

(37) 微量元素分析によるダム湖内生息魚類の 生息場所判別手法の検討

石崎 陽子¹・渡邊 泉²・野田 香織³・東 信行^{1*}

¹弘前大学大学院 農学生命科学研究科(〒036-8561青森県弘前市文京町3)

²東京農工大学大学院 農学研究院(〒183-8509東京都府中市幸町3-5-8)

³弘前大学大学院 理工学研究科(〒036-8561青森県弘前市文京町3)

*E-mail: azuma@cc.hirosaki-u.ac.jp

複数の副ダムを有する福島県三春ダム5地点で採捕したギンブナ24試料の筋肉における安定同位体比、微量元素分析を行い、地点分類の可能性を検討した。安定同位体比を用いた判別分析からは3グループに分類が出来る傾向が見られたが、判別できない地点が存在した。微量元素を用いた主成分分析、ステップワイズ変数選択正準判別分析からも同様の傾向が見られたが、安定同位体比では判別不可能な地点についても概ね分類が可能となった。判別分析の妥当性確認のための交差検証によっても、全体で91.7%の的中率を示し、5地点の分類の可能性が示唆された。

Key Words : ICP-MS, trace elements, stable isotope, discriminant analysis, *Carassius auratus langsdorfii*

1. はじめに

河川人工構造物の一つであるダム湖は、堤体が極めて高いものは水深が深く、河川の形状に沿って造られるため複雑な形をしているものが多い。また、自然の湖沼ではほとんど見られない大きな水位変動や比較的大きな流入流出量、複雑な形状など、沖帯、入り組んだ湾奥、流入口付近などでその生態的環境は様々ではない¹⁾。そのため、天然湖と比較すると生態的機能の把握や生物個体群の全容を把握することが困難且つ複雑であることが予想される。様々なダム湖内における栄養塩動態やプランクトン動態、外来魚の生態、河川回遊魚の生態は明らかにされてきたが²⁾、その他の止水域、緩流域を好む魚類の生態の全容は未だ不明瞭な点が多い。

近年盛んに利用されるようになってきた、窒素炭素安定同位体比分析は、従来から食物網の解明、物質循環、餌生物の推定に用いられ、さらに魚類の初期生活においては、採餌場所や餌種のスイッチングにより、移動履歴を反映することが明らかにされている³⁾。ダム湖に生息する魚類の生活史は、産卵場所から稚仔魚期の生育場所への移動といった季節的移動に加え、水位の変動という受動的な移動が想定されるため、既存の情報とは異なる行動によって生活史が完結している可能性もある。そこで、より微細な環境差を反映する微量元素を含む多元素

分析を用いて、生息場所の履歴を解明するために地点分類を試みた。

微量元素分析は、農産物や漁獲物、加工食品などの産地判別の手法として国内外で利用されつつある^{4), 5), 6)}。微量元素濃度は土壌、環境水、餌など環境由来の成分の差異が地域差に反映されると考えられており、魚類や鳥類においても、耳石や幼鳥の羽毛を試料として扱い元素分析を行うことによって、回遊履歴や渡りの履歴、生息環境、餌生物などの推定に用いられている^{7), 8)}。先に述べてきた研究は、判別される産地や地点が国内産・外国産、県別、国別など大規模スケールで行われてきたものが多く、前提として、試料を採取した環境が明らかに異なる。

本研究では福島県三春ダムを調査地とし、安定同位体比と微量元素濃度を用いて小規模スケールでの地点分類を試みた。ダム湖に生息する各生物の生態を把握することは、ダムにおける生物管理に役立つと共に、生活史の各フェーズにおける生息場選択や物質循環における知見を得ることに繋がる。また小規模スケールでの分類が確立されれば、全容が掴めなかった生物の生態においても応用が可能となり、さらに移動個体の判別への活用が期待できる。

