総説

貝類の炭素・酸素安定同位体比研究――生物源炭酸塩を活用した古生物研究 への応用に向けて

西田 梢*,**

*茨城工業高等専門学校国際創造工学科・**独立行政法人日本学術振興会

Stable carbon and oxygen isotopes of molluscan shells: Implications to paleontological studies on biological carbonates

Kozue Nishida*, **

*Department of Industrial Engineering, National Institute of Technology, Ibaraki College, Hitachinaka, Ibaraki 312-8508, Japan (e-mail: koz.nishida@gmail.com); **Japan Society for the Promotion of Science (JSPS), Kojimachi Business Center Building, Chiyoda-ku, Tokyo 102-0083, Japan

Abstract. Molluscan shells record environmental and ecological information in regions from low to high latitudes that has implications for understanding the physiological mechanisms and evolution of biomineralization. To enhance the application of information derived from modern and fossil molluscan shells in paleontological research, I undertook a comprehensive review of recent studies of the stable carbon and oxygen isotopes of molluscs and other biogenic and synthetic carbonates and reinterpreted the isotopic compositions of molluscan shells by focusing on the mechanism of their mineralization. Standardization and correction of analytical isotopic values used in paleontological research, together with recent advances in micro-volume isotopic analysis and clumped isotope thermometry, will enhance their application in studies of modern and fossil biogenic carbonates.

Key words: 炭素同位体比, 酸素同位体比, 水温, pH, 生物効果, 貝類

はじめに

生物源炭酸塩の炭素・酸素安定同位体比(δ¹³C,δ¹⁸O) は、その分類群、種、あるいは個体を特徴づける"個性" を持っている. その同位体組成は, 周辺環境の物理化学 条件, 生物の生理・代謝, そして, 石灰化プロセスを反 映する.これらの要因を正しく認識することで、生物源 炭酸塩のもつ"個性"を様々な環境指標研究やバイオミ ネラリゼーション研究に応用することができる.本論で 取り上げる貝類は、低緯度から高緯度域まで広く生息す るため、過去の全海洋域の環境情報を蓄積する上で重要 な分類群のひとつである. これまで古環境復元のツール として広く用いられており(北村, 2018), アイスランド ガイ (Weidman and Jones, 1994; Schöne *et al.*, 2004), シャコガイ類 (Watanabe et al., 2004; Asami et al., 2015; Yamanashi et al., 2016), ビノスガイ類 (Kubota et al., 2017; Shirai et al., 2018a) など長寿の貝類を用いた長期 の古環境復元の研究も進んでいる.本稿では、このよう に古環境復元に広く有用である貝殻のδ¹³C,δ¹⁸Oに記 録されている情報を古生物研究に最大限に活用できるよ う、環境・代謝・バイオミネラリゼーションという3つ の要因についてこれまでの報告を俯瞰し, 貝類の同位体 比に見られる"個性"をどう解読すべきか解説する. さ らに, 無機合成の炭酸塩や他の分類群の知見を導入しな がら, 安定同位体比を古生物学へ活用するための様々な 情報 – 同位体比の補正方法, 分類群による同位体効果の 比較, 同位体質量分析計を用いた最新の分析技術を紹介 し, 同位体研究の課題や応用研究への展望について議論 する.

炭酸塩の δ^{13} C・ δ^{18} O分析と標準化

本章では,まずは安定同位体比分析手法と分析値の補 正計算方法について解説する.

炭酸カルシウムの δ^{13} C, δ^{18} O分析は、以下に示すリン 酸反応(式(1))で二酸化炭素ガスを発生させ、イオン 化した二酸化炭素イオン(CO₂⁺)を安定同位体質量分析 計で分析することで定量する.

 $CaCO_3 + H_3PO_4 \rightarrow CaHPO_4 + H_2O + CO_2 \quad \cdots (1)$

同位体比は国際標準試料により、標準化を行う.現在は NBS19 (Friedman *et al.*, 1982)を用いたVPDB (Vienna PDB) スケールでの補正が一般的であり、 δ (デルタ)表記法により以下の式で求められる.

$$\begin{split} \delta^{13} C &= (({}^{13}C/{}^{12}C)_{sample} / ({}^{13}C/{}^{12}C)_{VPDB} - 1) \times 1000 \quad \cdots (2) \\ \delta^{18} O &= (({}^{18}O/{}^{16}O)_{sample} / ({}^{18}O/{}^{16}O)_{VPDB} - 1) \times 1000 \quad \cdots (3) \end{split}$$

δ¹³C, δ¹⁸O値は千分率(‰, パーミル)で示す. 安定 同位体比の表記方法についてはCoplen (2011) に, 国 際標準試料の推奨値や取り扱い方法についてはBrand et al. (2014), Ishimura et al. (2008), Nishida and Ishimura (2017) に,同位体比の補正方法についてはKim et al. (2015) にそれぞれ詳しくまとめられている. な お、NBS19の枯渇に伴い、国際原子力機関(International Atomic Energy Agency, IAEA) は新たな国際標準物質 として IAEA-603の販売を開始している(VPDBスケー ルで表記).炭酸塩のδ¹⁸О値の補正は特に注意が必要な ため、以下にまとめる.炭酸塩のリン酸反応で得られた $CO_2 の \delta^{18}O$ 値は反応温度に依存し、さらに鉱物種によっ ても分別の程度が異なることが知られている(Sharma and Clayton, 1965; Kim et al., 2007a). 国際標準物質の多 くはカルサイトからなり(例えばNBS 19, IAEA-CO-1, IAEA-603),現在,多くの研究室はこのカルサイト標準 試料を基に種々の炭酸塩の同位体比を決定している.研 究室により炭酸塩のリン酸反応温度は異なるためアラゴ ナイトを分析する場合には、リン酸反応温度により得ら れる分析値が変わることに留意し,補正計算を行う必要 がある. δ^{18} O値を報告する際には、リン酸反応温度(例 えば25℃,70℃,90℃)と計算に用いた同位体分別係数 (例えばカルサイト同位体分別係数: Sharma and Clayton, 1965; Kim et al., 2007a, アラゴナイト同位体分別係数: Kim et al., 2007a)を明記することが望ましい. アラゴナ イトの同位体計算上の問題については、横内ほか(2017) に詳しい解説があるので参照されたい.

炭酸塩の同位体交換反応の原理

生物源炭酸塩の δ^{13} C, δ^{18} Oは,古気候学,古生態学, バイオミネラリゼーションなど,さまざまな研究に活用 されてきた.炭酸塩形成時,炭酸塩の酸素同位体分別は 温度依存性を示し,海水との間に酸素同位体交換反応が 起こる(Hoefs, 2018).Urey(1947)によって初めて報 告された酸素同位体温度計は,さまざまな生物源炭酸塩 に適用され,水温(気温)や海水の δ^{18} Oの復元に用い られてきた(Watanabe *et al.*, 2004; Asami *et al.*, 2015; Kubota *et al.*, 2017; Shirai *et al.*, 2018a, b; Horikawa *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2019).海水の δ^{18} Oは,蒸発や降 水,淡水の流入,海氷形成などで変動する,海洋循環を 理解する上で重要な環境指標であり,海域ごとに異なる 値を示す(Le Grande and Schmidt, 2006).海水の δ^{18} O は塩分とよく相関することが知られている(東シナ海〜 日本海沿岸, Horikawa *et al.*, 2015; 小平ほか, 2016, 太 平洋域, Oba, 1990).

 δ^{18} Oと水温の関係は、炭酸塩 – 溶液間の酸素同位体分別係数 α を用いて、以下の温度関数で示す.

1000 ln α carbonate-water = a × T + b(4)

このとき温度Tはケルビン(K)で表記する. α は,炭酸 カルシウムおよび水の δ^{18} Oから以下の式で求められる.

$$\alpha = \frac{\delta^{18} O_{\text{carbonate, VSMOW}} + 1000}{\delta^{18} O_{\text{water, VSMOW}} + 1000} \quad \cdots (5)$$

また, $|x| \ll 1$ の時に $\ln(1 + x) \approx x$ と近似できるのを利用 して, 炭酸塩および水の δ^{18} O値は分別係数 α と以下の式 で近似的に表される.

1000 ln
$$\alpha_{\text{carbonate-water}} \approx \delta^{18} O_{\text{carbonate}} - \delta^{18} O_{\text{water}}$$

= a' ×T+b'(6)

 $\delta^{18}O_{carbonate}$, $\delta^{18}O_{water}$: 炭酸カルシウムおよび水の $\delta^{18}O_{r}$, T:温度(°C). $\delta^{18}O_{carbonate}$ はVPDBスケール, $\delta^{18}O_{water}$ はVSMOWスケールで示す.式(6)は,生物源炭酸塩の場合,環境条件をコントロールした生物飼育実験,あるいは観測データや採水データの充実した野外試料を用いて作成する.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.式(4)~(6)では,温度の単位や同位体比のスケールが異なるため,計算の際には注意する必要がある.なお, $\delta^{18}O$ のVPDBスケールとVSMOWスケールの変換には以下の式(順にBrand *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2015)を用いる.

$$\begin{split} \delta^{18} O_{VPDB} &= 0.97001 \times \delta^{18} O_{VSMOW} - 29.99 \quad \cdots (7) \\ \delta^{18} O_{VSMOW} &= 1.03092 \times \delta^{18} O_{VPDB} + 30.92 \quad \cdots (8) \end{split}$$

δ¹⁸Оの水温依存性にみられる同位体効果は、同位体平 衡下で同位体交換が起こる反応である. 図1は無機合成 アラゴナイト・カルサイト (Kim et al., 2007b) とアラゴ ナイトからなる生物源炭酸塩(魚類耳石,貝類,サンゴ) のδ¹⁸O値を比較した図である.一般的には,温度やpH といった物理化学環境を制御した無機合成実験で作成さ れた炭酸塩の同位体比を"同位体平衡值"と呼び、生物 源炭酸塩の同位体分別を評価する際に広く用いられてい る. 図1では、無機合成カルサイトのδ¹⁸O-温度関係式を 2例載せているが (Kim and O'Neil, 1997; Watkins et al., 2014),両者には2‰程度の違いがみられることが分か る. Watkins et al. (2014) は、炭酸水素ナトリウムや炭 酸アンモニウムを用いた従来の合成方法では、低いδ¹⁸O 値を示すこれらと溶液中のCO2ガスの同位体交換により, 合成カルサイトのδ¹⁸O値が低くなり,同位体非平衡下で 炭酸塩形成が起こりうることを指摘している. Watkins et al. (2013) では、炭酸脱水酵素 (carbonic anhydrase) を用いたCaCl₂-NH₄Cl溶液での新たなカルサイト合成法



図1. 無機合成および生物源炭酸塩の酸素同位体比と水温の関係. (1) 無機合成アラゴナイト (Kim *et al.*, 2007b); (2) 無機合成カルサイト (Watkins *et al.*, 2014); (3) 無機合成カルサイト (Kim and O'Neil, 1997)、魚類耳石 (4) – (8) [(4) Radtke *et al.*, 1996; (5) Thorrold *et al.*, 1997; (6) Patterson *et al.*, 1993; (7) Sakamoto *et al.*, 2017; (8) Kitagawa *et al.*, 2013], (9) 貝類および有孔虫殻 (Grossman and Ku, 1986); 二枚貝殻 (10) – (13) [(10) Owen *et al.*, 2008; (11) Watanabe and Oba, 1999; (12) Aharon and Chappell, 1983; (13) Nishida *et al.*, 2015]; サンゴ骨格 (14) – (19) [(14) Nishida *et al.*, 2014a; (15) Jullet-Leclerc *et al.*, 1997; (16) Leder *et al.*, 1996; (17) Hirabayashi *et al.*, 2013; (18) Wellington *et al.*, 1996; (19) Nishida *et al.*, 2014b]. Kim *et al.* (2007a) に従い, 無機合成アラゴナイトの同位体値 (Kim *et al.*, 2007) は、カルサイトのリン酸反応の同位体分別係数1.01025 (Sharma and Clayton, 1965) で再計算を行った.

Fig. 1. Oxygen isotope fractionation between synthetic and biological carbonates and water as a function of temperature. 1000 ln α data are shown for (1) *in vitro* aragonite (Kim *et al.*, 2007); (2) *in vitro* calcite (Watkins *et al.*, 2014); (3) *in vitro* calcite (Kim and O'Neil, 1997); aragonite fish otoliths (4)–(8) [(4) Radtke *et al.*, 1996; (5) Thorold *et al.*, 1997; (6) Patterson *et al.*, 1993; (7) Sakamoto *et al.*, 2017; (8) Kitagawa *et al.*, 2013]; (9) aragonite molluscan and foraminiferal shells (Grossman and Ku, 1986); aragonite bivalve shells (10)–(13) [(10) Owen *et al.*, 2008; (11) Watanabe and Oba, 1999; (12) Aharon and Chappell, 1983; (13) Nishida *et al.*, 2015]; aragonite coral skeletons (14)–(19) [(14) Nishida *et al.*, 2014a; (15) Jullet-Leclerc *et al.*, 1997; (16) Leder *et al.*, 1996; (17) Hirabayashi *et al.*, 2013; (18) Wellington *et al.*, 1996; (19) Nishida *et al.*, 2014b]. The aragonite-water fractionation factor (1000 ln α) of Kim *et al.* (2007) was recalculated using a calcite acid fractionation factor of 1.01025 (Sharma and Clayton, 1965).

