。殻皮有機物の $\delta^{13}\text{C}$ は冬より夏に比較的高い傾向を示し(図35A)、この予測と整合的といえる。また、(3)式の $\delta^{13}\text{C}_M$ はエサとなる植物プランクトンと貝類の軟体部を構成する有機物の $\delta^{13}\text{C}$ を反映するため、一次生産が活発な春～夏に $\delta^{13}\text{C}_M$ が上昇し $\delta^{13}\text{C}_{\text{CaCO}_3}$ が高くなると推測される。しかし、 $\delta^{13}\text{C}_{\text{CaCO}_3}$ は冬に高く春から夏にかけて低下する傾向を示したこと(図35)、本研究のデータから推測される $\delta^{13}\text{C}_M$ の季節変化と $\delta^{13}\text{C}_{\text{CaCO}_3}$ の季節変化は一致しない。したがって、 $\delta^{13}\text{C}_{\text{CaCO}_3}$ に対する $\delta^{13}\text{C}_M$ の影響も比較的小さいと考えられる。

(3)式の $R_M$ をモニタリングする手法が確立されていないため、実測が難しい。しかし、一次生産が活発な時期は表層付近に生息するムラサキガイが濾過摂食するプランクトンが豊富で水温も高いため、呼吸量および $R_M$ が上昇すると推測される。一方、冬は一次生産が制限され水温も低い $R_M$ は比較的小さいと推測される。このような $R_M$ の季節変化と一般的に $\delta^{13}\text{C}_M < \delta^{13}\text{C}_{\text{Sw}}$ の関係が成り立つことを考慮すると、夏は $R_M$ が上昇することで低い値を持つ $\delta^{13}\text{C}_M$ の寄与が卓越し、冬は $R_M$ が低下し(すなわち $(1-R_M)$ が上昇し)、高い値を持つ $\delta^{13}\text{C}_{\text{Sw}}$ の寄与が卓越すると推定される。この推定は $\delta^{13}\text{C}_{\text{CaCO}_3}$ が夏に

低く冬に高い傾向と一致する。したがって、ムラサキイガイの $\delta^{13}\text{C}_{\text{CaCO}_3}$ は貝類の呼吸量に相当する $R_M$ の季節変化を強く反映すると推測される。そのため、殻皮の $\delta^{13}\text{C}$ と $\delta^{18}\text{O}$ を組み合わせることで、環境に応答して変化する貝類の代謝を表わす指標として利用できる可能性が示唆される。殻皮有機物の $\delta^{15}\text{N}$ と併用することで貧酸素の一因である富栄養化が貝類の代謝に与える影響をモニタリングできると期待される。

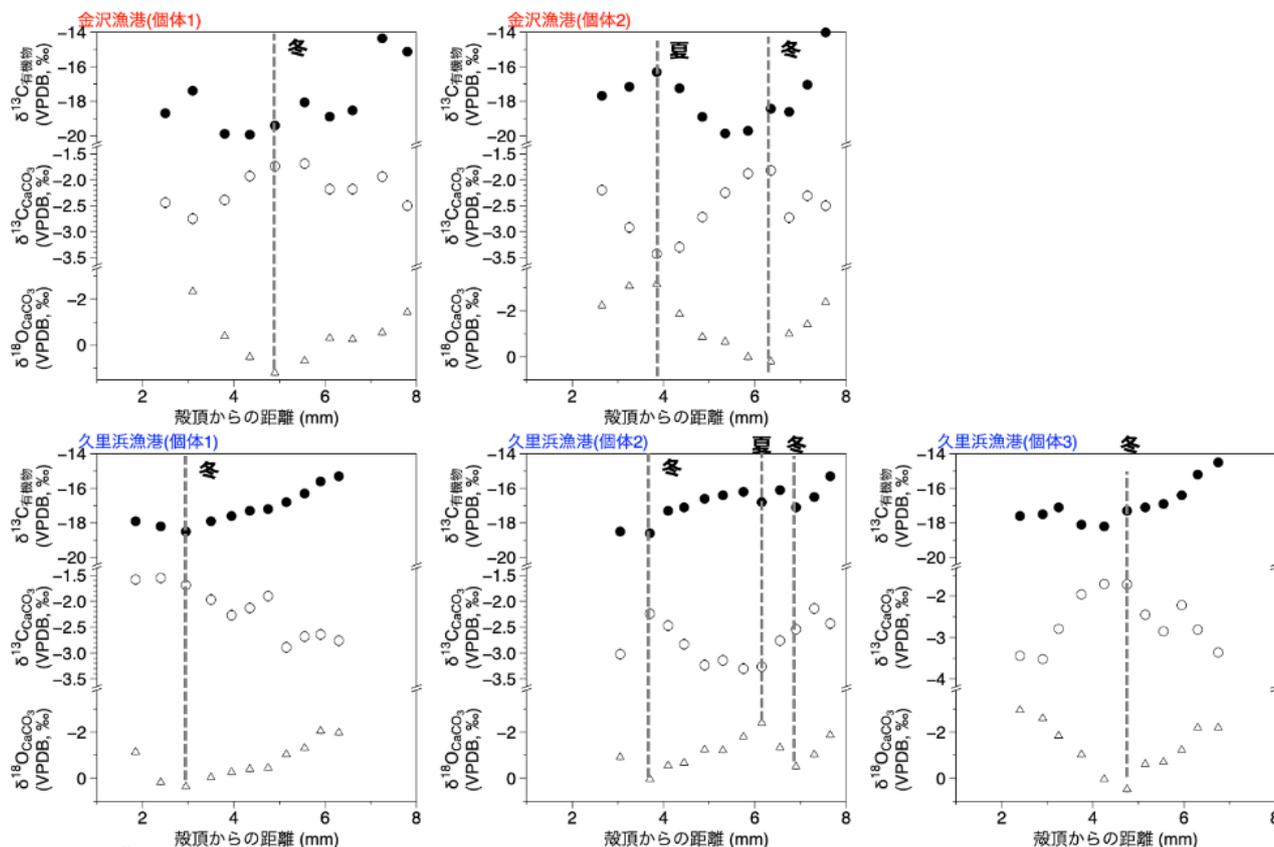


図34 東京湾で採取したムラサキイガイの殻皮有機物の $\delta^{13}\text{C}$ 、炭酸カルシウムの $\delta^{13}\text{C}_{\text{CaCO}_3}$ 、 $\delta^{18}\text{O}_{\text{CaCO}_3}$ の季節変化。