2. 実験方法

(1) 調査地及び試料

試料は、福島県三春ダムにおいて刺網による魚類採捕により得られた、ギンブナ *Carassius auratus langsdorfii* を用いた。ギンブナは淡水性魚類で止水域、緩流域を好む。食性は雑食性で、その範囲は底棲の小動物、水草類、動物性及び植物プランクトン及び腐食質などにわたっていることが知られている¹⁰⁾。

採捕地点及び試料数は、図-1に示すように福島県三春ダムにある前貯水池(大滝根川前貯水池5試料、蛇沢川前貯水池5試料、牛糞川前貯水池5試料、蛇石川前貯水池5試料)4地点と三春ダム本貯水池4試料の計5地点24試料である。以降、大滝根川前貯水池の試料を本川、蛇沢川前貯水池の試料を蛇沢、牛糞川前貯水池の試料を牛糞、蛇石川前貯水池の試料を蛇石、本貯水池の試料を本体と呼ぶ。

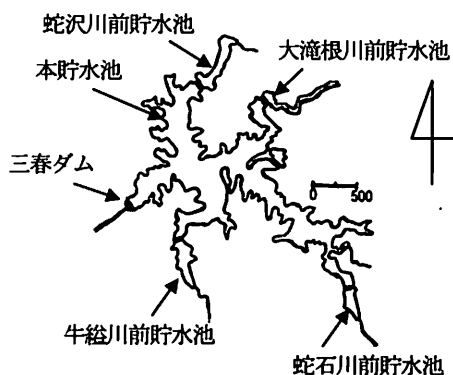


図-1 福島県三春ダム 調査地点

これらの地点は、前貯水池の構造や三春ダムの水位調節により、分断あるいは接続される。本川と蛇石は常に分断されており、本体の水や湖内生産物が流入することはない。一方、牛糞と蛇沢は非洪水期(11月頃～5月上旬頃)になると本体と分断され水や湖内生産物の流入、生物の移動が予想される。そして洪水期(5月下旬頃～10月頃)には本体の水位調節により水位が下がるため分断されるという特徴がある。本研究では2010年6月22-23日に採捕した個体を分析に用いた。

(2) 化学分析

a) 窒素・炭素安定同位体比

採捕後、直ちに解剖あるいは-30℃で一時的冷凍保存をし、調査終了後クール便で実験室に運んだ。試料の組織、器官はステンレス製のメス、ピンセット、解剖ハサミを用いて摘出した。筋肉は実験室において2次汚染を避け

るために表面周辺をメスで切除し細かく刻んだ。乾燥重量が約1g以上になるようにアルミホイルの上に置き、自然対流乾燥機60℃で約24時間乾燥させ、十分に水分を無くした。その後、乳鉢、乳棒で粉末試料とし、分析処理までスクリー管(9cc)に入れ保存した。

b) 微量元素分析

微量元素の分析は既報^{10),11)}に従い行った。乾燥前までの処理は安定同位体と同様に行った。試料部位は筋肉で、表面部分を切除した後、フッ素樹脂シート上に適当な大きさに切り出し、90℃で16時間乾燥後、デシケーター内で30分間放冷した。このとき湿重量と乾燥後の重量を測定し、組織の含水率を算出した。乾燥試料はテフロンシートに包み、乳棒で粉碎した。乾燥試料約0.1gを、プラスチック製の葉さじを用いてフッ素樹脂容器に分取し、濃硝酸2.0mlを加えマイクロウェーブ分解で湿式灰化を行ったのち、純水で25.0mlに定容し、溶液試料とした。