を提案し、より同位体平衡に近いカルサイトの合成に成 功した.このようなカルサイトの例のように、炭酸カル シウム合成実験については技術的な課題もあり、"同位体 平衡値"といいつつも絶対的な値でないことは留意した い.

生物源炭酸塩の同位体分別にみられる 石灰化プロセス

生物源炭酸塩にみられる生物効果

生物源炭酸塩の同位体比の多くは無機的な炭素・酸素 同位体平衡値からずれを生じることが知られており,こ のような同位体非平衡反応により起こる同位体効果は生 物効果(vital effect)と呼ばれている(Urey *et al.*, 1951; McConnaughey, 1989a, b).サンゴの場合は,同位体平衡 値からのずれが顕著であり,後述する反応速度論的同位 体効果が強く表れているといわれている(McConnaughey *et al.*, 1997).一方,魚類耳石や貝類の場合は,同位体平 衡値近くで石灰化していることが分かる(図1).このよ うに,耳石や貝殻の場合,興味深いことに,実験室では 合成が難しい同位体平衡に近い炭酸塩を形成しているこ とが分かる.次章では,生物源炭酸塩の同位体分別がど のような石灰化プロセスで起こるのか,石灰化の場の化 学組成とともに解説する.

反応速度論的同位体効果と石灰化

貝類の殻形成は、貝殻と軟体部、さらに軟体部から形 成される有機質の殻皮で囲まれた、外套膜外液に満たさ れた閉鎖空間で進行する(図2).海水・外套膜外液に は、二酸化炭素(CO₂)、炭酸(H₂CO₃)、炭酸水素イオン (HCO₃⁻)、炭酸イオン(CO₃²⁻)が溶存し(図3a)、こ れらの総称を溶存無機炭素(dissolved inorganic carbon, DIC)と呼ぶ.細胞膜は分子状のCO₂(molecular CO₂)に 対しては高い透過性を持つが、(炭酸、炭酸イオン、炭酸 水素イオンや陽イオン(Ca²⁺, Mg²⁺)はイオンサイズが 大きいため透過しにくい(McConnaughey, 2003).そのた め、石灰化は主に外套膜外液にもたらされたCO₂の水和 化、水酸化と炭酸イオンに至るまでの解離により、炭酸カ ルシウムが形成されると考えられている(McConnaughey and Gillikin, 2008).これらの反応は以下の式で表される.

 CO_2+H_2O ⇒ H_2CO_3 ⇒ $HCO_3^-+H^+$ [水和化] …(9) CO_2+OH^- ⇒ HCO_3^- [水酸化] …(10) HCO_3^- ⇒ $CO_3^{2-}+H^+$ [解離] …(11)

McConnaughey (1997) は、サンゴ骨格に見られる同位 体分別は"CO₂からの水和化・水酸化に伴う同位体非平 衡反応である"とする、反応速度論的同位体効果(動的 同位体効果, kinetic effect)モデルを提唱した.これは、 サンゴの石灰化母液において、狭い石灰化空間で石灰化



図2. 貝殻・軟体部の断面図とカルシウム・溶存無機炭素の移動経路. 殻・軟体部および殻皮で囲まれた閉鎖空間の石灰化スペースには、外套膜外液(EPF)が満たされている. 炭酸脱水酵素(CA)とカルシウムATPアーゼは、貝類の溶存無機炭素のイオン組成を制御する役割をもつ. (McConnaughey and Gillikin, 2008; Le Roy et al., 2014).

が進行するとき、生物膜を介した石灰化母液へのCO2フ ラックスが大半を占めるため, CO₂と水との同位体交換 平衡に達するまでに時間がかかり(式(9)の右方向の 反応),石灰化母液の同位体比はより低い同位体比を示す 現象である.反応速度論的同位体効果を規制する主な因 子として、(1) 溶存無機炭素の化学種、(2) 石灰化速度、 (3) 石灰化部位の厚みが挙げられる.(1) については、ま ず,石灰化母液中での炭酸水素イオン生成反応に占める 水酸化・水和化それぞれの寄与率は、石灰化母液のpHに 依存する (Johnson, 1982; McConnaughey, 2003; Rollion-Bard et al., 2003, 2011). 石灰化母液のpHが高くなるほ ど、水酸化反応の寄与率が高まり(図3b)、この反応で 生成する炭酸水素イオンおよび炭酸イオンは低いδ¹⁸O値 を示す (McConnaughey, 2003). McConnaughey (2003) では,高pH条件下で育ったサンゴや有孔虫の炭酸塩の δ¹⁸Oが低い値になるのは、このような炭酸水素イオン、 炭酸イオンのδ¹⁸O組成を反映したためと解釈した.また, (2) では、石灰化速度が速いと、炭酸種と水が同位体平 衡に達する前に骨格に取り込まれてしまうために,反応 速度論的同位体効果が強く表れる.サンゴや腕足類では, 石灰化速度と δ^{13} C, δ^{18} Oの間によい逆相関関係がみら れることが広く知られている (サンゴ: McConnaughey, 1989a, 1989b; Nishida et al., 2014a, 腕足類: Auclair et al., 2003; Takayanagi et al., 2012). 一方, 貝類の場合は δ^{13} C, δ^{18} Oの殻成長速度依存性がみられることはまれで ある (McConnaughey and Gillikin, 2008; Nishida et al., 2018). さらに、(3) 石灰化空間の厚みについては、石 灰化空間が薄ければ薄いほど式(9)-(11)の右方向の反 応を遅くしてしまうため、反応速度論的同位体効果が顕 著に表れると言われている (McConnaughey, 2003). も し,石灰化空間の厚みが分かる場合には,McConnaughey



図3. A:溶存無機炭素(二酸化炭素,炭酸,炭酸水素イオン,炭 酸イオン)の濃度とpHの関係(Sade and Halevy, 2017). 全炭酸 のモル濃度15 mM, 25 $^{\circ}$ Cの淡水条件. B:溶液内での溶存無機炭 素の各イオンの反応の割合(Sade and Halevy, 2017). それぞれ の反応の占める割合はDIC濃度や各イオンの割合に規制されてい る. CO₂の水和化の割合は, pHが低下すると増加する.

(2003) に記述されている計算方法に従い,石灰化生物 の水酸化や水和化反応速度を求めることが出来る.貝類 の場合,軟体部と殻を同時に切断し切片を作成すること は技術的に難しいため,外套腔の厚みの情報は十分得ら れていない.なお,成長速度による反応速度論的同位体 効果が顕著な腕足類では,殻タンパク質に細胞膜に結合 するドメインが多く含まれ,軟体部が殻に密着している ことが示唆されており(Immel et al., 2015; Isowa et al., 2015),石灰化空間の薄さが反応速度論的同位体効果と して表れている可能性が考えられる.

次に、同位体平衡にある石灰化を前提とした炭酸イオ ン仮説(carbonate ion hypothesis, Spero *et al.*, 1997)に ついて紹介したい. 無機的な炭酸塩形成においては、溶 液中でDICと炭酸塩に同位体交換平衡が達成されている 場合に、pHが高くなるほど、DICの $\delta^{18}O(\delta^{18}O_{DIC})$ は低 い値をとる(McCrea, 1950; Usdowski and Hoefs, 1993). これは、DIC中の炭酸イオンは分子状二酸化炭素や炭酸水 素イオンに比べて低い $\delta^{18}O$ を持ち(Usdowski *et al.*, 1991; Beck *et al.*, 2005; Zeebe, 2007), pHが高くなると、全炭 酸における低い $\delta^{18}O$ を持つ炭酸イオンの存在度が増える ことによる(McCrea, 1950; Usdowski and Hoefs, 1993; Zeebe, 2007)(図3a). このように、無機炭酸塩では炭酸 種の存在比に依存したδ¹⁸O_{DIC}の変化が炭酸塩のδ¹⁸Oに反 映されることが議論されてきた. Spero et al. (1997) で は、有孔虫殻においても、 δ^{18} OとpH、 δ^{18} Oと炭酸イオン 濃度に逆相関関係がみられることを明らかにした.炭酸 イオン仮説は、有孔虫(Spero et al., 1997; Zeebe, 2007) やサンゴ (Adkins et al., 2003; Tanaka et al., 2014) でpH 変化に伴う同位体効果の説明に用いられている.ただし, McConnaughey (2003) はこの仮説に否定的な意見を示し ている. McConnaughey (2003) は, Spero et al. (1997) やAdkins et al. (2003)の同位体比について再検討を行 い、高pH条件下では同位体交換平衡が成立することは 難しく, さらにδ¹³Cの同位体分別を説明できていないこ とを指摘した. また, Nishida et al. (2018) では二枚貝 のアカガイ Scapharca broughtoniiの殻のδ¹⁸O は同位体平 衡値に近い,もしくは低い値を示し,δ¹³Cも同位体非平 衡な低い値を示すことから,同位体平衡が成立している とは言い難く, 貝殻形成は反応速度論的同位体効果で解 釈するべきであると結論付けている.

反応速度論的同位体効果と石灰化母液のpH

石灰化母液のpHは分類群によって異なる値を示し,実 は、外套膜外液のpHは貝類の石灰化を特徴づける重要 な因子のひとつでもある. 貝類の場合には外套膜外液の pHは環境水より低い値を示すことが知られている. 貝 類の外套膜外液の報告例として、pH~7.3(ホンビノ スガイ Mercenaria mercenaria), $pH \sim 7.4$ (アメリカ ガキ Crassostrea virginica), pH~7.4 (ムラサキイガイ Mytilus edulis) (Crenshaw, 1972), pH ~ 7.8 (ヒレシャ コガイ Tridacna squamosa) (Ip et al., 2006), $pH \sim 7.5$ (ムラサキイガイ) (Heinemann et al., 2012) が挙げられ る.一方,サンゴや有孔虫の石灰化母液のpHは海水の pH(8.1付近)と同一,もしくは高い値を示し(サンゴ: pH 8.5~8.7, McCulloch et al., 2012, 有孔虫: pH 8.0~ 8.2, Rae et al., 2012), 炭酸塩飽和度を上げることで石 灰化を促していると考えられている (Adkins et al., 2003; McConnaughey, 2003; McConnaughey and Gillikin, 2008; Ohno et al., 2017). 貝類の場合は外套膜外液のpHが低 いため,酸性化条件下では、サンゴや有孔虫よりも,pH 恒常性維持のためのコストを低く抑えられるという有利 な面があると思われる.ここで、pHと生物源炭酸塩の δ^{18} Oの関係について考えてみよう. Nishida *et al.* (2018) Figure6での生物源・無機炭酸塩の δ^{18} OとpHの対比から, 貝類の殻は無機炭酸塩と近いδ¹⁸O値を示し、サンゴ骨格 は低いδ¹⁸O値を示した. 貝類は外套膜外液のpHが低い ために水和化反応の寄与率が高まり,より平衡値に近い 殻のδ¹⁸Oを示すと考えられる.よって貝類の外套膜外液 のpHはサンゴ・有孔虫と比べて、より平衡値に近づく ような同位体効果が働いていることが分かる. このよう に, 貝類は反応速度論的同位体効果が小さく, 貝殻から

水温や海水の同位体変動を復元する上での利点になって いる.

石灰化生物は石灰化母液のpH恒常性維持のため、酵 素を用いて炭酸組成を制御している. 貝類やサンゴでは, 炭酸脱水酵素とカルシウム ATP アーゼ (Ca²⁺ ATPase) という2つの酵素がpH維持に重要な働きをしているこ とが分かっている (Cohen and McConnaughey, 2003; McConnaughey and Gillikin, 2008). 炭酸脱水酵素は,石 灰化母液内での二酸化炭素の水和化(式(9))を促進す る酵素であり (Paneth and O'Leary, 1985; Le Roy et al., 2014),石灰化母液の化学平衡・同位体平衡を規制する要 素である.炭酸塩の無機合成実験では炭酸脱水酵素の存 在量が多いほど,同位体平衡値に近づくことが明らかに なっている (Uchikawa and Zeebe, 2012). 炭酸脱水酵素 の働きに着目した生物源炭酸塩の同位体効果の研究はま だ限られているが (Chen et al., 2018), 今後, 貝類にお いても議論が進むことが期待される. なお, 興味深いこ とに, 腕足類はこれまで炭酸脱水酵素が見つかっておら ず (Le Roy et al., 2014; Isowa et al., 2015), 反応速度論 的同位体効果が強く働く原因ではないかという指摘もあ る (Bajnai et al., 2018). また, もう一つの重要な酵素で あるカルシウム ATP アーゼは、石灰化母液にカルシウム イオンを移送し、代わりに2H⁺イオンを取り除くことで、 石灰化を促進する作用をもつ.海水のpHが低下すると, pH維持のためカルシウム ATP アーゼのイオンポンプ機 能がより活性化し、代謝由来のDICの寄与率が低下する ことが貝類をモデルとした数値シミュレーションにより 推測されている (Spalding et al., 2017).

以上のように,生物源炭酸塩にみられる同位体効果は, 各分類群の石灰化部位の化学組成や生体の構造,生理学 的プロセスを理解した上で,評価していく必要がある.