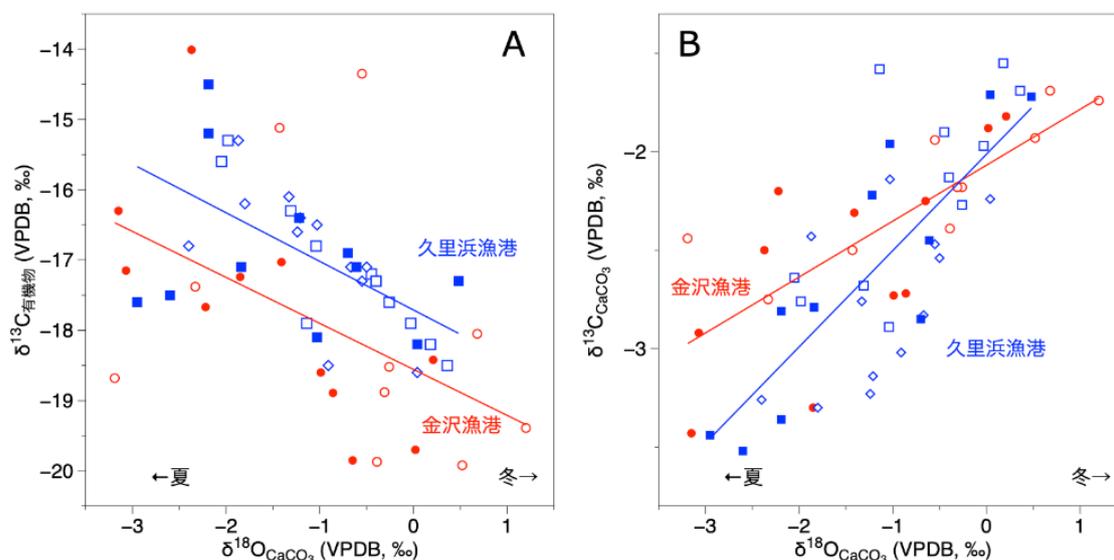


図35 東京湾で採取したムラサキイガイの $\delta^{18}\text{O}_{\text{CaCO}_3}$ と(A)殻皮有機物の $\delta^{13}\text{C}$ 、(B)殻の $\delta^{18}\text{O}_{\text{CaCO}_3}$ の関係。

なお、英虞湾においても貧酸素発生海域では夏季に底層の海水DICの $\delta^{13}\text{C}$ が低下していたため、アコヤガイでも同様に貧酸素の時期に貝殻の $\delta^{13}\text{C}$ が低下するか検討した。しかし、海水DICの $\delta^{13}\text{C}$ が低下していた貧酸素発生時期に殻の $\delta^{13}\text{C}$ が低下する傾向は観察されなかった。その理由として、(1) 底層に垂下したアコヤガイは貧酸素水塊の発生時期に著しく成長が低下していたことから貝殻にその時期の海水情報が記録されていなかったため、(2) 本種は $\delta^{13}\text{C}_{\text{SW}}$ よりも $R_M$ などの影響が大きいいため、の2つが考えられる。

上記の内容を図36に模式的に示した。炭素同位体比の分析結果から、 $\delta^{13}\text{C}_{\text{SW}}$ は底層の貧酸素、表層の一次生産と連動して春から秋にかけて低いことを明らかにした。底層に生息するホンビノスガイの $\delta^{13}\text{C}_{\text{CaCO}_3}$ は、貧酸素水塊の発生と連動した $\delta^{13}\text{C}_{\text{SW}}$ の低下の影響を強く受けるため、貧酸素の消長を反映する指標として利用できることを明らかにした。また、表層に生息するムラサキイガイの $\delta^{13}\text{C}_{\text{CaCO}_3}$ は $R_M$ の影響を強く受けるため、貝類の代謝を反映する指標として利用できる可能性が示唆された。さらに生態や生息環境が異なる別種の貝殻を分析したことで、貝殻の $\delta^{13}\text{C}_{\text{CaCO}_3}$ に強く影響する要因は季節、海域、貝類の種などに依存するため、指標として利用するには注意が必要であることを確認できた。ただし、貝殻と殻皮の同位体比が持つ傾向は、同じ地点から採取された個体間で異なる場合があるため、同一地点から複数個体を採取して分析する必要がある。

$$R_M \times \delta^{13}\text{C}_M + (1 - R_M) \times \delta^{13}\text{C}_{\text{SW}} = \delta^{13}\text{C}_{\text{CaCO}_3} - \varepsilon$$

底層/表層 夏の環境	貝類の種	$R_M$	$\delta^{13}\text{C}_M$	$\delta^{13}\text{C}_{\text{SW}}$	$\delta^{13}\text{C}_{\text{CaCO}_3}$
底層 貧酸素	ホンビノスガイ	↓	?	↓	↓
表層 一次生産増加	ムラサキイガイ	↑	↑	↑	↓

図36 本研究で観測された結果と(1)式に基づき $R_M$ 、 $\delta^{13}\text{C}_M$ 、 $\delta^{13}\text{C}_{\text{SW}}$ が貝殻の炭素同位体比( $\delta^{13}\text{C}_{\text{CaCO}_3}$ )に与える影響を模式化した( $R_M$ と $\delta^{13}\text{C}_M$ は環境データなどから推定)。

#### (6) 貝殻の酸素・炭素安定同位体比分析による東京湾の長期環境変動の復元

サブテーマ1と合同で、東京湾で過去に採取された貝類の貝殻の同位体比分析を行うことで、東京湾奥部の長期の環境履歴復元を行った(成果番号7)。海洋生物環境研究所の杉原奈央子博士にご協力いただき、2000年代、2010年代に採取されたホンビノスガイ(お台場海浜公園沖 水深2.5m、船橋沖水深2m)の個体について時系列の炭素・酸素同位体比分析を実施した。

同位体比分析結果を基に貝殻の形成年代を調べ、図37に示すように2005年から2022年までの長期の同位体変動の履歴を明らかにした。酸素同位体比の結果より、いずれの海域でも水温の季節変動がみられた。なお、船橋とお台場産の個体については、浦安沖よりも河川に近いため、低い海水の酸素同位体比の影響により約1%程分析値が全体に低くなっている。そのため、温度復元の際には海水の塩分を考慮する必要がある。

貝殻の炭素同位体比は、いずれの産地とも夏季に低く、冬季に高い値を示し(図37)、浦安沖で観測された海水のDICの炭素同位体比の変動(図9E)と類似した季節変化を示した。(5)にて解説したように、海洋底層において、海底堆積物に含まれる生物起源の有機物が分解されて貧酸素水塊が形成されると、微生物分解由来の低い $\delta^{13}\text{C}$ を持つ $\text{CO}_2$ が海水に供給されて海水のDICの炭素同位体比が低下する。貝殻に見られた季節変動は、貧酸素の強度を示しているものと思われる。また、浦安沖や船橋沖よりも、お台場沖の個体の方が炭素同位体比は1~4%程低い値を示した。お台場エリアでは、2006年に覆砂が実施され底質環境が改善されたことが報告されている(平成5年東京湾再生推進会議「東京湾再生のための行動計画(第二期)期末評価報告書」より)。お台場個体の炭素同位体比は2014年から2017年にかけて低

下傾向を示しており、覆砂から時間がたったことで貧酸素の悪化が起こったことが示唆された。お台場エリアは定点観測が行われていないが、このように貝殻を用いることで長期的な環境変遷の生物影響を評価できる可能性がある。