(3) 分析測定

a) 窒素・炭素安定同位体比

測定前に、粉末試料を電子天秤で約0.400～0.700mgになるように秤量し、Snカップに詰めた。測定にはDelta Plus, EA1108を使用し、窒素($\delta^{15}\text{N}$)、炭素($\delta^{13}\text{C}$)安定同位体比を測定した。ワーキングスタンダードにはDL-Alanineを用いて、10～12試料に1個測定した。

b) 微量元素分析

元素分析はLi, Mg, Ca, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, As, Se, Rb, Sr, Mo, Ag, Cd, In, Sb, Cs, Ba, Hg, Tl, Pb濃度を誘導プラズマイオン質量分析計(ICP-MS; Agilent社, ICP-MS 7500cx)で測定した。検出限界はブランク試料の標準偏差(SD)の3倍に対応する値とし、絶対検量線法で各元素濃度を算出した。定量はロジウム103 Rhを内部標準元素とすることにより行い、測定値は乾重量あたりの各元素濃度($\mu\text{g/g}$)で算出した。

(3) 統計解析

統計処理はMS Office Excel 統計2010およびフリーソフト R 2.13.0 ver により行い、次式(1)のように算出値を平均が0、分散が1になるように標準化してから使用した。

$$Z = \frac{X - \bar{X}}{\sigma} \quad (1)$$

Z: 標準化した値

X: 分析値

$\bar{X}$: データの平均値

σ : 標準偏差

分散分析には一元配置分散分析(ANOVA)、判別分析にはステップワイズ変数選択正準判別分析、判別分析の妥当性を確認する交差検証には Leave-one-out cross validation 法(試料から1試料だけを除外して判別モデルを作成し、除いた試料を予測する操作を、全試料について行う)を用いた。

3. 結果と考察

(1) 安定同位体比による地点分類

各地点における試料の体長、窒素・炭素安定同位体比の平均値、標準誤差、Tukey法による多重比較の結果を表-1に示す。

表-1 体長及び窒素炭素同位体比の平均値・標準誤差・多重比較結果

体長(mm)	本川	蛇石	牛糞	蛇沢	本体
本川	204.2±23.2	—	—	—	—
蛇石	—	172.8±7.7	—	—	—
牛糞	**	**	292.0±3.5	—	—
蛇沢	**	**	—	310.6±6.8	—
本体	**	**	—	—	330.3±15.6
δ ¹⁵ N(‰)	本川	蛇石	牛糞	蛇沢	本体
本川	13.9±0.5	—	—	—	—
蛇石	**	10.6±0.3	—	—	—
牛糞	—	**	13.7±0.2	—	—
蛇沢	—	**	—	13.1±0.4	—
本体	—	**	—	**	14.9±0.3
δ ¹³ C(‰)	本川	蛇石	牛糞	蛇沢	本体
本川	-26.1±0.6	—	—	—	—
蛇石	—	-25.6±0.1	—	—	—
牛糞	**	**	-29.6±0.3	—	—
蛇沢	**	**	—	-29.9±0.7	—
本体	*	**	—	—	-28.8±0.3

** : 1%有意 * : 5%有意 図中表記の値は平均値±標準誤差

正準判別分析では目的変数を本川、蛇石、牛糞、蛇沢、本体の5地点とし、ステップワイズ変数選択法(変数の投入条件Fin=Fout=2.0)により以下(2)の判別関数式が構築された。

$$Yi = Ai|\delta^{15}N| + Bi|\delta^{13}C| - Ci \tag{2}$$

Yi : 判別得点

Ai, Bi : 判別係数

Ci : 定数項

δ¹⁵N及びδ¹³C: δ¹⁵N及びδ¹³C(‰)を標準化した値

(2)式に算出された表-2の係数、定数項とδ¹⁵N、δ¹³Cを代入し、得られた数値を判別得点とし、作成した散布図を図-2に示す。また各的中率は(3)式により算出し表-3に示した。