殻組成に海洋酸性化はどのように表れるか

海洋酸性化問題は2000年代から注目されるようになり, 気候変動に関する政府間パネル(IPCC)に取り上げら れたのは2007年からと、比較的新しい地球環境問題であ る.人為起源のCO2排出により、海洋へ溶け込むCO2濃 度が増加する. それに伴って式 (9)の反応が進み, 海洋 のpH低下,炭酸イオンの減少により炭酸塩飽和度が低下 する.海洋酸性化は、海洋生物、とりわけ炭酸塩殻をも つ海洋生物には, 生理・代謝, 体成長, 殻形成, 初期発 生, 生存率など, 種の生存を脅かす深刻な影響が危惧さ れており, 生物多様性や水産資源管理の点で重要な課題 となっている (Pörtner et al., 2004; Orr et al., 2005; Fabry et al., 2008; Gazeau et al., 2013; Kawahata et al., 2019). また、海洋のpH, 二酸化炭素分圧は地質時代を通じて変 動してきたことが明らかになりつつあり(Moriya, 2011; Hönisch et al., 2012; 守屋, 2017), 海洋のpHと生物の絶 滅事変との関連についても議論が進んでいる(Hönisch et al., 2012). このような海洋酸性化がどのように生物の石 灰化や生理に影響を及ぼしているのか評価する上で,生 物殻の化学組成の情報は重要な環境影響評価指標となる 可能性がある.では,生物源炭酸塩のδ¹³C,δ¹⁸Oは,海 洋のpH,溶存無機炭素の化学種の変動に対しどのように 応答するのか,まだ十分に知見が得られていない面も多 いものの,これまでの報告例とどのような同位体効果が 予測されるか,解説したい.

これまで、pHと殻の δ^{13} C、 δ^{18} O を議論した研究とし ては、以下の論文が挙げられる – 貝類 (δ^{13} C・ δ^{18} O: Nishida et al., 2018, δ¹³C: Zhao et al., 2018), 有孔虫 $(\delta^{13}C \cdot \delta^{18}O$: Spero *et al.*, 1997; Bijma *et al.*, 1999, $\delta^{18}O$: Zeebe, 1999), サンゴ (δ^{13} C・ δ^{18} O: Krief *et al.*, 2010; Tanaka *et al.*, 2014), $\vartheta = (\delta^{13}C \cdot \delta^{18}O : Courtney and$ Ries, 2015). まず, 古環境分野においては殻のδ¹⁸Oにど れだけpHの影響を受けるかが、重要であろう. 例えば、 有孔虫殻の δ^{18} Oは、pHが1上がるごとに殻の δ^{18} O値が 1.42‰低くなる (Zeebe, 1999). そのため, 海洋のpHが 低かった白亜紀の海洋の場合(pH:7.7~7.9)は、有孔 虫のδ¹⁸Oを用いた水温推定は、実際の水温よりも2.0℃ ~3.5℃低い見積もりになると推測されている(Zeebe, 2001). 一方, 貝類やサンゴの場合は, 有孔虫に比べると $pH による\delta^{18}O の変化 (-0.1 ‰/pH ~ -0.7 ‰/pH) は小$ さいため (Krief et al., 2010; Tanaka et al., 2014; Nishida et al., 2018), これらの種に関しては, 殻のδ¹⁸O水温指 標が海洋のpH影響を受けづらいと言えるだろう.

Nishida et al. (2018) では,二酸化炭素添加により作 成した海洋酸性化海水で二枚貝類のアカガイの飼育実験 を実施した(海水のpH7.6~8.2).アカガイ殻はpHが 低くなるほど,高いδ¹³C,δ¹⁸O値を示し,同位体平衡値 に近づいていることを明らかにした. 同位体平衡値との 比較から、本種の殻の同位体分別は同位体非平衡反応で あり, pH変化に伴う反応速度論的同位体効果が表れてい ることを示唆した (Nishida et al., 2018). 反応速度論的 同位体効果の要因として、(1) pH低下に伴う水和化の寄 与率の増加,(2)外套膜外液のpH恒常性維持のための 炭酸脱水酵素やカルシウム ATP アーゼの働きによる同位 体平衡の促進効果, を挙げている (Nishida et al., 2018). この実験に用いた種はpHが低下しても殻の成長速度は 変わらないが、こうした酸性化への耐性に関連した外套 膜外液の溶存無機炭素のイオン組成の制御機能が殻の同 位体比から読み取れる可能性がある.また,アカガイの 場合には酸性化しても殻形成への海水のDICの寄与率は 変化しないが (Nishida et al., submitted), 酸性化すると 石灰化量が低下するアサリ Ruditapes philippinarumでは 代謝由来のDICの寄与率が増大する (Zhao et al., 2018). 酸性化に対しては、種によって異なるメカニズムで石灰 化の場のDICのイオン組成の制御が行われていることを 示唆している.

貝殻の δ^{13} Cに記録される情報とその活用

貝類のδ¹³Cにみられる同位体効果

貝類の殻のδ¹³Cの炭素源は、主に環境水のDIC(約 0‰) と代謝由来のDIC (-20~-30‰) である (Tanaka et al., 1986; McConnaughey and Gillikin, 2008). 代謝由 来のDICは、主に呼吸により生成したCO₂ (respiratory CO₂)からなり、外套膜外液に拡散で供給される (McConnaughey and Gillikin, 2008). このため, 貝殻 の δ^{13} Cは海水のDICの δ^{13} C変動 (Poulain *et al.*, 2010; Hall et al. 2018), あるいは, 代謝活動の変化 (Lorrain et al., 2004; Gillikin et al., 2007, 2009; Nishida et al., 2015, 2018; Zhao et al., 2018) の指標として用いられる. 貝類 に見られる代謝効果 (metabolic effect) としては, (1) 年 齢など殻(軟体部)成長速度の変化に伴う効果(Klein et al., 1996; Lorrain et al., 2004; Gillikin et al., 2007, 2009; Nishida et al., 2015), (2) 代謝ポンプ効果 (metabolic pumping effect) (Waldbusser et al., 2013; Spalding et al., 2017), (3) 呼吸ガス交換 (respiratory gas exchange) に よる効果 (McConnaughey and Gillikin, 2008), の3つの 項目で説明されることが多い.年齢など殻(軟体部)成 長速度の変化に伴う効果は、貝類の老成によって殻のδ ¹³Cが低くなる影響として知られている(Lorrain *et al.*, 2004; Gillikin et al., 2007). これは、 殻成長速度が遅い時 には、外套膜外液にもたらされる呼吸由来のCO2の滞留 時間が長くなり、その比率が高くなるためと考えられて いる (Lorrain et al., 2004). 例えばNishida et al. (2015) では, 温帯に生息する二枚貝類のアカガイの水温飼育実 験を行い,殻のδ¹³Cが殻の成長速度と正相関,水温と逆 相関することを明らかにした.本種では,低温で殻成長 が速いときに殻の δ^{13} Cが高くなっているため、代謝由 来のDICの寄与率が小さくなるという、代謝効果の変化 を示していると考えられる (Nishida et al., 2015). つぎ に、代謝ポンプ効果は、カルシウム ATP アーゼの酵素の 機能に着目した新たな代謝効果の概念であり、カルシウ ムATPアーゼのイオンポンプ機能が活性化しているとき には石灰化速度が速くなり,石灰化への代謝由来のDIC の寄与率が低下するという効果である(Spalding et al., 2017). この効果は、(1)の代謝効果と石灰化速度とDIC 寄与率の関係は同一であるが,(1)では議論されていな い外套膜外液のpHについて、イオンポンプ機能が活性 化しているときはpHを維持あるいは上昇させていると 仮説立てている.海洋酸性化など,環境変化に伴う代謝 の変化と同位体組成の関係を議論する上で、今後、考慮 すべき効果の一つと思われる. 呼吸ガス交換による効果 (McConnaughey and Gillikin, 2008) は、 貝類では陸貝に おいて観察される同位体効果であり、呼吸が活発になる ほど、代謝で生成した低いδ¹³Cを示すCO₂が呼吸で放出 されることで、体内に残存する DIC が高くなる同位体効

果である.この同位体効果は、今のところ、石灰化への 呼吸由来の炭素の寄与率が高い陸貝(>70%)でのみ報 告されている(McConnaughey and Gillikin, 2008).

生物源炭酸塩のδ¹³Cは,化石から古生態-光共生生態 を復元するための重要な指標として注目されてきた. 有 孔虫では, 共生藻類の光合成で周囲の微小環境から¹²C が選択的に消費されるため、殻のδ¹³Cが高い値を示す ことが知られている (Spero and DeNiro 1987; Takagi et al., 2015, 2016). 貝類では、シャコガイ科やザルガイ科 の一部において, 光合成を行う共生藻類を持つ種がい る.シャコガイ類では、 δ^{13} Cへの光合成共生影響が議論 されてきたが (Jones et al., 1986; Romanek et al., 1987; Romanek and Grossman, 1989; Aharon, 1991; Asami et al., 2015; Yamanashi et al., 2016), 共生藻類の影響を受け ないと結論づける論文が多い(Romanek and Grossman, 1989; Aharon, 1991; Asami et al., 2015; Yamanashi et al., 2016). 例えば, Romanek and Grossman (1989) では, 褐虫藻を共生しているシラナミガイ Tridacna maximaと 近縁グループで非共生のキクザルガイの仲間 Chama cf. savignyiのδ¹³Cの比較を行ったが,共生・非共生の違いは 見出せなかったと報告している. 同様にMcConnaughey and Gillikin (2008) は、褐虫藻の光合成影響が見受けら れるサンゴに比べ、貝類ではその影響が明らかに小さい とし、軟体部の構造の違いを原因として挙げている. 貝 類の場合は、サンゴや有孔虫と異なり褐虫藻を細胞外に 共生しているため,褐虫藻の光合成の影響が石灰化の場 まで届きにくい可能性が考えられる. なお, シャコガイ 類では、殻のSr/Ca比から日射量を復元するという画期 的な環境指標が提案されており(Sano et al., 2012; Hori et al., 2015), 光合成共生についてはδ¹³C以外の指標に よる復元が期待される.

¹³C, ¹⁴Cを活用した生物源炭酸塩の炭素源推定

殻形成に寄与する炭素源は、生物石灰化のプロセスを 理解するための基礎的な情報であり、また、気候変動や 環境汚染などによる環境水の変化が、生物の石灰化の場 にどのように影響するかを議論する上でも重要な情報で ある.前述のように、多くの貝類はサンゴや有孔虫のよ うに光合成共生関係になく、反応速度論的同位体効果の 影響も小さいので、このような炭素源推定に有効な分類 群といえる.石灰化への炭素源推定は、δ¹³Cを用いた手 法(McConnaughey *et al.*, 1997)と放射性炭素14の天然 存在比(Δ ¹⁴C)を用いた手法(Adkins *et al.*, 2003)がこ れまで提案されている.

 δ^{13} Cを用いた炭素源推定は、以下の式 (McConnaughey et al., 1997) を用いて行う.

 $R_{M} \times \delta^{13}C_{R} + (1 - R_{M}) \times \delta^{13}C_{DIC} = \delta^{13}C_{shell} - \varepsilon_{ar-b} \quad \cdots (12)$

 ε_{ar-b} はアラゴナイト (ar) と炭酸水素イオン (b) 間の

同位体濃縮係数(+2.7%: Romanek *et al.*1992), $\delta^{13}C_{R}$, $\delta^{13}C_{DIC}$, $\delta^{13}C_{shell}$ はそれぞれ殻,海水のDIC,呼吸由来の $CO_2 \circ \delta^{13}C$, R_M は代謝由来の炭素の寄与率(%)である. また,海水のDICの寄与率(R_{DIC})は, R_M の値から,以 下の式で求められる.

$R_{DIC} = 100 - R_{M} \cdots (13)$

ここで注意すべきは、貝類の $\delta^{13}C_R$ は直接測定された例が ないため (McConnaughey and Gillikin, 2008), 先行研究 では貝類の軟体部や餌の δ^{13} C値から δ^{13} C_Rを見積もって いる点である. どの部位がδ¹³C_R値として活用するのに 最適かという点については今のところコンセンサスが得 られているわけではない. 例えば, Poulain et al. (2010) によるアサリを用いた炭素源推定では、餌、軟体部の筋 肉,消化腺で見積もった呼吸由来の炭素の寄与率は,それ ぞれ12%, 20~50%, 12~21%と, どの軟体部を $\delta^{13}C_R$ に採用するかで大きく変わることを示した(表1). さら に,器官毎に炭素源が取り込まれるまでの時間(滞留時 間) が異なるため (Poulain *et al.*, 2010), $\delta^{13}C_{\text{R}}$ にどの値 を活用するかは注意が必要である. なお、 δ^{13} Cへの種々 の同位体分別効果、あるいは海水DICと代謝由来の炭素 の寄与を議論するには、外套膜外液や血液(呼吸由来の DIC が溶存)といった生物体液の同位体組成を直接測定 することが重要と考えられるが、これまでのところ、生 物体液の同位体分析は進んでいない. 二枚貝類(ホンビ ノスガイ)の成貝の血液の $\delta^{13}C_{DIC}$ (Gillikin et al., 2007), 二枚貝類6種,巻貝類3種の外套膜外液のδ¹⁸O(Lécuyer et al., 2004) が報告されているのみである. 微量な生物 体液の分析技術の今後の進展に期待したい.

次に、加速器質量分析計(AMS)分析による Δ^{14} Cを 用いた炭素源推定(Adkins *et al.*, 2003)手法についてみ てみよう.まず、 Δ^{14} Cは1950年の大気CO₂の¹⁴C同位体 比との差を千分率で表した値で、以下の式(Stuiver and Polach, 1977)で求められる.