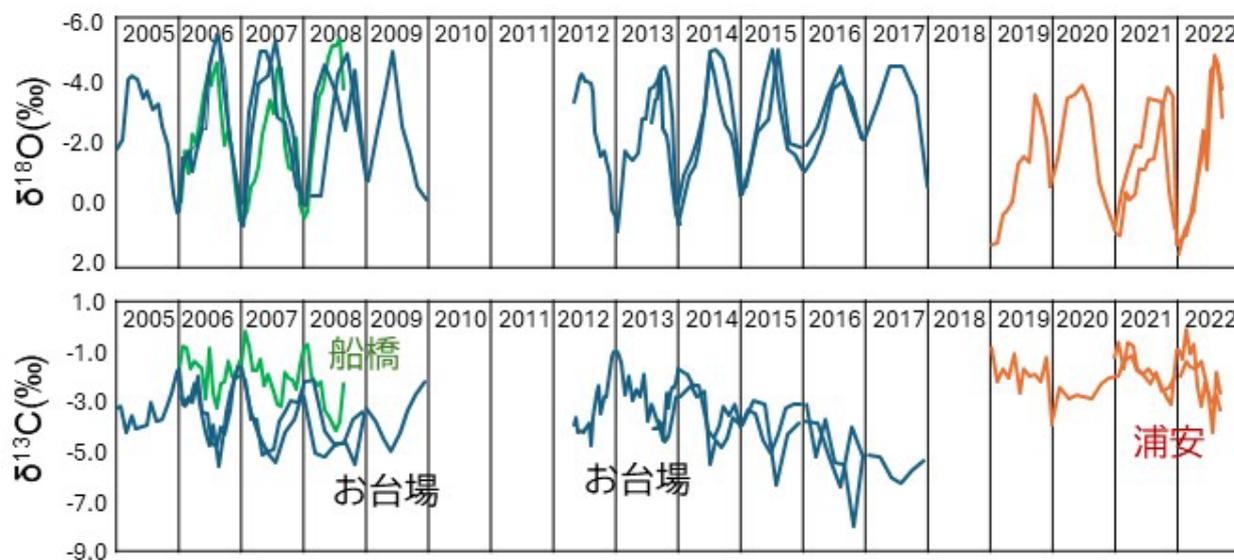


図37 船橋・お台場・浦安エリアから採取されたホンビノスガイの長期の炭素・酸素同位体変動。  
数字は年を表す。

## 6. 目標の達成状況と環境政策等への貢献

## (1) 研究目標の達成状況

<全体の達成状況> . . . . . 1. 目標を大きく上回る成果をあげた

「温暖化・貧酸素化の適応策に資する二枚貝殻を用いた沿岸環境モニタリングと底生生物への影響評価」

全体目標	全体の達成状況
<p>本研究のアウトプットとして、深刻化する温暖化・貧酸素化の地域影響を適切に把握するため、貝殻の化学分析（元素・安定同位体比）や成長線解析を駆使した遡及的モニタリング手法により、簡便かつ高精度に水温や溶存酸素濃度などの環境情報を復元する手法を本研究にて新たに提案し、東京湾・伊勢湾にて過去数十年スケールの水質復元を行うことを目標とする。また、対象とする底生生物の二枚貝類については、貧酸素・高水温などの環境ストレスが体成長や個体群維持（大量死）に与える影響の解析や遺伝子情報を活用した殻形成への環境影響評価を実施することで、沿岸域の環境管理・海洋生態系の保全に資する技術提案・情報発信する。</p> <p>本研究では海洋表層に生息する種（アコヤガイ・イガイなど）と底層に生息する種（アカガイ・アサリなど）を活用し、野外採取個体やアーカイブ標本を用いて環境情報復元指標の開発を行い、さらに、提案した環境指標を用いて海洋表層・底層の数十年スケールでの水質復元を行う。サブテーマ①「二枚貝殻の成長線解析・同位体分析による環境解析と水産重要種に与える環境影響評価（筑波大学・金沢大学）」では、水温指標開発と水温履歴復元（酸素同位体比分析）・時系列解析のための日単位の成長線解析・貝類への環境影響評価（遺伝子発現解析・結晶構造解析）を実施する。また、サブテーマ②「二枚貝殻の元素分析による貧酸素発生状況の時系列解析（東京都市大）」では、二枚貝殻の元素分析（マンガン濃度）や有機物試料の炭素・窒素・硫黄同位体比分析により、溶存酸素濃度や栄養塩履歴の復元手法を提案し、貧酸素発生状況の時系列解析や栄養塩や炭素源などの物質循環の履歴解析を行う。</p>	<p>沿岸域の貝類の貝殻を活用した複数の環境モニタリング手法の提案や、環境変動が底生生物に与える影響評価手法の提案を行い、沿岸域の環境管理・海洋生態系の保全に資する技術・知見を新たに蓄積することができた。本研究成果は、行政ニーズ（5-1）「海域における底層環境に着目した新たな総合的な評価手法の開発及びそれに伴うモニタリング手法の開発」に対応するものであり、定期の環境観測・資源調査に労力・費用を要する底層のモニタリングについて、簡便・遡及的な手法をもって貢献できる。</p> <p>貝殻の元素濃度・安定同位体比を活用し、水温、D0、炭素・窒素動態の復元など、様々な環境モニタリング手法を提案することができ、目標を上回る成果を挙げることができた（成果番号1-5、7、9、10、12-16、17、19、24-29）。また、東京エリア、伊勢エリアにおいて1年以上の長期の環境履歴復元を行い、さらに20年間の長期にわたる環境変動復元へも応用できることを確認した（成果番号8）。複数種で環境評価指標を検討することで、環境復元の際に注意すべき点を取りまとめ、また、成長量解析のように二枚貝類で共通した解析手法を提案することができた。</p> <p>ベントスへの環境影響をモニタリングする手法について、貝殻の安定同位体データを活用した成長量解析（成果番号2-3、5、8、12、13、17）、遺伝子解析や結晶解析（成果番号1、3、6、10-11、15-16）によるアプローチを提案した。さらにこれらの指標により、死亡時期の推定や閾値の評価（成果番号5、7、12-13、17）、真珠品質の評価（成果番号1、3、6、10-11、15-16）など、水温や溶存酸素濃度が貝類に与える影響解明に貢献した。安定同位体分析や成長線解析により時系列を挿入した殻を基に、時系列の元素分析や貝殻の結晶観察をすることで、複数解析手法を組み合わせた環境・生態復元が可能であることを示した。</p> <p>以上のように、貝殻を活用した多様なモニタリング手法を提案し、貝殻から多項目の環境情報の抽出、底生生物への環境ストレスの評価を可能にした。サブテーマ1・2が同一個体から貝殻の同位体比分析・結晶解析・元素分析を実施することで、1つの殻から多項目の環境・生態情報を抽出することに成功した。</p> <p>本研究成果は誌上発表や学会発表にて積極的な成果公表を行い、2件の受賞を受けた（成果番号</p>

<p>①②で復元した海洋表層・底層それぞれの数十年スケールの環境情報を取りまとめ、底生生物への貧酸素・高水温などの環境ストレスの閾値の評価を行い、環境管理・海洋生態系の保全に資する統合的環境データの情報発信を行う。本研究の遡及的モニタリング手法は、それまで環境観測が実施されていない海域・時代でも過去に遡って環境履歴を安価に推定できる。そのため、貝殻をアーカイブするか、ないしは事後のサンプリングによって、ひとたび環境問題が起こった際に、迅速に環境因の調査を実施することができる。前処理・分析方法の具体的提案や殻の化学分析値からの環境データ（水温・溶存酸素濃度など）の換算式の提示を行い、環境行政への普及（アウトカムへの貢献）を目指した情報公開を実施する。</p>	<p>28、29)。また、国民との対話として、アウトリーチ活動や市民との対話を実施した。</p>
<p><b>本研究のアウトプット目標</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 簡便・安価な遡及的モニタリング手法の開発と普及に向けた情報発信</li> <li>2. 東京湾・伊勢湾の水質の長期変動の解明</li> <li>3. 底生生物の環境ストレスの原因・閾値の解明</li> <li>4. 二枚貝のストレス応答のメカニズム解明</li> </ol>	

<【サブテーマ1】達成状況>・・・・・・・・・・ 1. 目標を大きく上回る成果をあげた

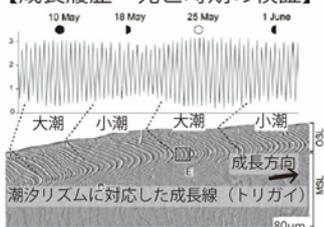
「二枚貝殻の成長線解析・同位体分析による環境解析と水産重要種に与える環境影響評価」