表-2 各判別得点の判別係数、定数項

	Y1	Y2
Ai	-1.82	1.38
Bi	0.906	1.77
Ci	-4.23×10 ⁻¹⁵	-6.87×10 ⁻¹⁵

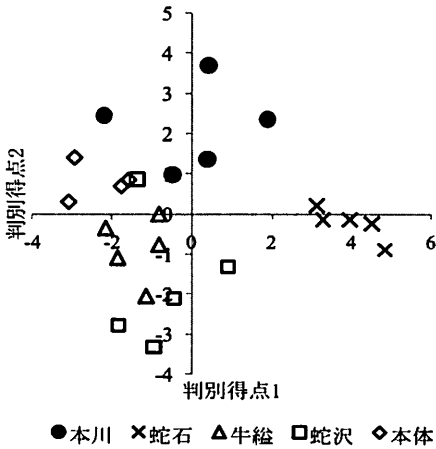


図-2 安定同位体比を用いた判別結果

$$\text{的中率} = \frac{\text{判別されたデータ数}}{\text{全データ数}} \times 100 \tag{3}$$

表-3 安定同位体比を用いた判別分析による判別率

判別率	誤判別	交差検証的中率	誤判別
本川	80.0%	本体1個体	80.0%
蛇石	100.0%	—	100.0%
牛糞	80.0%	蛇沢1個体	80.0%
蛇沢	80.0%	本体1個体	80.0%
本体	100.0%	—	100.0%
全体	87.5%		87.5%

多重比較の結果より、体長において本川、蛇石はそれぞれ牛糞、蛇沢、本体と1%で有意に小さく、δ¹³Cも体長とほぼ同様であったが、本川は本体より5%で有意に低かった。δ¹⁵Nは本川と蛇石において1%で本川の方が有意に高く、蛇石と牛糞、蛇沢、本体においては1%で蛇石が有意に低く、蛇沢と本体においては1%で本体が有意に高かった。判別関数は本体、蛇石を100%で正しく分類した。判別分析の妥当性を確認するためのLeave-one-out法においても同様の結果であった。残りの3地点には3試料(本川1試料、蛇沢1試料、牛糞1試料)で誤判別が見られ、混合した3地点をさらに分類することは出来なかった。

蛇石が他の4地点と分類されたのは体長差による影響が大きいと考えられる。しかし本体が蛇沢、牛糞と分類されているように、体長以外の要因による分類(異なる地位の餌資源を利用している、餌起源が異なるなど)も考えられる。今回の安定同位体比を用いた判別分析からは、分類に寄与している要因を断定することは困難であった。

(2) 微量元素濃度による分類 -主成分分析-

ギンブナ 24 試料の微量元素濃度のうち、Tukey 法による多重比較において 1 地点以上で有意差が見られた元素を表-4 に示す。

さらに測定した 25 元素のうち検出限界以下元素を除く Mg, Ca, V, Ni, Se, Rb, Mo, Cs, Mn, Fe, Co, Cu, Zn, Pb, Ba, Ga, Sr, Hg, Cr の 19 元素を用いて主成分分析を行った。

主成分 z は(4)式により算出され、目的変数がない場合に多種類の説明変数を取りまとめ、新たに指標となる変数を導き出す。

$$z = a_1 x_1 + a_2 x_2 \dots a_n x_n \quad (4)$$

$x_1, x_2 \dots x_n$: 説明変数

$a_1, a_2 \dots a_n$: 説明変数の係数

(4)式に個々のデータを代入し、各成分のスコアを求め、散布図に示した(図-3)。各主成分の寄与率は表-5 に示し、第 3 成分までの累積寄与率は 69.0%であった。寄与率は変数全体の分散のうち各主成分で説明される割合であり以下(5)の定義式で示され、累積寄与率は寄与率の合計である。

$$\text{寄与率} = \frac{\text{データと平均との差の2乗和} - \text{固有値} \lambda}{\text{データと平均との差の2乗和}} \quad (5)$$