 $\Delta^{14}C = \delta^{14}C - 2 \times (\delta^{13}C + 25)(1 + (\delta^{14}C \swarrow 1000)) \cdots (14)$ $\delta^{14}C = ((As/Aabs) - 1) \times 1000 \cdots (15)$

A_sは試料の¹⁴C濃度,A_{abs}は標準¹⁴C初期濃度である.こ の Δ^{14} Cは,炭酸塩形成に関わる種々の同位体分別とは無 関係に,炭素起源の情報のみを記録する指標とされている (Stuiver and Polach, 1977).生物源炭酸塩の δ^{14} C, δ^{13} C にはさまざまな同位体分別が関わっているが、 δ^{14} Cにみ られる同位体分別は質量依存同位体分別として、 δ^{13} Cで の同位体分別の2倍という同位体間の相対質量差に基づ く仮定を置くことで、同位体分別効果を除いた指標を得 られる(詳しくは、Ishikawa *et al.*, 2013;石川, 2014を参 照).これを利用して、近年、食物網解析や生体における 炭素の滞留時間推定など、 Δ^{14} Cは年代推定以外にも地球 化学や生態学,法医学分野で広く活用される指標になっ

Reference	Species	Environment	Field collected /cultured	Method	Metabolic carbon contribution (%)	Seawater DIC contribution (%)	Remarks
Tanaka et al. (1986)	Mytilus edulis	seawater	field collected	$\delta^{13}C$	$48 \pm 5, 58 \pm 5$	$52 \pm 5, 42 \pm 5$	
				$\Delta^{14}C$	$24 \pm 3, 61 \pm 10$	$76 \pm 3, 39 \pm 10$	
	Crassostrea virginica	seawater	field collected	$\delta^{13}C$	$43 \pm 5, 45 \pm 4$	$57 \pm 5, 55 \pm 4$	
				$\Delta^{14}C$	$43 \pm 9,68 \pm 17$	$57 \pm 9, 32 \pm 17$	
	Mya arenaria	seawater	field collected	$\delta^{13}C$	63 ± 4	37 ± 4	
				$\Delta^{14}C$	23 ± 3	77 ± 3	
McConnaughey	genus Bathymodiolus	seawater	field collected	$\delta^{13}C$	5-12	88–95	
(1997)				$\Delta^{14}C$	5-12	88-95	
Gillikin et al. (2006)	Mytilus edulis	seawater	field collected	$\delta^{13}C$	1.8-10.9	89-98	
Gillikin et al. (2007)	Mercenaria mercenaria	seawater	field collected	$\delta^{13}C$	7.8–37.8	62.2–92.2	
Gillikin et al. (2009)	Pyganodon cataracta	freshwater	field collected	$\delta^{13}C$	18 ± 10 to 33 ± 10	67–88	
Hall et al. (2018)	genera <i>Lahillia</i> and <i>Cucullaea</i>	seawater	fossil	$\delta^{13}C$	0-10	90–100	
Poulain <i>et al</i> . (2010)	Ruditapes philippinarum	seawater	cultured	$\delta^{13}C$	12, 20–50, 12–21		The three metabolic carbon contribution values were calculated by using $\delta 13C$ of plankton, muscle, and digestive gland, respectively
Zhao et al. (2018)	Ruditapes philippinarum	seawater	cultured	$\delta^{13}C$	27 (control), 45 (acidified)	73 (control), 55 (acidified)	Non-acclimated experiment
				$\delta^{13}C$	27(control), 61 (acidified)	73 (control), 39 (acidified)	Transgenerationally acclimated experiment
Nishida <i>et al</i> . (submitted)	Scapharca broughtonii	seawater	cultured	$\delta^{13}C$	18–19 (control), 10–16 (acidified)	81–82 (control), 84–90 (acidified)	
				$\Delta^{14} C$	0 (control), 0–2 (acidified)	100 (control), 98–100 (acidified)	

表1. 貝類の石灰化における呼吸由来の溶存無機炭素(DIC)および海水のDICの寄与率(%).

ている. Δ^{14} Cと以下の式 (Adkins *et al.*, 2003) を基に, 貝殻や軟体部への海水由来の炭素源の寄与率 (R'_{DIC}) を 求めることが出来る.

 $\Delta^{14}C_{shell} = [R'_{DIC} \times \Delta^{14}C_{DIC} + (1 - R'_{DIC}) \times \Delta^{14}C_{plankton}]/100$ $\cdots (16)$ $\Delta^{14}C_{tissue} = [R'_{DIC} \times \Delta^{14}C_{DIC} + (1 - R'_{DIC}) \times \Delta^{14}C_{plankton}]/100$ $\cdots (17)$

また, 餌由来の炭素の寄与率 (R_{feed}) は以下の式で求め られる.

 $R_{feed} = 100 - R_{DIC} \cdots (18)$

表1にこれまで報告されている貝類の殻の炭素源推定 結果を示す.炭素源の寄与率は,種によって値が大きく 異なることが分かる.前述のとおり、 δ^{13} Cによる推定手 法の場合には δ^{13} C_Rによっても推定値が変わってしまう 恐れがあるので注意が必要である.また、 Δ^{14} Cにおいて は、海水の場合は Δ^{14} Cローカルリザーバーの効果や、陸 源溶存有機炭素 (DOC)、粒子状有機化合物 (POM)の 流入、堆積物に含まれる dead carbonの影響など、エン ドメンバーの Δ^{14} Cの特徴や変動を理解した上で、炭素源 推定をする必要がある.炭素源の寄与率の情報は古環境 復元の際に最適な種を探す際に重要な情報であり、例え ば、海水のDICの同位体変動を復元したい場合には代謝 の影響が小さい種を活用したほうがよい.また、このよ うな炭素源推定手法は、酸性化海水が石灰化にどの程度 寄与しているかを議論する際に非常に有効な指標となり うる. Nishida et al. (submitted) では、海洋酸性化影響 を検討する飼育実験系において、Δ¹⁴Cを活用した、貝殻・ 軟体部形成への炭素源の寄与率の新たな算出方法を提案 した.海洋酸性化実験では化石燃料起源の二酸化炭素ガ ス (dead carbon, Δ^{14} C) を用いているため, Δ^{14} C値が -1000‰の海水のDICと現在のΔ¹⁴C値をもつ餌(植物 プランクトン)という2つのエンドメンバーから, 殻の 炭素源を推定することが出来る.結果を表1に示すよう に、 δ^{13} Cによる見積もりの場合には、海水のDIC寄与率 がΔ¹⁴Cよりも10%程度低く見積もられることが分かった (Nishida *et al.*, submitted). $\delta^{13}C_R$ の問題に加え, 前述の ように海水のpHと殻のδ¹³Cに相関関係が認められた場 合などは速度論的同位体効果といった同位体効果の影響 が表れてしまうおそれがあるため、δ¹³Cによる炭素源推 定の際には注意を促したい. Δ¹⁴Cはこういった殻の同位 体分別効果を取り除き,より高精度な炭素源推定ができ ることが期待される.

安定同位体比分析技術の進展——同位体分析の 微量化と絶対水温指標の登場

この章では,最近20年間で進展した安定同位体質量 分析計を用いた分析技術として,(1)微量炭酸塩分析技 術,(2)炭酸凝集温度計(絶対水温計)について解説す る.いずれの技術も化石への応用はまだ始まったばかり であり,これからの応用研究が期待できる技術である.

同位体質量分析計 (IRMS)の高感度化・高精度化に より、より微量な炭酸塩試料が分析できるようになっ てきている. 例えば, 微量炭酸塩同位体分析システム MICAL 3cによる連続フロー型質量分析計 IsoPrime100 (Elementar社)(必要炭酸塩量0.2-500µg, Ishimura et al., 2004, 2008), キールデバイスオートサンプラー付き デュアルインレット型質量分析計(Thermo scientific社) (必要炭酸塩量: 6-130 µg, Radke et al., 2009) が挙げら れる. 従来は100-500 µg程度の炭酸塩試料が必要であっ たが、これらの分析機器ではその10から100分の1の重 量で分析が可能となった.このような微量分析技術が進 展することで、(1) 貝類やサンゴなどの炭酸塩試料では より高解像度に環境履歴を復元することができる,(2) 微化石試料において、1個体のみでの分析が可能となる、 (3) 同位体分析に用いるサンプル量を少なく抑えられる ため、微量元素や他の同位体指標解析も可能になる、な どのメリットが得られる.また,近年切削技術にも進展 がみられ、Dettman and Lohman (1993, 1995) により コンピュータ制御による顕微鏡と一体型のマイクロミリ ング技術が開発されたのを皮切りに、微小領域の高解像 度切削装置の普及が進んでいる(例えばNew Wave社 Merchantek MicroMill[®], Charlier et al., 2006; いずもウェ ブ社Geomill326, Sakai, 2009). 例えば, Geomill326装 置では,専用ソフトウェアで試料画像を見ながら座標を 指定し、1µm単位の空間分解能でミリングが可能となっ ている (Sakai, 2009). マイクロサンプリング技術につ いては,坂井(2015)に詳しい解説がある.このような サンプリング装置や分析技術の導入により, 貝殻 (Buick and Ivany, 2004; Schöne et al. 2004; Gillikin et al., 2005, 2007) や耳石 (Wurster et al., 1999; Amekawa et al., 2016; Sakamoto et al.; 2018) といった生物源炭酸塩の高解像度 切削による環境解析研究が進められている. なお, 微量 試料の同位体分析の際には,粒子レベルで均質な値を示 す同位体標準試料を補正に用いることが非常に重要であ る. 微小量の国際標準試料の δ^{13} C, δ^{18} O値の取り扱いの 際の注意点については、Ishimura et al. (2008), Nishida and Ishimura (2017) にて詳しく解説している.

次に、もう一つの注目すべき同位体分析技術として、炭酸凝集温度計を解説する. 炭酸凝集同位体 (Δ_{47} , clumped isotope) は、リン酸反応で発生した CO₂中の複置換同位 体種 (${}^{13}C^{18}O^{16}O$, ${}^{47}CO_2$)の存在度異常であり、以下の

式で求められる(単位は‰).

$$\Delta_{47} = \left[\left(\frac{\mathbf{R}^{47}}{\mathbf{R}^{*47}} - 1 \right) - \left(\frac{\mathbf{R}^{46}}{\mathbf{R}^{*46}} - 1 \right) - \left(\frac{\mathbf{R}^{45}}{\mathbf{R}^{*45}} - 1 \right) \right] \times 1000 \quad \cdots (19)$$

ただし、R⁴⁵⁻⁴⁷:45/44、46/44、47/44(⁴⁴CO₂に対する ⁴⁵⁻⁴⁷CO2の比)、R^{*44-47}:⁴⁴CO2に対する⁴⁵⁻⁴⁷CO2の理論的 存在度. Δ47の同位体分別は,水の同位体比に関係なく, 水温との関係式で一意に決まるため、炭酸凝集温度計は 絶対温度の推定手法として近年注目されている(Ghosh *et al.*, 2006a, 2006b; Eiler, 2011). △47分析により, これ まで海水のδ¹⁸Оが未知なために直接対比の難しかった, 異なる時代・海域・水深の化石・現生の生物源炭酸塩や 炭酸塩岩を用いた絶対温度推定が可能である. さらに, Δ47で復元した水温情報を基に、炭酸塩のδ¹⁸Oから海水 のδ¹⁸Oを計算することもできる.炭酸凝集温度計の同位 体補正方法の総説についてはBernasconi et al. (2018), その原理については狩野ほか(2014)の解説を参照され たい. ⁴⁷CO₂は⁴⁵⁻⁴⁶CO₂に比べて存在度が低いため,分析 には数mgから10mg程度の大量の炭酸塩を必要とする. 必要炭酸塩量の微量化が進められており、例えばデュア ルインレット法の新たな分析手法(LIDI法)の提案によ り、1-2mgの炭酸塩の分析が可能となり(Müller et al., 2017), 生物源炭酸塩に活用しやすい重量での分析が可能 になりつつある.また,同位体補正についても,バック グラウンド値の補正 (Pressure baseline correction, PBL) (Bernasconi *et al.*, 2013) や∆47値の補正用の炭酸塩標準 物質の提案 (Bernasconi et al., 2018), Δ_{47} 値への不純ガ ス(炭酸塩中に微量に含まれる炭化水素や硫黄など)の 影響を取り除くための Porapak カラムによる分離方法の提 案 (Ghosh et al., 2006b; Meckler et al., 2014) など, よ り高精度に分析値を得るためのノウハウが蓄積されつつ ある. Ghosh et al. (2006a) は,水温と炭酸塩のΔ47に負 の相関がみられることを示し、炭酸凝集温度計の有効性 を初めて報告した.現在,多くの生物源炭酸塩で炭酸凝 集温度計の検討が進められており(貝類:Henkes et al., 2013; Zhang et al., 2018, 腕足類: Henkes et al., 2013; Bajnai et al., 2018, 魚類の耳石: Ghosh et al., 2007, 深 海サンゴ: Thiagarajan et al., 2011, 有孔虫: Peral et al., 2018), 今後は化石試料のΔ47を活用した古海洋復元や生 物効果の評価研究が進展するであろう.