サブテーマ1 目標	サブテーマ1 の達成状況
-----------	--------------

生物源炭酸塩から形成時の水温を推定できる手法である酸素同位体比分析を行い、数十年間の時系列の水温履歴を明らかにする。研究対象の二枚貝類は潮汐による2週間1周期の成長線を刻むため、分析した部位の形成日時を1日以下の解像度で特定でき、貝殻の同位体比から得られた水温情報を1日レベルで対応させることが可能である。生貝と死殻の成長線を比較し類似したパターン同士を照合することで（パターンマッチング法、図1）、死に殻の死亡時期の特定を行う（筑波大）。さらに、異常水温や貧酸素の発生状況と貝殻の死亡時期を対比することで、環境ストレスが底生生物への死（大量死）を引き起こす閾値（ストレスの強度と期間）を定量的に推定でき、本研究では環境基準として定められた溶存酸素量が生物種の個体群維持に有効か判断する（筑波大）。また、貝殻の結晶構造解析、貝殻形成制御遺伝子の発現解析を実施し、低酸素・異常水温に応じた結晶品質の変異と、これに関与する貝殻形成遺伝子の特定を行うことで環境ストレスの指標として活用できる遺伝子・結晶学的情報を提案する（金沢大学）。地球化学分析から復元された多項目の環境情報と真珠の結晶構造を比較し、真珠品質など

殻形成へ悪影響を与える環境条件を解明する（筑波大・金沢大学）。

【成長履歴・死亡時期の検証】



● 二枚貝の死亡時期と死因推定の例

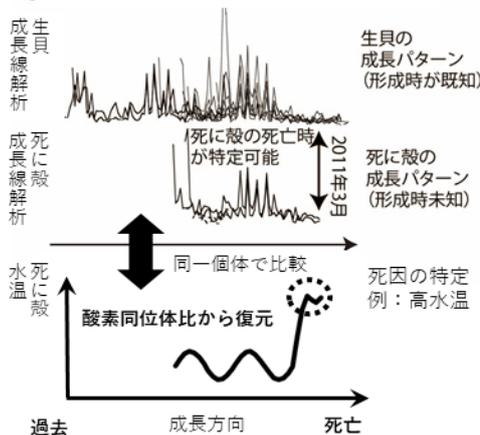


図1 貝殻に刻まれた成長線（上図）と死に殻の死亡時期特定方法（パターンマッチング法）（中図）、死因の特定の例（下図）。

○二枚貝殻の酸素同位体比分析による温度復元指標の開発と成長解析による死亡時期の検証

【達成状況】 目標を大きく上回る成果をあげた

【具体的な理由】

貝殻の酸素安定同位体比を用いた水温の復元手法を沿岸域で採取された貝類に適用し、温度の過渡的モニタリング手法を提案した（図5, 6, 10, 12）。さらに、殻の同位体履歴と水温の観測データの対比により、殻の成長量推定する手法を提案した。応用的研究として、酸素同位体比を用いた殻成長量推定により、貧酸素下での成長変化の検証と閾値の評価（図7, 10）や、死亡個体を用いた死亡時期推定を実施した（図13）。さらに、採取時期の異なるアーカイブ標本の同位体履歴をマッチングすることで、長期の同位体履歴の解析を達成した（図37）。

【根拠】 学会発表（成果番号5、7、12-13、17）、原著論文（成果番号2）、書籍の分筆（成果番号3）、国民との科学・技術対話（成果番号20-23）、ウェブニュース掲載（成果番号27）、科学技術分野の文部科学大臣表彰「若手科学者賞」の受賞（成果番号28）

○遺伝子解析・結晶解析による貝類への環境影響をモニタリングする手法の提案と影響評価

【達成状況】 目標を大きく上回る成果をあげた

【具体的な理由】 アコヤガイ（英虞湾・表在性）とホンビノスガイ（東京湾・内在性）の2種の二枚貝の貝殻微細構造観察・遺伝子発現解析を実施し、ストレス応答と関係する微細構造の変異（図14, 15）

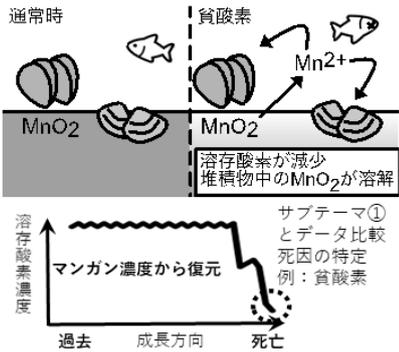
と、この形質の可塑的発現を駆動すると考えられるストレス関係の発現変動遺伝子を特定した（図17）。また、アコヤガイについては天然条件下での微細構造の変異を制御する貝殻基質タンパク質遺伝子を初めて明らかにした（表1）。本テーマでは、溶存酸素濃度と貝殻基質タンパク質遺伝子の発現量のデータを組み合わせることで、アコヤガイの貧酸素耐性の閾値を定量的に評価する手法（図18）を提言する。アコヤガイのような表在性の真珠貝は海域に広く分布し、また産業的な価値が高いが、本成果で提言する手法は、このような他の真珠貝にも応用可能な、極めて有用な環境影響の評価手法である。

【根拠】 学会発表（成果番号6、10-12、16、17）、査読付き論文（成果番号1）、書籍の分筆（成果番号3）、国民との科学・技術対話（成果番号20）

このほか、国際誌に論文1編投稿中

<【サブテーマ2】達成状況> . . . . . 1. 目標を大きく上回る成果をあげた

「二枚貝殻の元素分析による貧酸素発生状況の時系列解析」

サブテーマ2 目標	サブテーマ2 の達成状況
<p>二枚貝殻の化学分析により、過去の貧酸素発生状況を時系列に沿って解析し、貧酸素水塊の発生・消滅機構や個体影響評価を行う。レーザーアブレーション誘導結合プラズマ質量分析法(LA-ICPMS)を用いて、溶存酸素濃度を反映する優れた指標である殻のマンガン濃度を成長軸に沿って定量し、溶存酸素濃度の時系列変化を復元する手法を開発し、高時間解像度で環境変動を復元する。また、貝殻と同様に付加成長する殻皮有機物の硫黄同位体比は貧酸素水塊に伴う硫化水素の発生を記録する新規的指標として、さらに、殻皮の炭素・窒素同位体比は貧酸素の要因となる一次生産や栄養塩の流入を記録する指標として期待される。貝殻のLA-ICPMS分析で貧酸素の記録が検出された個体を中心に殻皮有機物の炭素・窒素・硫黄同位体比分析を行い、貧酸素や栄養塩流入の履歴を復元する指標として提案を行う。</p>  <p>図2 貧酸素時は二酸化マンガンからマンガニオンが発生し、貝殻に取り込まれる(上)。マンガン濃度から溶存酸素濃度が推定可能。</p>	<p>【具体的な理由】 本研究では、海水および貝殻のマンガン濃度分析と海洋観測データを比較することで、マンガンの貧酸素指標としての有用性を検証した。その結果、貧酸素の指標になることが期待されていたMn/Caが必ずしも正確な指標とならないことを明らかにした(図25, 26)。一方、これまで貝殻のモリブデンは環境指標としてほとんど着目されていなかったが、本テーマでは海洋におけるモリブデンの化学的挙動に基づき、貝殻のMo/Caが溶存酸素濃度の指標となりうることを新たに実証できた(図25, 26)。</p> <p>【根拠】学会発表(成果番号5、9、19)、書籍の分筆(成果番号3)、国民との科学・技術対話(成果番号25、26)、ポスター賞の受賞(成果番号29)</p> <p>○貝殻殻皮有機物を用いた栄養塩動態の復元手法の提案</p> <p>【達成状況】目標を大きく上回る成果をあげた</p> <p>【具体的な理由】貝殻殻皮有機物の<math>\delta^{15}\text{N}</math>が沿岸海域に排出される下水由来などの人為起源窒素を反映することを示した(図30)。さらに、貝殻の成長方向に沿って連続的に同位体比を分析する手法を確立したことで、栄養塩として生物に利用される窒素の動態を高い時間解像度(季節スケール)で明らかにできることを示した(図29)。全国の沿岸に広く分布するイガイ類を使って、従来の方法より非常に簡便な手法で、汎地域的に窒素負荷の起源と程度をモニタリングできる新規的な手法として応用可能であることを提案した。</p> <p>【根拠】国民との科学・技術対話(成果番号25、26)、ポスター賞の受賞(成果番号29)</p>