表-4 多重比較により有意水準 5%で差が見られた元素濃度

	本川(n=5)		蛇石(n=5)		牛糞(n=5)		蛇沢(n=5)		本体(n=4)	
	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
	(μg/g)		(μg/g)		(μg/g)		(μg/g)		(μg/g)	
60 Ni	0.181	0.024	1.02	0.12	0.250	0.033	0.171	0.032	0.177	0.043
63 Cu	1.33	0.12	1.04	0.08	1.05	0.10	0.882	0.035	1.10	0.18
82 Se	1.07	0.09	0.629	0.059	0.641	0.036	0.667	0.043	0.897	0.055
85 Rb	10.5	0.6	5.68	0.46	7.78	0.27	8.11	0.20	9.86	0.63
95 Mo	0.258	0.052	0.218	0.009	0.162	0.023	0.125	0.008	0.0933	0.0298
133 Cs	0.0464	0.0036	0.0215	0.0019	0.0380	0.0040	0.0316	0.0035	0.0692	0.0080

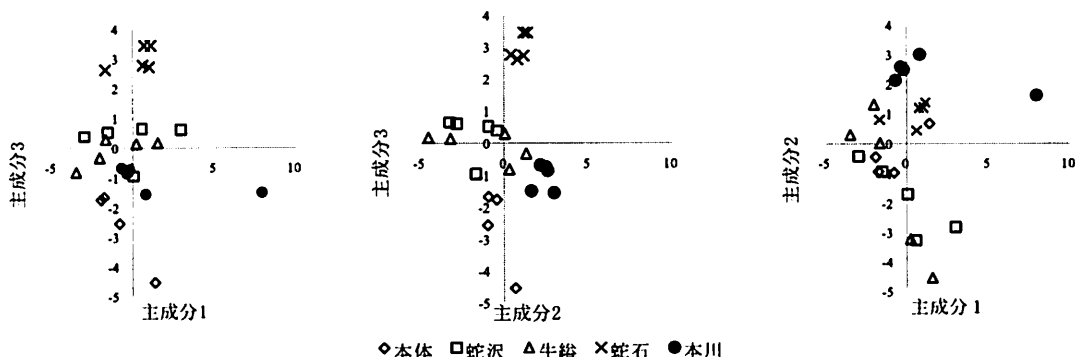


図-3 主成分分析結果

表-5 各成分における寄与率

	主成分1	主成分2	主成分3
寄与率	27.7%	21.2%	20.1%
累積寄与率	27.7%	48.9%	69.0%

Cs において、安定同位体比でほとんど有意差が見られなかった本体と牛糞、本体と蛇沢とで 1%水準で有意に本体の濃度が高くなっていた。本体と牛糞では Rb においても 5%水準で有意に牛糞に比べ本体の濃度が高くなっていた。

分布は本川、蛇石、本体その他(蛇沢・牛糞)に分かれる傾向が見られ、微量元素濃度を用いることで、安定同位体比よりも各地点を判別する関数を構築できる可能性が示唆された。ただし、第2成分と第3成分で構成される空間上において、本川と牛糞の1試料の距離が近く、誤分類される可能性が見られた。混在している本体、蛇沢、牛糞は3次元空間上ではおおそ分類される傾向が確認できた。各主成分における元素の寄与率を見ると、主に第1成分で Ga と Ba、第3主成分で Ni が正に寄与しており、反対に第3成分で Rb、Cs が負に寄与していた。

(3) 微量元素濃度による地点分類 —判別分析—

微量元素濃度を変数に用いて判別分析を行うにあたって、19元素から分析に寄与する元素を選択するために体長も含め各元素と強相関(相関係数±0.8-1.0)である元素と、一元配置分散分析において棄却域確率(P)をP<0.2に設定し該当した元素を除去した結果V、Mn、Fe、Co、Ni、Cu、Zn、Se、Rb、Mo、Csの12元素を得た。安定同位体比と同様の条件でステップワイス変数選択正準判別分析を行ったところ、Mn、Fe、Ni、Se、Rb、Mo、Csの7元素が選択され、以下(6)の判別関数式が構築された。

$$Yi = Ai[Mn] + Bi[Fe] + Ci[Ni] + Di[Se] + Ei[Rb] + Fi[Mo] + Gi[Ces] + Hi \quad (6)$$