安定同位体比の情報を 古生物にどう活用していくか

これまで貝類の事例を重点的に取り上げながら,生物 源炭酸塩に関わる種々の同位体平衡・同位体非平衡反応 について解説した.では,どのように古生物試料の解析 に活用していけばよいだろうか.本章では,化石に応用 する上で注意すべき点や,今後期待される展開をいくつ か取り上げ, 解説する.

これまで述べてきたように, 生物源炭酸塩は同位体平 衡値からさまざまな要因により「ずれ」が生じることが 明らかになってきた.まずは、研究対象とする種がどの ような同位体効果を有するかよく理解した上で、対象と する化石の同位体比が(1)環境を強く反映するのか、代 謝の変化をよく反映するのか、それを(2)指標として 活用するときにどのような計算方法を用いればよいのか, に留意して同位体比を解釈することが重要である.(1) に関しては、殻のδ¹³Cから海水のDICの同位体変動を読 み取りたい場合には、殻のδ¹³Cへの海水DIC寄与率が 高い種や分類群を選ぶ必要がある. 例えば、貝類ではム ラサキイガイでは殻形成に海水DICが89~98%寄与し ているのに対し (Gillikin et al., 2006), アサリでは73% (Zhao et al., 2018), ホンビノスでは62~92% (Gillikin et al., 2007) と種によってその割合は異なる(表1). 殻 形成へ海水の寄与率が低く、呼吸由来の炭素源の寄与率 が高い種の場合、代謝由来の炭素との混合により、殻の δ¹³Cは実際の海洋の同位体変動よりも小さい変動を記録 し,一方で,種や環境による代謝活動の違い(代謝効果) δ^{13} Cから読み取ることができる可能性がある. Ishimura et al. (2012) では、同位体効果の種間の違いを評価す る手法として、同じ地点のコアから得られた生体および 遺骸の有孔虫を用いて、環境指標としての有効な種の評 価を行った.同じ環境(水温,海水の同位体比)を経験 しているため、その場の同位体平衡値からのずれを種ご とに検証することが出来る.この結果,より正確に古環 境推定を行うために、同位体平衡値からのずれが小さい 種, さらに, 同種内の同位体分散(同位体分別の個体 差)が小さい種を抽出することが重要であることを示し た (Ishimura et al. 2012). この手法はさまざまな生物分 類群での環境指標の評価に応用でき,石灰化プロセスの 種間差を理解する上でも欠かせない取り組みであろう.

(2) については、理想としては環境条件を一定にした 生物飼育実験,あるいは環境情報の分かっている野外試 料を解析することで、種ごとにδ¹⁸Oと水温の関係式を得 ることが望ましい. もちろん, 古生物の場合は検証の難 しい種も多いが、近縁の現生種、あるいは生物効果の検 証されている生物種の殻の同位体比とクロスチェックを しながら,適正な水温換算式を検討することが重要であ る.また、4.2章で触れたとおり、δ¹³Cによる推定は、反 応速度論的同位体効果や見積もりに用いるδ¹³C_R値によっ て誤差が生じる.このため,解析に用いる指標が他の要 素の影響を受けていないか、あるいは影響がある場合に 見積もりにどれだけの変化・誤差が生じるのかを検証し ていく必要がある. なお, 生態指標については, 生理・ 代謝・光合成強度など、それを評価するための生物学的 な情報と結びつけた報告例は限られており、今後、生物 学・農学分野と連携した研究が発展することに期待した

い.また,古水温の復元方法については,生物源炭酸塩の 微量元素 (Sr/Ca, Mg/Ca) や炭酸凝集温度計,ハプト藻 円石藻由来のアルケノン古水温計,古細菌由来のGDGT 古水温計 (TEX₈₆) など,さまざまな手法が提案されて いる.このような指標を組み合わせて活用していくこと で,例えば,炭酸塩殻の δ^{18} Oと Δ_{47} で得られた絶対水温 情報の組み合わせから海水の δ^{18} Oを復元するなど,新た な環境指標としての活用も可能になる.

貝類殻の同位体組成は,海洋酸性化による石灰化プロ セスの変化を記録している可能性がある. 4.2章で取り上 げたように、Δ¹⁴Cを活用することで、石灰化の場への海 水・呼吸由来の炭素源推定ができる. さらに δ^{13} Cと組み 合わせることで, pH変化に伴う反応速度論的同位体効果 やpHの恒常性維持に関わる酵素の影響など、酸性化耐性 を評価する上で重要な知見を得られる可能性がある.こ のような海洋酸性化の将来影響の評価研究は、生物が海 洋環境変動にどのように応答していくのかという、古生 物の適応進化や盛衰を理解するのにも重要な視点と言え る. 同様に、過去の海洋条件を水槽内で再現する実験古 生物学的アプローチにより,地質時代の環境変動が生物 の生理・代謝・発生・繁殖・生存などに及ぼした影響の 手がかりを得られる可能性があり、今後の古生物学的視 点を取り入れた生物飼育実験への取り組みが期待される. さらに、餌のプランクトンを化石燃料起源のCO₂ガス暴 露下で培養することで,現在の海水 (modern carbon) と エサ (dead carbon) というエンドメンバーを作成するこ とで,海洋酸性化だけでなく,水温や塩分など様々な環 境条件でΔ¹⁴Cによる殻の炭素源推定に応用することが可 能である.また,環境耐性の低い成長段階の殻形成を理 解する上で,幼少期の殻の化学組成は重要と思われるが, 発生初期の殻の同位体組成に関する報告はわずか1例の みとなっている (Waldbusser et al., 2013). Waldbusser et al. (2013) では、受精後2日目~19日目までのマガキ *Crassostrea gigas*幼生について, 殻のδ¹³Cが個体成長とと もに低い値に移行することを見出した.これは、代謝機 能の発達とともに、体内を循環する低いδ¹³C値を示す呼 吸由来のDICの寄与率が増加するためではないかと述べ ており、発生初期の高い海水DICの寄与率が環境変動へ の脆弱性の要因ではないかと指摘している. このような 発生段階の炭素の寄与率の変化を理解する上でも、Δ¹⁴C による炭素源推定は有効な手法であろう. 今後, このよ うな発生初期に着目し、殻の化学組成から現生および古 生物の生体内の石灰化機構の発達過程や環境への耐性評 価を行う研究に期待したい.

また,移動性の生物の殻では,どのようなことが分か るだろうか. Moriya *et al.* (2003)では,海洋表層に生 息する有孔虫や海底面に生息する貝類のδ¹⁸Oを活用する ことで,アンモナイト類の生息水深を推定する手法を提 案した.この手法は広く頭足類の同位体研究に応用され, 浮遊性・遊泳性、あるいは海底面付近に生息など、頭足 類の多様な生活史が明らかになってきている(詳しくは Moriya, 2015a, bを参照されたい). また, 現生・化石の 魚類耳石の同位体比からは、回遊履歴(Amekawa et al., 2016; Sakamoto et al., 2018) や生息水深の推定 (Shirai et al., 2018b), あるいは海水 - 汽水 - 河川の移動による 塩分環境(海水の同位体組成)の変化の推定(Kerr et al., 2007) が行われてきた. Sakamoto et al. (2018) では, 現在の海洋表層水温データ、塩分データ、海水のδ¹⁸Oか ら,数値シミュレーションによる詳細な回遊履歴の推定 を提案した. この新たな移動経路の推定手法を活用すれ ば,海洋観測情報を用いて,生物の水平方向,あるいは 深度方向の移動をシミュレーションすることが出来、こ れまでにない解像度での生物の移動履歴を調べることが できる. 例えば, 頭足類では, 深度方向の観測情報や海 水の同位体情報を組み合わせることで、深度方向の移動 履歴を抽出できる可能性がある. さまざまな生物の移動 生態は、古生態や適応進化を理解する上でも重要な情報 であり、同位体地球科学による貢献を大いに期待したい.

分析用試料をどのようにサンプリングするかは, 効率 的な試料採取や成長速度の影響といった同位体効果の軽 減のために検討すべき課題である.貝類の微細構造では, 水温の季節変動を反映して, 貝殻に占める微細構造の厚 み変化 (Nishida et al., 2012; 2015; Nishida and Sasaki, 2018; Trofimova et al., 2018) や結晶形態やサイズの変化 (Füllenbach et al., 2014; Milano et al., 2016) といった. 環境依存性を示す例が報告されている. 生物殻のもつ巨 視的・微視的な構造を活用することで季節や年齢などを 推定しながら効率的に試料採取ができ, さらには, 古環 境指標として活用できる可能性も秘めている.また,反 応速度論的同位体効果が強く現れる腕足類の場合は、殻 表面のどの部位,あるいは殻のどの殻層構造が環境復元 に最適か,様々な提案がなされている (Takayanagi et al., 2015, Brand et al., 2015). サンゴでは, 骨格成長速度の 遅い時期は,同位体平衡値に近づくものの,成長速度に 依存して骨格の同位体比が大きく変動してしまうため, 反応速度論的同位体効果による同位体分別が一定になる 骨格成長速度が5mm/年以上の骨格を用いることが望ま しい (McConnaughey, 1989a). このように, 同位体効果 が見られる場合には、採取を行う層構造や成長速度に留 意する必要がある.

また,地質時代を遡るほど,生物源炭酸塩の同位体比 は続成作用の問題に向き合わなければならない.例えば, 頭足類では,殻の化学組成と殻の真珠層の保存度の関係 から,化学分析に適切な保存状態の殻を選別するための 保存性の指標(Preservation Index, PI)が提案されてい る(Cochran *et al.*, 2010; Knoll *et al.*, 2016).また,生 物源炭酸塩では,微細構造観察に加えて,カソードルミ ネッセンス,殻の元素の含有量の分析により,続成作用

- 15 -

の影響の少ない殻の選別が行われている(詳しくは山本 ほか,2007を参照).これらの情報だけで変質の評価は 厳密には難しいが,判断基準としては現状として,これ らの手法が提案されている.

最後に,同位体比分析に用いる炭酸塩試料は,研究室 でも"変質"のリスクがあることに言及したい. IAEA-603 reference sheet (2016) によると、2016年に販売開始 した国際標準物質IAEA-603の製造の際には、大気と水と の同位体交換を避けるため, 試料を粉末ではなく粒子状 に製造し、さらにガラスアンプルに封入して保管するこ とに注意したと述べている.同じ大理石から製造された 粉末試料のIAEA-CO-1と粒子状のIAEA-603の同位体比 を比較した場合, IAEA-603に比べIAEA-CO-1はδ¹⁸O値 のばらつきが大きく,かつ,より低いδ¹⁸O値を示すこと が分かっている (Nishida and Ishimura, 2017). 特に多 湿な日本では水との同位体交換は留意すべき問題であり, 粉末として分析用試料を採取した場合はできるだけ早め に分析を行うこと、長期保管(1か月以上)をする場合 には、デシケーターでの試料管理、保管バイアル内をア ルゴンやヘリウム雰囲気にするなど、水との同位体交換 が最小限になるよう工夫することを推奨したい.

おわりに

本論では貝類の δ^{13} C, δ^{18} Oを規制する環境・代謝・バ イオミネラリゼーションという3つの要因について解説 した. 石灰化生物は多様な物理化学環境に生息し, 効率 的に石灰化するために分類群ごとに様々な工夫をしてお り、殻の化学組成からもこのような適応進化の痕跡が読 み取れる可能性を秘めている. バイオミネラリゼーショ ンの理解には様々な分類群や化学分析データを統合して 解釈することが不可欠であり、そのなかで、それぞれの 分類群の持つ石灰化機能の違いや進化学的な意義を見出 すことが出来る. 殻の化学組成や石灰化プロセスの解釈 を巡っては、石灰化に関わる酵素や殻タンパクなどの分 子生物学や生理学的研究, さらに, 軟体部の比較解剖学 的研究が不可欠であり、今後、これらを融合した研究が 進展することを期待したい.また,古生物の場合,古環 境復元への応用、古生態情報の抽出、環境変動への耐性 の評価など、種や分類群ごとの安定同位体比の持つ"個 性"を理解した上で様々な活用法を模索していくことが 重要である.

安定同位体比が古環境指標として活用されるように なってから、70年余り.現在では分析手法が確立し、古 生物学にとって身近な研究手法の一つとなっている.古 生物の生活していた環境を知りたい、古生物の進化と古 環境の関連を調べたい-安定同位体分析に興味を持った ら、恐れず、飛び込んでみてほしい.本稿がその一助に なれば幸いである.

謝辞

本稿の執筆にあたり,石村豊穂博士(茨城高専),佐 藤圭博士(早稲田大学),田近周博士(アメリカ自然 史博物館)より有益なコメントをいただき,株式会 社ELSSのAlex Forbes, Susan Duhonには英文校閲 をしていただいた.2名の匿名の査読者,黒柳あずみ 博士(東北大学)には,貴重なご意見・ご提案をいただ き,本稿は飛躍的に改善した.化石編集委員長の守屋和 佳博士(早稲田大学)には,本論を執筆する機会をいた だき,格別のご厚情を賜った.また,イラストレーター yassy氏には,図の作成にご協力いただいた.本研究の一 部は,日本学術振興会科学研究費17K14413,17J11417 の助成を受けて行われた.以上の方々,機関に厚くお礼 申し上げる.