(2) 研究成果の学術的意義と環境政策等への貢献

<得られた研究成果の学術的意義>

本研究課題では、行政ニーズ(5-1)「海域における底層環境に着目した新たな総合的な評価手法の開発及びそれに伴うモニタリング手法の開発」に対応するため、底層環境の観測手法として貝殻の化学組成を用いた環境モニタリング法(酸素同位体比を用いた温度履歴復元法、モリブデン濃度を用いた貧酸素履歴推定法、安定同位体比を活用した炭素窒素動態の復元法)を提案した。本手法は、貝類、さらには炭酸カルシウムの骨格を持つサンゴや有孔虫など海洋生物に広く適用でき、異常水温や貧酸素化など沿岸環境のモニタリングを可能とするため、環境対策の立案に資する時系列の環境情報データの蓄積に広く貢献できる。貝殻を用いた環境履歴復元の指標開発は、国際的にも取り組みが少なく、本研究による環境指標の提案は新規性が極めて高く、沿岸域の環境保全や底層生物への環境影響評価のための基盤的技術・知見を提案できた。

サブテーマ1では、真珠貝について、貝殻の温度履歴を高精度に復元する手法を提案し、酸素同位体比から時系列推定や成長量推定を行う新規の手法を提案した。また、貝類の死殻の酸素同位体比分析

により、大量死が起こった時期特定や環境要因を検証するための手法を提案した点で、革新的である。さらに、遺伝子解析・結晶観察から、貝類の温度や貧酸素に対するストレス応答を貝殻を用いて判別するという独創的手法を見出した。このように、貝殻を用いることでいつ、どの程度環境ストレスを受けていたかを時系列に判別でき、底生生物の環境応答を評価するという、環境影響評価や環境基準を策定する際に役立つことができる。また、サブテーマ2では、貝殻のモリブデン濃度分析による溶存酸素濃度の復元法や、貝殻有機物の同位体比分析による炭素・窒素動態の復元法という画期的な手法を提案した。これまではD0の指標としてMnが中心に議論されてきたが、貝殻のモリブデン濃度についてこれまでほとんど研究がなされていなかった。本研究では貧酸素水塊の履歴を貝殻のモリブデン濃度から推定するための新規的な知見を提案できた。このように、観測データと貝殻の様々な元素組成・同位体組成の情報を対比することで、このように新規の指標を探索することが可能である。本研究で提案した環境復元法を活用することで、1つの貝殻から多項目の環境履歴復元を実現するものであり、底生生物の生息環境の閾値の評価や環境変動の成長へ与える影響評価に貢献することができる。

#### ＜環境政策等への貢献に関する成果＞

我が国では、環境基本法に基づく水質汚濁に係る環境基準について、定期的な見直しや審議がなされている。環境基準の策定にあたっては、基準設定のための環境観測や生物調査などが複数の海域で実施されるため、本研究で開発した貝殻の化学分析による長期の環境モニタリングの実施や、底生生物への環境変動影響の定量的評価により、効率的に基盤のデータを収集することができる。今回の研究結果より、英虞湾で垂下飼育を行った貝類では、D0の積算日数が多い月において死亡個体の増加がみられた。また、東京湾では、D0 2mg/l以下の日が2日以上続く期間が7月以降に増え、最大で6日間程度貧酸素が継続しており、7-10月前半はホンビノスガイの成長が著しく低下していた。底生生物の閾値の評価には、D0の継続時間が貝類の生存や成長を左右することが本研究で明らかになった。閾値を評価する際には、D0の積算日数や継続日数もモニタリングしていくことが重要であると思われる。このように、貝殻を用いたモニタリング技術により、底層環境の健全性の評価、環境基準や保全地域の設定・管理への貢献が期待される。今後、定期的な貝類の採取と貝殻の保管を実施すれば、経済的に低コストで沿岸環境のバックアップデータを保存できるため、貝殻標本のアーカイブ化が重要である。

IPCCでは、これまで生物源炭酸塩やアイスコア解析による長期の環境履歴復元データを基に、長期の地球温暖化・海洋酸性化の変遷を議論してきた。本研究で開発した貝殻を用いた環境復元指標は、西太平洋の沿岸域において中長期の環境変遷の情報を蓄積していく上で重要な技術であり、二枚貝に広く適用できるため、生物源炭酸塩を用いた環境復元により将来の環境予測に貢献できる。

行政ニーズ（5-1）「海域における底層環境に着目した新たな総合的な評価手法の開発及びそれに伴うモニタリング手法の開発」で言及されているように、底層環境の評価において、環境変動が底生生物へ与える影響を定量的に評価する手法が求められている。本研究では二枚貝の貝殻について、成長解析・化学分析・結晶解析という多面的な解析を行うことで、環境変動が貝類の生存・成長に与える影響を評価する手法を確立した。底層環境の生物調査では、定期的調査（船舶調査や潜水調査）を必要とするため、労力や費用がかかる点がネックであった。本手法により、1年以上の長期の貝類の成長履歴解析が可能であり、資源調査を毎月実施する必要がないため、簡便な生物のモニタリング指標として活用できる。

また、これまでに3件の技術相談があった。2022年度に研究成果を紹介してほしいとの依頼を受け、千葉県・神奈川県職員・研究者を対象にセミナー形式で研究紹介を実施した（サブテーマ2・東京都市大）。千葉県水産総合センターより、東京湾への生物の加入に温暖化・貧酸素が及ぼす影響や対策を検証する際に、本研究で提案した環境復元指標を活用してみたいと技術相談を受け、共同研究を進めている。また、2023年度に真珠養殖の企業より、真珠養殖に用いている真珠貝について、生育状況の調査のために、本研究で提案した同位体・元素濃度を用いた環境履歴復元法・成長量の推定法を活用したいと技術相談を受け、2024年度から共同研究を開始予定である。2021年には三重県の漁業協同組合よりカキの不漁について相談を受け、新たな共同研究としてカキ殻の化学分析・成長解析の研究に着手し

た。このように、本研究成果は環境政策の立案や生態系サービスの持続可能な利用に貢献することができる。

## 7. 研究成果の発表状況

### (1) 成果の件数

成果の種別	件数
査読付き論文：	2
査読付き論文に準ずる成果発表（人文・社会科学分野）：	0
その他誌上発表（査読なし）：	2
口頭発表（国際学会等・査読付き）：	5
口頭発表（学会等・査読なし）：	10
知的財産権：	0
「国民との科学・技術対話」の実施：	7
マスコミ等への公表・報道等：	1
研究成果による受賞：	2
その他の成果発表：	0