Yi : 判別得点
 Ai, Bi, Ci, Di, Ei, Fi, Gi : 判別係数
 Hi : 定数項
 [Mn], [Fe], [Ni], [Se], [Rb], [Mo], [Cs] : 各元素濃度(μg/g)を標準化した値

(6)式に、算出された表-6の各係数、定数項と試料の標準化した元素濃度を代入し、判別得点1~4を得た。判別得点1, 2を用いて散布図(図-4)を作成し、全ての判別関数式によって算出された判別率を表-7に示した。
 5地点はそれぞれ100%で正しく分類され、また判別分析の妥当性を確認するLeave-one-out法においても全体で91.6%的中率を得た。誤って分類されたサンプルは2個体(牛糞1個体、蛇沢1個体)であり、主成分分析の結果と同様の傾向が見られた。牛糞と蛇沢の分類が一部個体でなされなかったのは、個体差、移動、地点の類似など

が考えられるが今回の結果から判断することは出来なかった。

表-6 各判別得点の判別係数、定数項

	Y1	Y2	Y3	Y4
Ai	-1.06	0.642	-0.735	-1.24
Bi	1.68	-1.40	0.714	1.15
Ci	-1.58	0.311	2.19	0.394
Di	0.570	1.40	0.663	0.947
Ei	2.72	0.378	0.469	0.579
Fi	-2.41	0.525	-1.41	-0.962
Gi	0.725	-0.453	0.993	-1.19
Hi	-2.20×10 ¹⁵	2.25×10 ¹⁵	-7.99×10 ¹⁶	-5.17×10 ¹⁶

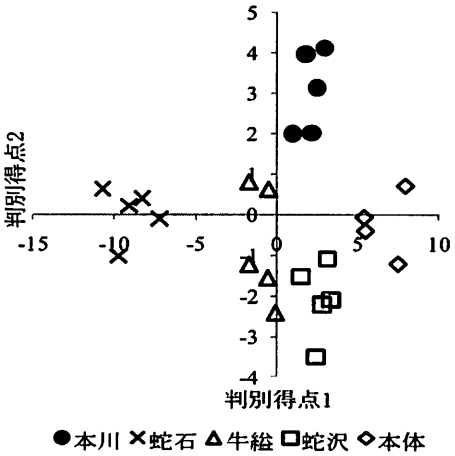


図-4 微量元素を用いた判別結果

表-7 微量元素を用いた判別分析における判別率

	判別率	交差検証率	誤判別
本川	100.0%	100.0%	—
蛇石	100.0%	100.0%	—
牛糞	100.0%	80.0%	蛇沢1個体
蛇沢	100.0%	80.0%	牛糞1個体
本体	100.0%	100.0%	—
全 体	100.0%	91.6%	

4. まとめ

安定同位体比を用いた判別分析では、本体、蛇石、その他による3群の分類が可能であったが、体長との強い相関関係も見られ、それ以上の分類は困難であった。一方、微量元素濃度を用いた判別分析では5地点の分類が概ね可能となった。さらに、微量多元素を用いた判別分析では、安定同位体比による分類が困難であった本体、牛糞、蛇沢の分類も概ね可能となった。微量多元素を分類の変数として用いることは、分類の困難が予想される小規模スケールでの分類を可能とした。これは、大規模スケールでの分類において微量多元素の有用性を高めると共に、個体分類というさらに詳細な分類への応用の可能性も期待される。

謝辞：本研究では三春ダム管理事務所、応用地質株式会社、ダム水源地環境整備センターの各位に多大なる援助を賜った。琵琶湖博物館の中井克己博士には試料採集にご協力いただいた。また、分析機器を使用させていただいた、東京農工大学環境毒性学研究室の方々に感謝し上げる。なお、本研究の一部は科学研究費助成事業（課題番号20658054, 23651008）および水源地研究会研究助成（財）河川環境管理財団の河川整備基金助成事業により実施された。