文献

- Adkins, J. F., Boyle, E. A., Curry, W. B. and Lutringer, A., 2003. Stable isotopes in deep-sea corals and a new mechanism for "vital effects". *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **67**, 1129–1143.
- Aharon P., 1991. Recorders of reef environmental histories: stable isotopes in corals, giant clams, and calcareous algae. *Coral Reefs*, 10, 71–90.
- Aharon, P. and Chappell, J., 1983. Carbon and oxygen isotope probes of reef environment histories. *Perspectives on Coral Reefs*, 1–10.
- Amekawa, S., Kubota, K., Miyairi, Y., Seki, A., Kawakubo, Y., Sakai, S., Ajithprasad, P., Maemoku, H., Osada, T. and Yokoyama, Y., 2016. Fossil otoliths, from the Gulf of Kutch, western India, as a paleo-archive for the mid- to late-Holocene environment. *Quaternary International*, **397**, 281–288.
- Asami, R., Konishi, M., Tanaka, K., Uemura, R., Furukawa, M. and Shinjo R., 2015. Late Holocene coral reef environment recorded in Tridacnidae shells from archaeological sites in Okinawa-jima, subtropical southwestern Japan. *Island Arc*, 24, 61–72.
- Auclair, A. C., Joachimski, M. M. and Lécuyer, C., 2003. Deciphering kinetic, metabolic and environmental controls on stable isotope fractionations between seawater and the shell of *Terebratalia transversa* (Brachiopoda). *Chemical Geology*, **202**, 59–78.
- Bajnai, D., Fiebig, J., Tomašových, A., Garcia, S. M., Rollion-Bard, C., Raddatz, J., Löffler, N., Primo-Ramos, C. and Brand, U., 2018. Assessing kinetic fractionation in brachiopod calcite using clumped isotopes. *Scientific Reports*, 8, 1–12.
- Beck, W. C., Grossman, E. L. and Morse, J. W., 2005. Experimental studies of oxygen isotope fractionation in the carbonic acid system at 15, 25, and 40 °C. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 69, 3493–3503.
- Bernasconi, S. M., Hu, B., Wacker, U., Fiebig, J., Breitenbach, S. F. and Rutz, T., 2013. Background effects on Faraday collectors in gas-source mass spectrometry and implications for clumped isotope measurements. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 27, 603–612.
- Bernasconi, S. M., Müller, I. A., Bergmann, K. D., Breitenbach, S. F., Fernandez, A., Hodell, D. A., Jaggi, M., Nele, A., Meckler, I. Millan, M. and Ziegler, M., 2018. Reducing uncertainties in carbonate clumped isotope analysis through consistent carbonate-based standardization. *Geochemistry, Geophysics, Geosystems*, 19, 2895–2914.
- Bijma, J., Spero, H. J. and Lea, D. W, 1999. Reassessing foraminiferal

stable isotope geochemistry: Impact of the oceanic carbonate system (experimental results). *In* Fischer, G. and Wefer, G, *eds., Use of proxies in paleoceanography.* 489–512. Springer Berlin Heidelberg, Berlin.

- Brand, W. A., Coplen, T. B., Vogl, J., Rosner, M. and Prohaska, T., 2014. Assessment of international reference materials for isotope-ratio analysis (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 86, 425–467.
- Brand, U., Azmy, K., Griesshaber, E., Bitner, M. A., Logan, A., Zuschin, M., Ruggiero, E. and Colin, P. L., 2015. Carbon isotope composition in modern brachiopod calcite: A case of equilibrium with seawater? *Chemical Geology*, **411**, 81–96.
- Buick, D. P. and Ivany, L. C., 2004. 100 years in the dark: extreme longevity of Eocene bivalves from Antarctica. *Geology*, 32, 921–924.
- Charlier, B. L. A., Ginibre, C., Morgan, D., Nowell, G. M., Pearson, D. G., Davidson, J. P. and Ottley, C. J., 2006. Methods for the microsampling and high-precision analysis of strontium and rubidium isotopes at single crystal scale for petrological and geochronological applications. *Chemical Geology*, 232, 114–133.
- Chen, S., Gagnon, A. C. and Adkins, J. F., 2018. Carbonic anhydrase, coral calcification and a new model of stable isotope vital effects. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 236, 179–197.
- Cochran, J. K., Kallenberg, K., Landman, N. H., Harries, P. J., Weinreb, D., Turekian, K. K., Beck, A. J. and Cobban, W. A., 2010. Effect of diagenesis on the Sr, O, and C isotope composition of late Cretaceous mollusks from the Western Interior Seaway of North America. *American Journal of Science*, **310**, 69–88.
- Cohen, A. L. and McConnaughey, T. A., 2003. Geochemical perspectives on coral mineralization. *Biomineralization*, 54, 151–187.
- Coplen, T. B, 2011. Guidelines and recommended terms for expression of stable-isotope-ratio and gas-ratio measurement results. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **25**, 2538–2560.
- Courtney, T. and Ries, J. B., 2015. Impact of atmospheric pCO₂, seawater temperature, and calcification rate on the δ^{18} O and δ^{13} C composition of echinoid calcite (*Echinometra viridis*). *Chemical Geology*, **411**, 228-239.
- Crenshaw, M. A., 1972. The inorganic composition of molluscan extrapallial fluid. *Biological Bulletin*, 143, 506–512.
- Dettman, D. L. and Lohmann, K. C., 1993. Seasonal change in Paleogene surface water δ^{18} O: Fresh-water bivalves of western North America. *In* Swart, P.K., Lohmann, K. C., Mckenzie, J., Savin, S., eds., Climate Change in Continental Isotopic Records, **78**, AGU Monograph, 153–163
- Dettman, D. L., and Lohmann, K. C., 1995. Microsampling carbonates for stable isotope and minor element analysis: Physical separation of samples on a 20 micrometer scale. *Journal of Sedimentary Research*, 65, 566–569.
- Eiler, J. M., 2011. Paleoclimate reconstruction using carbonate clumped isotope thermometry. *Quaternary Science Reviews*, 30, 3575–3588.
- Fabry, V. J., Seibel, B. A., Feely, R. A. and Orr, J. C., 2008. Impacts of ocean acidification on marine fauna and ecosystem processes. *ICES Journal of Marine Science*, 65, 414–432.
- Friedman, I., O'Neil, J. R. and Cebula, G., 1982. Two new carbonate stable – isotope standards. *Geostandards and Geoanalytical Research*, 6, 11–12.
- Füllenbach, C. S., Schöne, B. R. and Branscheid, R., 2014. Microstructures in shells of the freshwater gastropod *Viviparus viviparus*: a potential sensor for temperature change? Acta Biomaterialia, 10, 3911–3921.
- Gazeau, F., Parker, L. M., Comeau, S., Gattuso, J. P., O'Connor, W. A., Martin, S., Pörtner, H. and Ross, P. M., 2013. Impacts of ocean acidification on marine shelled molluscs. *Marine Biology*,

160, 2207-2245.

- Gillikin, D. P., Lorrain, A., Navez, J., Taylor, J. W., André, L., Keppens, E., Beyens, W. and Dehairs, F., 2005. Strong biological controls on Sr/Ca ratios in aragonitic marine bivalve shells. *Geochemistry, Geophysics, Geosystems*, 6, 1–16.
- Gillikin, D. P., Lorrain, A., Bouillon, S., Willenz, P. and Dehairs, F., 2006. Stable carbon isotopic composition of Mytilus edulis shells: relation to metabolism, salinity, δ¹³C_{DIC} and phytoplankton. *Organic Geochemistry*, **37**, 1371–1382.
- Gillikin, D. P., Lorrain, A., Meng, L. and Dehairs, F., 2007. A large metabolic carbon contribution to the δ^{13} C record in marine aragonitic bivalve shells. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **71**, 2936–2946.
- Gillikin, D. P., Hutchinson, K. A. and Kumai, Y., 2009. Ontogenic increase of metabolic carbon in freshwater mussel shells (*Pyganodon cataracta*). Journal of Geophysical Research: Biogeosciences, 114, G01007.
- Ghosh, P., Adkins, J., Affek, H., Balta, B., Guo, W. F., Schauble, E. A., Schrag, D. and Eiler, J. M., 2006a. ¹³C-¹⁸O bonds in carbonate minerals: A new kind of paleothermometer. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **70**, 1439–1456.
- Ghosh, P., Garzione, C. N. and Eiler, J. M., 2006b. Rapid uplift of the Altiplano revealed through ¹³C-¹⁸O bonds in paleosol carbonates. *Science*, **311**, 511–515.
- Ghosh, P., Eiler, J., Campana, S. E., and Feeney, R. F., 2007. Calibration of the carbonate 'clumped isotope' paleothermometer for otoliths. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **71**, 2736–2744.
- Grossman, E. L. and Ku, T. L., 1986. Oxygen and carbon isotope fractionation in biogenic aragonite: temperature effects. *Chemical Geology*, 59, 59–74.
- Hall, J. L., Newton, R. J., Witts, J. D., Francis, J. E., Hunter, S. J., Jamieson, R. A., Harper, M. H., Crame J. A. and Haywood, A. M., 2018. High benthic methane flux in low sulfate oceans: Evidence from carbon isotopes in Late Cretaceous Antarctic bivalves. *Earth and Planetary Science Letters*, **497**, 113–122.
- Heinemann, A., Fietzke, J., Melzner, F., Böhm, F., Thomsen, J., Garbe-Schönberg, D. and Eisenhauer, A., 2012. Conditions of *Mytilus edulis* extracellular body fluids and shell composition in a pH-treatment experiment: Acid-base status, trace elements and δ^{11} B. *Geochemistry, Geophysics, Geosystems*, **13**, Q01005.
- Henkes, G. A., Passey, B. H., Wanamaker Jr, A. D., Grossman, E. L., Ambrose Jr, W. G. and Carroll, M. L., 2013. Carbonate clumped isotope compositions of modern marine mollusk and brachiopod shells. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **106**, 307–325.
- Hirabayashi, S., Yokoyama, Y., Suzuki, A., Kawakubo, Y., Miyairi, Y., Okai, T. and Nojima, S., 2013. Coral growth-rate insensitive Sr/Ca as a robust temperature recorder at the extreme latitudinal limits of *Porites. Geochemical Journal*, **47**, e1–e5.
- Hoefs, J., 2018. In Stable Isotope Geochemistry, 8th edition, 1–437. Springer International Publishing AG, Cham, Switzerland.
- Hönisch, B., Ridgwell, A., Schmidt, D. N., Thomas, E., Gibbs, S. J., Sluijs, A., Zeebe, R., Kump, L., Martindale, R. C., Greene, S. E., Kiessling, W., Ries, J., Zachos, J. C., Royer, D. L., Barker, S., Marchitto Jr., T. M., Moyer, R., Pelejero, C., Ziveri, P., Foster, G. L. and Williams, B., 2012. The geological record of ocean acidification. *Science*, 335, 1058–1063.
- Hori, M., Sano, Y., Ishida, A., Takahata, N., Shirai, K. and Watanabe, T., 2015. Middle Holocene daily light cycle reconstructed from the strontium/calcium ratios of a fossil giant clam shell. *Scientific Reports*, 5, 8734.
- Horikawa, K., Kodaira, T., Zhang, J. and Murayama, M., 2015. $\delta^{18}O_{sw}$ estimate for *Globigerinoides ruber* from core-top sediments in the East China Sea. *Progress in Earth and Planetary Science*, 2, 1–19.
- Immel, F., Gaspard, D., Marie, A., Guichard, N., Cusack, M. and Marin, F., 2015. Shell proteome of rhynchonelliform brachiopods.

Journal of Structural Biology, 190, 360-366.