### (2) 誌上発表

#### <査読付き論文>

成果番号	【サブテーマ1】の査読付き論文
1	Sato, K., Setiamarga, D.H., Yonemitsu, H., Higuchi, K. (2022). Microstructural and genetic insights into the formation of the ‘winter diffusion layer’ in Japanese pearl oyster <i>Pinctada fucata</i> and its relation to environment temperature changes. <i>Frontiers in Ecology and Evolution</i> , Vol.10, 794287 (13頁) <a href="https://doi.org/0.3389/fevo.2022.794287">https://doi.org/0.3389/fevo.2022.794287</a>
2	西田 梢 (2022) 生物源炭酸塩の同位体地球化学・実験生物学の高度化による環境生態指標の評価研究. <i>地球化学</i> . Vol.56, 1-17. 【招待論文】 <a href="https://doi.org/10.14934/chikyukagaku.56.1">https://doi.org/10.14934/chikyukagaku.56.1</a>

成果 番号	【サブテーマ2】の査読付き論文
	特に記載すべき事項はない。

< 査読付き論文に準ずる成果発表（人文・社会科学分野） >

成果 番号	【サブテーマ1】の査読付き論文に準ずる成果発表（人文・社会科学分野）
	特に記載すべき事項はない。

成果 番号	【サブテーマ2】の査読付き論文に準ずる成果発表（人文・社会科学分野）
	特に記載すべき事項はない。

< その他誌上発表（査読なし） >

成果 番号	【サブテーマ1】のその他誌上発表（査読なし）
3	西田梢・田中健太郎・佐藤圭（2024年4月受理（印刷中）、2024年9月出版予定）、書籍「真珠研究の今を伝えるII」10章「アコヤガイの環境応答」、恒星社厚生閣、12頁（予定）

成果 番号	【サブテーマ2】のその他誌上発表（査読なし）
4	田中健太郎（2022年）貝殻遺物の産地を判定する先端的な地球化学的手法. 月刊海洋. Vol. 54(8), 386-395.

(3) 口頭発表

< 口頭発表（国際学会等・査読付き） >

成果 番号	【サブテーマ1】の口頭発表（国際学会等・査読付き）
5	Kozue NISHIDA, 6th International Sclerochronology Conference 2023 (2023) Interdisciplinary approaches combining experimental biology and geochemistry to assess environmental impacts on marine organisms, 国際学会（東京都文京区）口頭発表【基調講演】
6	Kei SATO, Kozue NISHIDA, Kentaro TANAKA, Akito ISHIKAWA, Naoko MURAKAMISUGIHARA, Keita HIGUCHI, Yasunori IWAHASHI, Kiyohito NAGAI, 6th International Sclerochronology Conference 2023 (2023) Physiological response of <i>Pinctada fucata</i> to hypoxia and its related phenotypic plasticity of the shell microstructure, 国際学会（東京都文京区）口頭発表
7	WANG JINGZHUO, Naoko Murakami-Sugihara, Kotaro Shirai, Kentaro Tanaka, Kei Sato, Toyoho Ishimura, Mahiro Yumiba, Kozue Nishida, 日本地球惑星科学連合大会2024年大会（2024）Growth pattern and stable carbon and oxygen isotope analyses on the bivalve shell ( <i>Mercenaria mercenaria</i> ) grown under hypoxia in Tokyo Bay, 国内学会（千葉県幕張市）ポスター発表
8	弓場菜裕、中村政裕、米田道夫、樋口富彦、石村豊穂、西田梢、伊藤進一、白井厚太郎、日本地球惑星科学連合大会2024年大会(2024) 生物起源炭酸塩の酸素同位体比を用いた古水温復元の課題：生体効果による種特異性の定量的評価, 国内学会（千葉県幕張市）、ポスター発表、査読有り

成果 番号	【サブテーマ2】の口頭発表（国際学会等・査読付き）
9	Kentaro TANAKA, Kozue NISHIDA, Kei SATO, Keita HIGUCHI, Naoya KANNA, Naoko MURAKAMI-SUGIHARA, Akito ISHIKAWA, Yasunori IWAHASHI, Kiyohito NAGAI, Kotaro SHIRAI, 6th International Sclerochronology Conference 2023 (2023) Trace element composition of bivalve shells as proxy of marine hypoxia, 国際学会（東京都文京区）ポスター発表

<口頭発表（学会等・査読なし）>

成果 番号	【サブテーマ1】の口頭発表（学会等・査読なし）
10	佐藤圭, 西田梢, 田中健太郎, 石川彰人, 杉原奈央子, 樋口恵太, 岩橋徳典, 永井清仁, 日本プランクトン学会・日本ベントス学会合同大会（2022）貧酸素水塊発生時のアコヤガイの生理学的応答と真珠形成機構の変化、口頭発表（オンライン）
11	佐藤圭, 西田梢, 田中健太郎, 石川彰人, 杉原奈央子, 樋口恵太, 岩橋徳典, 永井清仁, 第17回バイオミネラリーゼーションワークショップ（2022）, 溶存酸素濃度に対するアコヤガイの生理学的応答と真珠形成への影響、ポスター発表（オンライン）
12	西田 梢, 田中健太郎, 佐藤圭, 樋口恵太, 漢那直也, 杉原奈央子, 白井厚太郎, 岩橋徳典, 永井清仁, 弓場茉裕, 石川彰人, 第17回バイオミネラリーゼーションワークショップ（2022）, 二枚貝殻を用いた水温・溶存酸素濃度の モニタリング手法の検討：英虞湾での垂下実験を例に、ポスター発表（オンライン）
13	西田梢、真珠研究シンポジウム2023(2023) アコヤガイの環境応答—貝殻に記録された環境・生態の履歴—、国内シンポジウム（三重県鳥羽市）、口頭発表【招待講演】
14	弓場茉裕、中村政裕、米田道夫、樋口富彦、石村豊穂、西田梢、伊藤進一、白井厚太郎、地球化学会（2023）生物起源炭酸塩の酸素同位体分別における種特異性の定量的評価、国内学会（東京都品川区）
15	佐藤圭、西田梢、田中健太郎、石川彰人、杉原奈央子、樋口恵太、岩橋徳典、永井清仁、真珠研究シンポジウム2023（2023）貧酸素水塊が真珠形成に及ぼす影響、国内シンポジウム（三重県鳥羽市）、ポスター発表
16	佐藤圭、西田梢、田中健太郎、杉原奈央子、石川彰人、WANG JINGZHUO、第18回バイオミネラリーゼーションワークショップ(2023) 貧酸素環境におけるホンビノスの貝殻微細構造作り分けと生理的メカニズムの解明、国内学会（千葉県柏市）ポスター発表
17	【予定】西田 梢、田中健太郎、佐藤圭、樋口恵太、漢那直也、杉原奈央子、白井厚太郎、石村豊穂、岩橋徳典、永井清仁、弓場茉裕、石川彰人、日本古生物学会年会（2024年6月発表予定）、二枚貝の貧酸素応答：アコヤガイの垂下実験を例に、国内学会（高知県高知市）口頭発表