参考文献

- 1) 谷田一三, 村上哲生編：ダム湖・ダム河川の生態系と管理 日本における特性・動態・評価, pp. 1-16, 名古屋大学出版会, 2010.
- 2) Thornton K. W., B. L. Kimmel, F. E. Payne 編 (村上哲生, 林裕美子, 奥田節夫, 西條八東監訳)：ダム湖の陸水学, pp. 85-185, 生物研究社, 2004.
- 3) Suzuki K. W., A. Kassi, T. Ohta, K. Nakayama, and M. Tanaka: Migration of Japanese temperate bass (*Lateolabrax japonicus*) juveniles within the Chikugo River estuary revealed by $\delta^{13}\text{C}$ analysis, *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, Vol385, pp. 245-256, 2003.
- 4) Gomez M. M. C., R. Brandt, N. Jakubowski, and J. T. Andersson: Changes of the Metal Composition in German white wines through the winemaking process, A study of 63 elements by inductively coupled plasma-mass spectrometry, *J. Agric. Food Chem.* Vol52, pp. 2953-2961, 2004.
- 5) 福田裕, 渡部終五, 中村弘二編：水産物の原料・産地判別, pp. 121-127, 恒星社厚生閣, 2006.
- 6) Conti M. F., F. Cubadda and M. Carcea.: Trace metals in soft and durum wheat from Italy, *Food Additives Contaminants*. Vol17, pp. 45-53, 2000.
- 7) Ashford J. R., C. M. Jones, E. Hofmann, I. Everson, C. Moreno, G. Duhamel, and R. Williams.: Can otolith elemental signatures record the capture site of Patagonian toothfish (*Dissostichus eleginoides*), a fully marine fish in the Southern Ocean? *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* Vol62, pp. 2832-2840, 2005.
- 8) Poessel A., D. A. Nelson, H. L. Gibbs, J. W. Olszik.: Use of trace element analysis of feather as a tool to track fine-scale dispersal in birds. *Behav. Ecol. Sociobiol.* Vol63, pp. 153-158, 2008.
- 9) 川那部浩哉, 水野信彦編：日本の淡水魚, pp. 352-353, 山と溪谷社, 1989.
- 10) 渡邊泉, 四宮基彦, 國頭恭, 田辺信介, 窪寺恒己：駿河湾および東北沖で採取された深海生魚介類の微量元素蓄積, Vol36, pp. 179-189, 地球科学, 2002.
- 11) 渡邊泉, 齊來佐和子, 新井雄介, 久野勝治, 林光武, 谷地森秀二, 國頭恭, 田辺信介：2000年に栃木県で大量死したムクドリ *Sturnus cineraceus* の微量元素蓄積, Vol16, pp. 317-328, 環境科学会誌, 2003.
- 12) 青木繁伸：Rによる統計処理, <http://aki2.si.gunma-u.ac.jp/R/>

(2011.5.30受付)

Spatial Variation in Muscle Elemental Content of Crucial Carp (*Carassius auratus langsdorffii*) in Miharuru Dam Lake, Fukushima, Japan

Yoko ISHIZAKI¹, Izumi WATANABE², Kaori NODA³ and Nobuyuki AZUMA¹

¹ The Graduate School of Agriculture and Life Science, Hirosaki University

² The Graduate School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology

³ The Graduate School of Science and Technology, Hirosaki University

It is well known that lake dwelling fish species often play ontogenetic and/or diel migration. And also, they must change own habitat caused by artificial water level manipulation in many dam lakes. Unfortunately, there was little investigation that such passive seasonal fish movement patterns because of their apparent migratory complexity. We conducted to develop a method for determination of each individual habitat using muscle elemental composition analysis by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). Significant differences were shown in mean elemental ratios of muscle of 5 groups in the study lake. The result shows that body elemental composition is a potential tool for identifying the small scale freshwater fish local-populations with different habitat use histories.