- IAEA-603 Reference sheet. IAEA, Vienna, 2016; 7pp. available for download at https://nucleus.iaea.org/rpst/ReferenceProducts/ ReferenceMaterials/Stable_Isotopes/13C18and7Li/IAEA-603/ RM603_Reference_Sheet_2016-08-16.pdf Accessed March 20, 2019.
- Ip, Y. K., Loong, A. M., Kiong, K. C., Wong, W. P., Chew, S. F., Reddy, K., Sivalonganathan, B. and Ballantyne, J. S., 2006. Light induces an increase in the pH of and a decrease in the ammonia concentration in the extrapallial fluid of the giant clam *Tridacna* squamosa. Physiological and Biochemical Zoology, **79**, 656–664.
- Ishikawa, N.F., Hyodo, F. and Tayasu, I., 2013. Use of carbon-13 and carbon-14 natural abundances for stream food web studies. *Ecological Research*, **28**, 759–769.
- 石川尚人,2014.河川食物網解析における同位体天然存在比の利 用:放射性炭素14を中心とした研究のレビューと展望(〈特集1〉 境界で起こるプロセスに注目して河川生態系を理解する).日本 生態学会誌,64,133-142.
- Ishimura T., Tsunogai U. and Gamo T., 2004. Stable carbon and oxygen isotopic determination of sub-microgram quantities of CaCO₃ to analyze individual foraminiferal shells. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 18, 2883–2888.
- Ishimura T., Tsunogai U. and Nakagawa F., 2008. Grain-scale heterogeneities in the stable carbon and oxygen isotopic compositions of the international standard calcite materials (NBS 19, NBS 18, IAEA-CO-1, and IAEA-CO-8). *Rapid Communications* in Mass Spectrometry, 22, 1925–1932.
- Ishimura T, Tsunogai U, Hasegawa S, Nakagawa, F., Oi., T., Kitazato, H., Suga, H. and Toyofuku, T., 2012. Variation in stable carbon and oxygen isotopes of individual benthic foraminifera: tracers for quantifying the magnitude of isotopic disequilibrium. *Biogeosciences*, 9, 4353–4367.
- Isowa, Y., Sarashina, I., Oshima, K., Kito, K., Hattori, M. and Endo, K., 2015. Proteome analysis of shell matrix proteins in the brachiopod *Laqueus rubellus*. *Proteome science*, **13**, 1–10.
- Johnson, K.S., 1982. Carbon dioxide hydration and dehydration kinetics in seawater. *Limnology and Oceanography*, 27, 849–855.
- Jones, D. S., Williams, D. F. and Romanek, C. S., 1986. Life history of symbiont-bearing giant clams from stable isotope profiles. *Science*, 231, 46-48.
- 狩野彰宏,森 大器,柳川勝紀,2014. 炭酸凝集同位体温度計の 原理と実態. 九州大学『地球社会統合科学』,21,83-92.
- Juillet-Leclerc, A., Gattuso, J. P., Montaggioni, L. F. and Pichon, M., 1997. Seasonal variation of primary productivity and skeletal delta¹³C and delta¹⁸O in the zooxanthellate scleractinian coral *Acropora formosa. Marine Ecology Progress Series*, **157**, 109–117.
- Kawahata, H., Fujita, K., Iguchi, A., Inoue, M., Iwasaki, S., Kuroyanagi, A., Maeda, A., Manaka, T., Moriya, K., Takagi, H., Toyofuku, T., Yoshimura., T. and Suzuki, A., 2019. Perspective on the response of marine calcifiers to global warming and ocean acidification—Behavior of corals and foraminifera in a high CO₂ world "hot house". *Progress in Earth and Planetary Science*, 6, 1–37.
- Kerr, L. A., Secor, D. H. and Kraus, R. T., 2007. Stable isotope (δ^{13} C and δ^{18} O) and Sr/Ca composition of otoliths as proxies for environmental salinity experienced by an estuarine fish. *Marine Ecology Progress Series*, **349**, 245–253.
- Kitagawa, T., Ishimura, T., Uozato, R., Shirai, K., Amano, Y., Shinoda, A., Otake, T., Tsunogai, U. and Kimura, S., 2013. Otolith δ¹⁸O of Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* as an indicator of ambient water temperature. *Marine Ecology Progress Series*, **481**, 199–209.
- 北村晃寿,2018.海生二枚貝類の貝殻を用いた成長線解析・酸素 同位体比分析――完新世環境変動の高分解能解析――.第四紀研 究,57,19–29.
- Kim, S. T. and O'Neil, J. R., 1997. Equilibrium and nonequilibrium

oxygen isotope effects in synthetic carbonates. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **61**, 3461–3475.

- Kim, S. T., Mucci, A., and Taylor, B. E., 2007a. Phosphoric acid fractionation factors for calcite and aragonite between 25 and 75 C: revisited. *Chemical Geology*, **246**, 135–146.
- Kim, S. T., O'Neil, J. R., Hillaire-Marcel, C. and Mucci, A., 2007b. Oxygen isotope fractionation between synthetic aragonite and water: Influence of temperature and Mg²⁺ concentration. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **71**, 4704–4715.
- Kim, S. T., Coplen, T. B. and Horita, J., 2015. Normalization of stable isotope data for carbonate minerals: Implementation of IUPAC guidelines. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **158**, 276–289.
- Klein, R. T., Lohmann, K. C. and Thayer, C. W., 1996. Sr/Ca and ¹³C/¹²C ratios in skeletal calcite of Mytilus *trossulus*: Covariation with metabolic rate, salinity, and carbon isotopic composition of seawater. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **60**, 4207–4221.
- Knoll, K., Landman, N. H., Cochran, J. K., Macleod, K. G. and Sessa, J. A., 2016. Microstructural preservation and the effects of diagenesis on the carbon and oxygen isotope composition of Late Cretaceous aragonitic mollusks from the Gulf Coastal Plain and the Western Interior Seaway. *American Journal of Science*, 316, 591–613.
- 小平智弘,堀川恵司,張 勁,千手智晴,2016.日本海対馬暖流 域における海水の酸素同位体比と塩分の関係.地球化学,50, 263-277.
- Krief, S., Hendy, E. J., Fine, M., Yam, R., Meibom, A., Foster, G. L. and Shemesh, A., 2010. Physiological and isotopic responses of scleractinian corals to ocean acidification. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 74, 4988–5001.
- Kubota, K., Shirai, K., Murakami-Sugihara, N., Seike, K., Hori, M. and Tanabe, K., 2017. Annual shell growth pattern of the Stimpson's hard clam *Mercenaria stimpsoni* as revealed by sclerochronological and oxygen stable isotope measurements. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 465, 307–315.
- Lécuyer, C., Reynard, B. and Martineau, F., 2004. Stable isotope fractionation between mollusc shells and marine waters from Martinique Island. *Chemical Geology*, **213**, 293–305.
- Leder, J. J., Swart, P. K., Szmant, A. M. and Dodge, R. E., 1996. The origin of variations in the isotopic record of scleractinian corals: I. Oxygen. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **60**, 2857–2870.
- Le Grande, A. N. and Schmidt, G. A., 2006. Global gridded data set of the oxygen isotopic composition in seawater. *Geophysical Research Letters*, **33**, L12604
- Le Roy, N., Jackson, D. J., Marie, B., Ramos-Silva, P. and Marin, F., 2014. The evolution of metazoan α -carbonic anhydrases and their roles in calcium carbonate biomineralization. *Frontiers in Zoology*, **11**, 75.
- Lorrain, A., Paulet, Y. M., Chauvaud, L., Dunbar, R., Mucciarone, D. and Fontugne, M., 2004. δ^{13} C variation in scallop shells: increasing metabolic carbon contribution with body size? *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **68**, 3509–3519.
- McCulloch, M., Falter, J., Trotter, J., and Montagna, P., 2012. Coral resilience to ocean acidification and global warming through pH up-regulation. *Nature Climate Change*, **2**, 623–627.
- McConnaughey, T., 1989a. ¹³C and ¹⁸O isotopic disequilibrium in biological carbonates: I. Patterns. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **53**, 151–162.
- McConnaughey, T., 1989b. ¹³C and ¹⁸O isotopic disequilibrium in biological carbonates: II. In vitro simulation of kinetic isotope effects. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **53**, 163–171.
- McConnaughey, T. A., Burdett, J., Whelan, J. F. and Paull, C. K., 1997. Carbon isotopes in biological carbonates: respiration and photosynthesis. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **61**, 611–622.
- McConnaughey, T. A., 2003. Sub-equilibrium oxygen-18 and carbon-13 levels in biological carbonates: carbonate and kinetic

models. Coral Reefs, 22, 316-327.

- McConnaughey, T. A. and Gillikin, D. P., 2008. Carbon isotopes in mollusk shell carbonates. *Geo-Marine Letters*, 28, 287–299.
- McCrea, J. M., 1950. On the isotopic chemistry of carbonates and a paleotemperature scale. *The Journal of Chemical Physics*, **18**, 849–857.
- Meckler, A. N., Ziegler, M., Millán, M. I., Breitenbach, S. F. and Bernasconi, S. M., 2014. Long-term performance of the Kiel carbonate device with a new correction scheme for clumped isotope measurements. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 28, 1705–1715.
- Milano, S., Schöne, B. R. and Witbaard, R., 2017. Changes of shell microstructural characteristics of Cerastoderma edule (Bivalvia)—A novel proxy for water temperature. *Palaeogeography*, *Palaeoclimatology*, *Palaeoecology*, 465, 395–406.
- Moriya, K., Nishi, H., Kawahata, H., Tanabe, K. and Takayanagi, Y., 2003. Demersal habitat of Late Cretaceous ammonoids: Evidence from oxygen isotopes for the Campanian (Late Cretaceous) northwestern Pacific thermal structure. *Geology*, **31**, 167–170.
- Moriya, K., 2011. Development of the Cretaceous greenhouse climate and the oceanic thermal structure. *Paleontological Research*, 15, 77–89.
- Moriya, K., 2015a. Evolution of habitat depth in the Jurassic– Cretaceous ammonoids. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 112, 15540–15541.
- Moriya, K., 2015b. Isotope signature of ammonoid shells. In Klug, C., Korn, D., De Baets, K., Kruta, I., Mapes, R. H., eds., Ammonoid paleobiology: From anatomy to ecology, 793-836. Springer, Dordrecht.
- 守屋和佳, 2017. 温室時代における海洋表層環境. 化石, 102, 31-42.
- Müller, I. A., Fernandez, A., Radke, J., Van Dijk, J., Bowen, D., Schwieters, J. and Bernasconi, S. M., 2017. Carbonate clumped isotope analyses with the long-integration dual-inlet (LIDI) workflow: scratching at the lower sample weight boundaries. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **31**, 1057–1066.
- Nishida, K., Ishimura, T., Suzuki, A. and Sasaki, T., 2012. Seasonal changes in the shell microstructure of the bloody clam, *Scapharca broughtonii* (Mollusca: Bivalvia: Arcidae). *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, **363**, 99–108.
- Nishida, K., Ishikawa, K., Iguchi, A., Tanaka, Y., Sato, M., Inoue, M., Nakamura, T., Sakai, K. and Suzuki, A., 2014a. Skeletal oxygen and carbon isotope compositions of *Acropora* coral primary polyps experimentally cultured at different temperatures. *Geochemistry*, *Geophysics, Geosystems*, 15, 2840–2849.
- Nishida, K., Iguchi, A., Ishimura, T., Sakai, K. and Suzuki, A., 2014b. Skeletal isotopic responses of the Scleractinian coral *Isopora palifera* to experimentally controlled water temperatures. *Geochemical Journal*, **48**, e9–e14.
- Nishida, K., Suzuki, A., Isono, R., Hayashi, M., Watanabe, Y., Yamamoto, Y., Nojiri, Y., Mori, C., Sato, M., Sato, K. and Sasaki, T., 2015. Thermal dependency of shell growth, microstructure, and stable isotopes in laboratory-reared *Scapharca broughtonii* (Mollusca: Bivalvia). *Geochemistry, Geophysics, Geosystems*, 16, 2395–2408.
- Nishida, K. and Ishimura, T., 2017. Grain-scale stable carbon and oxygen isotopic variations of the international reference calcite, IAEA-603. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **31**, 1875–1880.
- Nishida, K., Hayashi, M., Yamamoto, Y., Irie, T, Watanabe, Y., Kishida, C., Nojiri, Y., Sato, M., Ishimura, T. and Suzuki, A., 2018. Isotopic responses of bivalve shells (*Scapharca broughtonii*) to CO₂-driven seawater acidification. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 235, 246–261.
- Nishida, K., and Sasaki, T., 2018. Geographical and Seasonal

Variations of the Shell Microstructures in the Bivalve *Scapharca* broughtonii. In Biomineralization (177–186). Springer, Singapore.

- Nishida, K., Chew Y.C., Miyairi Y., Hirabayashi, S., Suzuki A., Hayashi, M., Yamamoto, Y., Sato, M., Nojiri, Y. and Yokoyama, Y., (submitted). Novel reverse radioisotope labelling experiment reveals carbon assimilation of marine calcifiers under ocean acidification conditions. *Methods in Ecology and Evolution*.
- Oba, T., 1990. Paleoceanographic information obtained by the isotopic measurement of individual foraminiferal specimens. *Asian Marine Geology*, 168–180.
- Ohno, Y., Iguchi, A., Shinzato, C., Inoue, M., Suzuki, A., Sakai, K. and Nakamura, T., 2017. An aposymbiotic primary coral polyp counteracts acidification by active pH regulation. *Scientific Reports*, 7, 40324.
- Orr, J. C., Fabry, V. J., Aumont, O., Bopp, L., Doney, S. C., Feely, R. A., Gnanadesikan, A., Gruber, N., Ishida, A., Joos, F., Key, R. M., Lindsay, K., Maier-Reimer, E., Matear, R., Monfray, P., Mouchet, A., Najjjar, R. G., Plattner, K., Rodgers, K. B., Sabine, C. L., Sarmiento, J. L., Schlitzer, R., Slater, R. D., Totterdell, L. J., Weirig, M., Yamanaka, Y. and Yool, A., 2005. Anthropogenic ocean acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms. *Nature*, **437**, 681–686.
- Owen, E. F., Wanamaker Jr, A. D., Feindel, S. C., Schöne, B. R. and Rawson, P. D., 2008. Stable carbon and oxygen isotope fractionation in bivalve (*Placopecten magellanicus*) larval aragonite. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **72**, 4687–4698.
- Paneth, P. and O'Leary, M. H., 1985. Carbon isotope effect on dehydration of bicarbonate ion catalyzed by carbonic anhydrase. *Biochemistry*, 24, 5143–5147.
- Peral, M., Daëron, M., Blamart, D., Bassinot, F., Dewilde, F., Smialkowski, N., Isguder, G., Bonnin, J., Jorissen, F., Kissel, C., Michel, E., Vázquez, N., Riveiros, N. V. and Waelbroeck, C., 2018. Updated calibration of the clumped isotope thermometer in planktonic and benthic foraminifera. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 239, 1–16.
- Pörtner, H. O., Langenbuch, M. and Reipschläger, A., 2004. Biological impact of elevated ocean CO₂ concentrations: lessons from animal physiology and earth history. *Journal of Oceanography*, 60, 705–718.
- Patterson, W. P., Smith, G. R. and Lohmann, K. C., 1993. Continental paleothermometry and seasonality using the isotopic composition of aragonitic otoliths of freshwater fishes. *Climate change in continental isotopic records*, 78, 191-202.
- Poulain, C., Lorrain, A., Mas, R., Gillikin, D. P., Dehairs, F., Robert, R. and Paulet, Y. M., 2010. Experimental shift of diet and DIC stable carbon isotopes: Influence on shell δ^{13} C values in the Manila clam *Ruditapes philippinarum. Chemical Geology*, **272**, 75–82.
- Radtke, R. L., Lenz, P., Showers, W. and Moksness, E., 1996. Environmental information stored in otoliths: insights from stable isotopes. *Marine Biology*, **127**, 161–170.
- Rae, J. W., Foster, G. L., Schmidt, D. N., and Elliott, T., 2011. Boron isotopes and B/Ca in benthic foraminifera: Proxies for the deep ocean carbonate system. *Earth and Planetary Science Letters*, 302, 403–413.
- Rollion-Bard, C., Chaussidon, M. and France-Lanord, C., 2003. pH control on oxygen isotopic composition of symbiotic corals. *Earth Planetary Science Letters*, **215**, 275–288.
- Rollion-Bard, C., Chaussidon, M. and France-Lanord, C., 2011.
 Biological control of internal pH in scleractinian corals:
 Implications on paleo-pH and paleo-temperature reconstructions.
 Comptes Rendus Geoscience, 343, 397–405.
- Romanek, C. S., Jones, D. S., Williams, D. F., Krantz, D. E. and Radtke, R., 1987. Stable isotopic investigation of physiological and environmental changes recorded in shell carbonate from the giant clam *Tridacna maxima*. *Marine Biology*, **94**, 385–393.