成果 番号	【サブテーマ2】の口頭発表（学会等・査読なし）
18	田中健太郎、田副博文、飯塚毅、白井厚太郎、日本分析化学会第71年会（2022）ネオジム同位体比を利用した水産物の新しい産地判別法、口頭発表
19	田中健太郎、西田梢、佐藤圭、樋口恵太、漢那直也、杉原奈央子、石川彰人、岩橋徳典、永井清仁、白井厚太郎、真珠研究シンポジウム2023（2023）アコヤガイの貝殻を利用した貧酸素現象の遡及的モニタリング、国内学会（三重県鳥羽市）

#### (4) 知的財産権

成果 番号	発明者	出願者	名称	出願以降 の番号	出願 年月日
	特に記載すべき事項はない。				

## (5) 「国民との科学・技術対話」の実施

20	2022	筑波大学生命環境系の一般向けインターネット記事「研究室によろこそ！」にて推進費の研究活動を紹介「研究室によろこそ！—生物の殻や骨から環境・生態履歴を読み解く—」（西田 梢）（2022年2月8日、 <a href="https://www.life.tsukuba.ac.jp/laboratory/lab_nishidakozue_20220208/?fbclid=IwAR12-7rRKK5v5UHRQ1LbdPPu47ePqDr-L6pisBQDxD51Z2CqXW3sRX1WiNE">https://www.life.tsukuba.ac.jp/laboratory/lab_nishidakozue_20220208/?fbclid=IwAR12-7rRKK5v5UHRQ1LbdPPu47ePqDr-L6pisBQDxD51Z2CqXW3sRX1WiNE</a> ）および筑波大学生命環境系Facebook, Twitter, Instagramにて本記事の紹介
21	2022	千葉大学公開セミナー「古水温復元指標あれこれ—原理から応用まで—」にて招待講演(西田梢)、講演タイトル「安定同位体分析技術の進展：クランプトアイソトープとは」、2022年10月5日、オンライン
22	2022	温泉施設（両国湯屋江戸遊、東京都墨田区）でNTTドコモが開催した環境啓発イベント「海とつながるサウナ」（2023/3/23～3/29）の監修を担当(西田梢)、2023年2月～3月

成果番号	実施年度	【サブテーマ2】の実施状況
23	2021	喜界島サンゴ礁化学研究所 フィールドワークプログラム「サンゴ礁サイエンスキャンプin喜界島」（主催：喜界島サンゴ礁化学研究所、2021年8月5日～16日、参加者約50名）、小中高生向けに貝殻など生物硬組織を使った地球化学的研究について講義・実習を実施（田中健太郎）
24	2022	喜界島サンゴ礁化学研究所 フィールドワークプログラム「サンゴ礁サイエンスキャンプin喜界島」（主催：喜界島サンゴ礁化学研究所、2022年8月5日～9日、参加者約50名）、小中高生向けに貝殻など生物硬組織を使った地球化学的研究について講義・実習を実施（田中健太郎）
25	2022	第22回東京湾シンポジウム(国土交通省 国土技術政策総合研究所主催)にてポスター発表や市民との対話を実施（田中健太郎）（2022年10月13日、ポスタータイトル「東京湾における貧酸素と栄養塩負荷の履歴を明らかにする地球化学的な方法の開発」）
26	2023	第23回東京湾シンポジウム(国土交通省 国土技術政策総合研究所主催)にてポスター発表や市民との対話を実施（田中健太郎）（2023年10月13日、ポスタータイトル「貝殻を使った東京湾の栄養塩動態のモニタリング法」）

## (6) マスメディア等への公表・報道等

成果番号	【サブテーマ1】のメディア報道等
27	マイナビニュース（2023年3月23日、ウェブニュース、「ドコモが“サウナで海の生き物が感じる暑さを体験する”イベントを開催、いったいなぜ？」、貝類をはじめとする海洋生物への温暖化影響について紹介） <a href="https://news.mynavi.jp/article/20230323-2633978/">https://news.mynavi.jp/article/20230323-2633978/</a>

成果番号	【サブテーマ2】のメディア報道等
	特に記載すべき事項はない。

## (7) 研究成果による受賞

成果番号	【サブテーマ1】の研究成果による受賞
28	令和6年度科学技術分野の文部科学大臣表彰 若手科学者賞、「生物源炭酸塩を用いた環境生態履歴の復元に関する研究」、2024年4月、西田梢

成果 番号	【サブテーマ2】の研究成果による受賞
29	東京湾シンポジウム ポスター賞、2023年10月、田中健太郎

## (8) その他の成果発表

成果 番号	【サブテーマ1】のその他の成果発表
	特に記載すべき事項はない。

成果 番号	【サブテーマ2】のその他の成果発表
	特に記載すべき事項はない。

## 8. 国際共研究等の状況

&lt;国際共同研究等の概要&gt;

特に記載すべき事項はない。

&lt;相手機関・国・地域名&gt;

機関名	国・地域名（本部所在地等）

## 9. 研究者略歴

&lt;研究代表者略歴&gt;

代表者氏名	略歴（学歴、学位、経歴、現職、研究テーマ等）
西田 梢	東京大学大学院理学系研究科修了 博士（理学） 産業技術総合研究所産総研特別研究員、茨城高専研究員およびJSPS特別研究員PD、 筑波大学特任助教を経て、 現在、東京工業大学環境・社会理工学院准教授 専門は同位体地球化学、研究テーマは古環境復元、環境変動への生物影響評価

&lt;研究分担者（サブテーマリーダー）略歴&gt;

分担者氏名	略歴（学歴、学位、現職、研究テーマ等）	参画期間
1) 田中健太郎	琉球大学理工学研究科修了 博士（理学） 北海道大学（博士研究員）、東京大学（JSPS特別研究員PD）	

	を経て2022年より東京都市大学自然科学科准教授 専門は同位体地球化学、海洋化学	
2) 佐藤圭	東京大学大学院理学系研究科修了 博士（理学） 東京大学博物館JSPS特別研究員PD、金沢大学博士研究員、京 都大学JSPS特別研究員PD、早稲田大学助教を経て、 現在金沢大学国際基幹教育院講師 主に軟体動物を対象とし、専門は進化古生物学、分子生物学、 生体鉱物学。	

## Abstract

[Research Title]

## Monitoring of Coastal Environments and Assessment of Benthos Response to Global Warming and Hypoxia Based on Bivalve Sclerochronology

Project Period (FY) :	2021-2023
Principal Investigator :	Nishida Kozue
(PI ORCID) :	ORCID0000-0002-8309-473X
Principal Institution :	University of Tsukuba (Current Institution: Tokyo Institute of Technology) Tel: +81-3-5734-3993 E-mail: nishida.k.al@m.titech.ac.jp
Cooperated by :	Tokyo City University, Kanazawa University
Keywords :	Bivalve, Stable isotopes, Minor elements, Hypoxia, Assessment of environmental impact

[Abstract]

Since the Industrial Revolution, various environmental changes that threaten coastal ecosystems and human activities, such as global warming, ocean acidification and hypoxia, have come to the surface. Environmental monitoring using geochemical records in shells is beneficial for the protection of coastal ecosystems and the sustainable economic activities. This study had been developing geochemical proxies of bivalves to reconstruct environmental information and assess environmental impacts on organisms.

We proposed a method for estimating temperature and growth history of bivalves using oxygen isotope ratios of shells (Nishida et al., 2023), and a method for estimating dissolved oxygen concentration using molybdenum concentration of shells (Tanaka et al., 2023). We developed a new analytical method of stable C, N, O isotope ratios of periostracum. Furthermore, we applied the new method to the bivalves collected from Tokyo Bay and demonstrated that isotopic signatures of periostracum reflect the anthropogenic nitrogen loading to the coastal area.