- Romanek, C. S. and Grossman, E. L., 1989. Stable isotope profiles of *Tridacna maxima* as environmental indicators. *Palaios*, 4, 402–413.
- Romanek, C. S., Grossman, E. L. and Morse, J. W., 1992. Carbon isotopic fractionation in synthetic aragonite and calcite: effects of temperature and precipitation rate. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 56, 419–430.
- Sade, Z., and Halevy, I. 2017. New constraints on kinetic isotope effects during CO₂ (aq) hydration and hydroxylation: Revisiting theoretical and experimental data. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 214, 246–265.
- Sakai, S., 2009. Micromilling and sample recovering techniques using high-precision micromill "GEOMILL326". JAMSTEC-Reports, 35–38.
- 坂井三郎, 2015. 地球化学におけるマイクロサンプリング技術の 進歩. 地球化学, **49**, 99–110.
- Sakamoto, T., Komatsu, K., Yoneda, M., Ishimura, T., Higuchi, T., Shirai, K., Kamimura, Y., Watanabe, C. and Kawabata, A., 2017. Temperature dependence of δ^{18} O in otolith of juvenile Japanese sardine: Laboratory rearing experiment with micro-scale analysis. *Fisheries Research*, **194**, 55–59.
- Sakamoto, T., Komatsu, K., Shirai, K., Higuchi, T., Ishimura, T., Setou, T., Kamimura, Y., Watanabe, C. and Kawabata, A., 2018. Combining microvolume isotope analysis and numerical simulation to reproduce fish migration history. *Methods in Ecology and Evolution*, **10**, 1–11.
- Sano, Y., Kobayashi, S., Shirai, K., Takahata, N., Matsumoto, K., Watanabe, T., Sowa, K. and Iwai, K., 2012. Past daily light cycle recorded in the strontium/calcium ratios of giant clam shells. *Nature Communications*, 3, 761.
- Schöne, B. R., Castro, A. D. F., Fiebig, J., Houk, S. D., Oschmann, W. and Kröncke, I., 2004. Sea surface water temperatures over the period 1884–1983 reconstructed from oxygen isotope ratios of a bivalve mollusk shell (*Arctica islandica*, southern North Sea). *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, **212**, 215–232.
- Sharma, T. and Clayton, R. N., 1965. Measurement of O¹⁸O¹⁶ ratios of total oxygen of carbonates. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 29, 1347–1353.
- Shirai, K., Kubota, K., Murakami-Sugihara, N., Seike, K., Hakozaki, M. and Tanabe, K., 2018a. Stimpson's hard clam *Mercenaria stimpsoni*; A multi-decadal climate recorder for the northwest Pacific coast. *Marine Environmental Research*, **133**, 49–56.
- Shirai, K., Otake, T., Amano, Y., Kuroki, M., Ushikubo, T., Kita, N. T., Murayama, M., Tsukamoto, K. and Valley, J. W., 2018b. Temperature and depth distribution of Japanese eel eggs estimated using otolith oxygen stable isotopes. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 236, 373–383.
- Spalding, C., Finnegan, S. and Fischer, W.W., 2017. Energetic costs of calcification under ocean acidification. *Global Biogeochemical Cycles*, **31**, 866–877.
- Spero, H. J., Bijma, J., Lea, D. W. and Bemis, B. E., 1997. Effect of seawater carbonate concentration on foraminiferal carbon and oxygen isotopes. *Nature*, **390**, 497–500.
- Spero, H. J. and DeNiro, M. J., 1987. The influence of symbiont photosynthesis on the δ^{18} O and δ^{13} C values of planktonic foraminiferal shell calcite. *Symbiosis*, 4, 213–228.
- Stuiver, M. and Polach, H. A., 1977. Discussion reporting of ¹⁴C data. *Radiocarbon*, **19**, 355–363.
- Takagi, H., Moriya, K., Ishimura, T., Suzuki, A., Kawahata, H. and Hirano, H., 2015. Exploring photosymbiotic ecology of planktic foraminifers from chamber-by-chamber isotopic history of individual foraminifers. *Paleobiology*, **41**, 108–121.
- Takagi, H., Moriya, K., Ishimura, T., Suzuki, A., Kawahata, H. and Hirano, H., 2016. Individual migration pathways of modern planktic foraminifers: Chamber-by-chamber assessment of stable isotopes. *Paleontological Research*, 20, 268–285.

- Takayanagi, H., Asami, R., Abe, O., Kitagawa, H., Miyajima, T. and Iryu, Y., 2012. Carbon-and oxygen-isotope compositions of a modern deep-water brachiopod *Campagea japonica* collected off Aguni-jima, Central Ryukyu Islands, southwestern Japan. *Geochemical Journal*, 46, 77–87.
- Takayanagi, H., Asami, R., Otake, T., Abe, O., Miyajima, T., Kitagawa, H. and Iryu, Y., 2015. Quantitative analysis of intraspecific variations in the carbon and oxygen isotope compositions of the modern cool-temperate brachiopod *Terebratulina crossei*. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **170**, 301–320.
- Tanaka, N., Monaghan, M. C. and Rye, D. M., 1986. Contribution of metabolic carbon to mollusc and barnacle shell carbonate. *Nature*, 320, 520–523.
- Tanaka, Y., Iguchi, A., Nishida, K., Inoue, M., Nakamura, T., Suzuki, A. and Sakai, K., 2014. Nutrient availability affects the response of juvenile corals and the symbiotic algae to ocean acidification. *Limnology and Oceanography*, **59**, 1468–1476,
- Thiagarajan, N., Adkins, J. and Eiler, J., 2011. Carbonate clumped isotope thermometry of deep-sea corals and implications for vital effects. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **75**, 4416–4425.
- Thorrold, S. R., Campana, S. E., Jones, C. M. and Swart, P. K., 1997. Factors determining δ^{13} C and δ^{18} O fractionation in aragonitic otoliths of marine fish. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **61**, 2909–919.
- Trofimova, T., Milano, S., Andersson, C., Bonitz, F. G. and Schöne, B. R, 2018. Oxygen isotope composition of *Arctica islandica* aragonite in the context of shell architectural organization: Implications for paleoclimate reconstructions. *Geochemistry, Geophysics, Geosystems*, 19, 453–470.
- Uchikawa, J. and Zeebe, R.E., 2012. The effect of carbonic anhydrase on the kinetics and equilibrium of the oxygen isotope exchange in the CO_2 –H₂O system: Implications for δ^{18} O vital effects in biogenic carbonates. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **95**, 15–34.
- Urey, H. C., 1947. The thermodynamic properties of isotopic substances. Journal of the Chemical Society (Resumed), 562–581.
- Urey, H. C., Lowenstam, H. A., Epstein, S. and McKinney, C. R., 1951. Measurement of paleotemperatures and temperatures of the Upper Cretaceous of England, Denmark, and the southeastern United States. *Geological Society of America Bulletin*, **62**, 399–416.
- Usdowski, E., Michaelis, J., Bottcher, M. E. and Hoefs, J., 1991. Factors for the oxygen isotope equilibrium fractionation between aqueous and gaseous CO₂, carbonic-acid, bicarbonate, carbonate, and water (19-degrees-C). *Zeitschrift Fur Physikalische Chemie-International Journal of Research in Physical Chemistry & Chemical Physics*, **170**, 237–249.
- Usdowski, E. and Hoefs, J., 1993. Oxygen isotope exchange between carbonic acid, bicarbonate, carbonate, and water: a re-examination of the data of McCrea (1950) and an expression for the overall partitioning of oxygen isotopes between the carbonate species and water. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **57**, 3815–3818.
- Waldbusser, G. G., Brunner, E. L., Haley B. A., Hales, B., Langdon, C. J. and Prahl, F. G., 2013. A developmental and energetic basis linking larval oyster shell formation to acidification sensitivity. *Geophysical Research Letters*, 40, 2171–2176.
- Watanabe, T. and Oba, T., 1999. Daily reconstruction of water temperature from oxygen isotopic ratios of a modern *Tridacna* shell using a freezing microtome sampling technique. *Journal of Geophysical Research*, **104**, 667–620.
- Watanabe, T., Suzuki, A., Kawahata, H., Kan, H. and Ogawa, S., 2004. A 60-year isotopic record from a mid-Holocene fossil giant clam (*Tridacna gigas*) in the Ryukyu Islands: physiological and

paleoclimatic implications. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, **212**, 343–354.

- Watkins, J. M., Nielsen, L. C., Ryerson, F. J., and DePaolo, D. J., 2013. The influence of kinetics on the oxygen isotope composition of calcium carbonate. *Earth and Planetary Science Letters*, 375, 349–360.
- Watkins, J. M., Hunt, J. D., Ryerson, F. J. and DePaolo, D. J., 2014. The influence of temperature, pH, and growth rate on the $\delta^{18}O$ composition of inorganically precipitated calcite. *Earth Planetary Science Letters*, **404**, 332–343.
- Weidman, C. R. and Jones, G. A., 1994. The long-lived mollusc *Arctica islandica*: A new paleoceanographic tool for the reconstruction of bottom temperatures for the continental shelves of the northern North Atlantic Ocean. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, **99**, 18305–8314.
- Wellington, G. M., Dunbar, R. B. and Merlen, G., 1996. Calibration of stable oxygen isotope signatures in Galapagos corals. *Paleoceanography and Paleoclimatology*, **11**, 467–480.
- Wurster, C. M., Patterson, W. P. and Cheatham, M. M., 1999. Advances in micromilling techniques: a new apparatus for acquiring high-resolution oxygen and carbon stable isotope values and major/minor elemental ratios from accretionary carbonate. *Computers & Geosciences*, 25, 1159–1166.
- 山本和幸,井龍康文,山田 努,2007. 腕足動物殻の炭素・酸素 同位体組成を用いた古環境解析の例とその問題点(〈特集〉腕足 動物の古生物学). 化石,81,67-78.
- Yamanashi, J., Takayanagi, H., Isaji, A., Asami, R., and Iryu, Y., 2016. Carbon and oxygen isotope records from *Tridacna derasa* shells: toward establishing a reliable proxy for sea surface environments. *PloS one*, **11**, e0157659.
- 横内一樹, 天野洋典, 石村豊穂, 白井厚太朗, 2017. 耳石の元素・ 同位体分析による回遊生態研究.水産海洋研究, 81, 189–202.
- Zeebe, R. E., 1999. An explanation of the effect of seawater carbonate concentration on foraminiferal oxygen isotopes. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **63**, 2001–2007.
- Zeebe, R. E., 2001. Seawater pH and isotopic paleotemperatures of Cretaceous oceans. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, **170**, 49–57.
- Zeebe, R. E., 2007. An expression for the overall oxygen isotope fractionation between the sum of dissolved inorganic carbon and water. *Geochemistry, Geophysics, Geosystems*, **8**, Q09002.
- Zhang, N., Yamada, K., Kano, A., Matsumoto, R. and Yoshida, N., 2018. Equilibrated clumped isotope signatures of land-snail shells observed from laboratory culturing experiments and its environmental implications. *Chemical Geology*, 488, 189–199.
- Zhao, L., Yang, F., Milano, S., Han, T., Walliser, E. O. and Schöne, B. R., 2018. Transgenerational acclimation to seawater acidification in the manila clam *Ruditapes philippinarum*: preferential uptake of metabolic carbon. *Science of the Total Environment*, 627, 95–103.
- Zhao, L., Shirai, K., Murakami-Sugihara, N., Higuchi, T., Sakamoto, T. T., Miyajima, T. and Tanaka, K., 2019. Retrospective monitoring of salinity in coastal waters with mussel shells. *Science of the Total Environment*, 671, 666–675.

English captions of figures and table are available at [http://www.palaeo-soc-japan.jp/].

(2019年4月18日受付, 2019年8月29日受理)