Our RNA-seq analysis and SEM observations revealed the biological mechanisms underlying the plastic expression of shell microstructure in response to low temperatures (Sato et al., 2022) and hypoxia (Sato et al., 2023). Considering together with environmental monitoring data, anomalous shell microstructures can serve as potential proxies for environmental alterations. We concluded that stable carbon isotope ratio in bivalve shells faithfully correlated with the decline in dissolved oxygen in bottom waters.

As described above, bivalve shells are very useful for long-term environmental monitoring and are expected to contribute to environmental policy.

[References]

- Sato, K., Setiamarga, D.H., Yonemitsu, H., Higuchi, K. (2022). Microstructural and genetic insights into the formation of the ‘winter diffusion layer’ in Japanese pearl oyster *Pinctada fucata* and its relation to environment temperature changes. *Frontiers in Ecology and Evolution*, Vol.10, 794287 (13pages.)
- Nishida, K. (2023) ‘Interdisciplinary approaches combining experimental biology and geochemistry to assess environmental impacts on marine organisms’, 6th International Sclerochronology Conference 2023, Keynote

speaker.

Sato, K., Nishida, K., Tanaka, K., Ishikawa, A., Murakami-Sugihara, N., Higuchi, K., Iwahashi, Y., Nagai, K., (2023) 'Physiological response of *Pinctada fucata* to hypoxia and its related phenotypic plasticity of the shell microstructure', 6th International Sclerochronology Conference 2023.

Tanaka, K. (2023), 'Trace element composition of bivalve shells as proxy of marine hypoxia', 6th International Sclerochronology Conference 2023.

This research was funded by the Environment Research and Technology Development Fund (ERTDF).

## 別紙

(参考資料) 公募審査・中間評価等への対応

指摘等	対応状況・非対応理由等
<p>中間評価コメント「なお、貝の生存状態に対する貧酸素状態以外の交絡要因を除外することについて、十分な検討が必要と考える。また、過去の水温や溶存酸素濃度を推定する際に、水中酸素同位体比一定やマンガン濃度上昇などいくつかの仮定をおいているが、その仮定が妥当なのか確認する必要があるのではないか。」</p>	<p>貝類の生存への環境影響について、天然個体を用いているため完全な交絡要因の排除は出来ませんが、クロロフィルa濃度や塩分、pHなど他の観測データの比較も行いました。貝類の生存へは溶存酸素濃度やその積算日数の影響が強いことが分かりました。ご指摘に従い、水温推定については水の同位体比も考慮した上で温度推定を行いました。元素濃度についても、複数元素のデータを基に検証を行いました。</p>
<p>中間評価コメント「底層DOの生物への影響はメカニズムが必ずしも明らかではなく、評価が難しいと考えられるが、評価に資する研究として貴重な研究と考えられた。今後も複数の種を用いて、貧酸素の状況と生育の関連性を研究していただきたい。」</p>	<p>ご指摘どうもありがとうございます。ご提案のように、複数種について検討を行いました。遺伝子解析の結果、アコヤガイとホンビノスガイの2種類間でもストレス応答のパターンが異なることが明らかになりました。</p>
<p>中間評価コメント「二枚貝の貝殻からアーカイブされた過去の水環境が調べられる研究で様々な環境に適用可能である。貝殻の成長速度(周辺環境の取り込み速度)には、実際の環境の変化と時間差があると考えられるので、その点の知見も重要と考えられる。」</p>	<p>貝殻の同位体比に関しては、取り込みによる誤差は1日以下であることが分かりました。元素については飼育実験など環境条件をコントロールした手法を用いれば取り込み速度を検証できるのではないかと思います。</p>
<p>中間評価コメント「環境政策への貢献について、最終的な取りまとめの際に、①どのような機関から、どのような内容の問い合わせや活用の内容等があったのか、②行政機関等への「本研究の成果紹介」p22についても、可能な範囲で取りまとめていただきたい。」</p>	<p>ご指摘ありがとうございます。本件の実施内容の詳細について、企業との共同研究も含む関係上、差し支えない範囲で記述を増やしました。</p>
<p>中間評価コメント「全体的に、研究の前提となる事項、例えば海水中Mgは一定などとされているが、どこかで研究シナリオの影響を評価するため、開発された予測のValidationをしていただきたい。また遺伝子解析に関して</p>	<p>中間報告までに行なった分析から、Mn/Mgが指標になりうると考えていたが、中間報告以降の分析でMn/MgよりMo/Caのほうが指標として有用であるという結論に至りました。Mo/Caが貧酸素水塊の指標として妥当か評価</p>

<p>は、Bonferroni の補正で、False Positive を排除すべきだと考える。またレーザーアブレーション法でMn 等を測定されているが、この装置はかなり特殊であり、一般化するのは困難ではないか。またこの手法を確立するのも標準物質の作成も必要でかなり困難だと思う。」</p>	<p>(Validation) するため、溶存酸素濃度が異なる海域で垂下した個体の分析 (図25A、D、G) と貧酸素環境におけるモリブデン (Mo) の化学的挙動に関する文献を渉猟し、指標として利用できる論理的背景を精査しました (例: Sulu-Gambari, et al., 2017, <i>Chem. Geol.</i>, Scholz et al. 2013, <i>Chem. Geol</i> など)。</p> <p>Rパッケージ Deseq2による二群間比較を行った際、false discovery rate (FDR) を5%に設定し、Benjamini-Hochbergの補正を実施しました。このため本研究の結果はfalse positiveの影響を除外できています。</p> <p>LA-ICPMSが実用化されてからすでに30年以上が経過しており、装置及び分析法が広く普及し、研究者間での分析法や精度の比較が行なわれています。また、現在は多様なマトリックスを持つ高品質の標準物質が国内外で広く市販され、標準物質の推奨値を研究者間で共有するシステムも確立されているため (<a href="http://georem.mpch-mainz.gwdg.de/">http://georem.mpch-mainz.gwdg.de/</a>)、標準化も問題なく実施出来ました。</p>
<p>異なる環境下での使用可能性・一般化可能性の検討になるかと思うが、今後、英虞湾と東京湾の結果をどのように統合・整理していくのか。また、どこかで何かを限定して議論を進めていけないかと思われるが、この点も考慮しながら研究を進めていってほしい。</p>	<p>異なる海域、異なる種を取り扱うことで、環境復元や生物影響評価手法で一般化できる部分や指標活用の際の注意点などを整理することができました。</p>
<p>中間評価コメント「環境行政へのインプット (情報提供) とのことであるが、環境 (溶存酸素、温度など) 変動の速さ・大きさ、時間スケール等の観点から、どのような情報が環境政策や水産側から期待されているかについての検討も期待される。生態学の研究として興味深いが、測定の定量性が向上して、環境関係に展開・インプットされ、有効活用されることを期待する。」</p>	<p>本研究で提案した手法について、環境政策や水産側から期待される点を「(2) 研究成果の学術的意義と環境政策等への貢献」の章で記述しました。また、どのような時間スケール・解像度で指標を活用できるのか、結果・考察の章にサブテーマごとに記載をしました。</p>
<p>中間評価コメント「DO が低い状況が3週間程度続いた後、個体数が減少しているが、貧酸素の閾値を評価するのに、DOの値だけではなくDO の積算濃度を検討してはいかがだろうか。」</p>	<p>ご指摘に従い、DOの各月の積算日数の比較を行い、閾値を評価しました (図7)。</p>