

## 主論文の要約

学位論文題目：High-precision Measurements on Triple Oxygen isotopes of Water and Dissolved Inorganic Phosphate (水および溶存無機態リン酸の高精度三酸素同位体組成定量)

所属：環境学研究科 地球環境科学専攻

氏名：三歩一 孝

第一章では、従来の研究で得られた水環境中のリン酸 ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) およびその酸素安定同位体比 ( $\delta^{18}\text{O}$ ) に関する知見と問題点についてまとめた。次に三酸素同位体組成 [ $\Delta^{17}\text{O}=\ln(\delta^{17}\text{O}+1)-0.528\cdot\ln(\delta^{18}\text{O}+1)$ ]の特徴を述べた上で本研究の目的を設定した。

リン酸は、遺伝情報の伝達物質 (DNA, RNA) やエネルギーの貯蔵を担う生体物質 (ATP) を構成するなど、生物にとって必須の物質である。しかし、一般の水環境中の存在量は  $1\ \mu\text{mol/L}$  前後と極めて少ないため、各水環境の一次生産 (光合成) を律速する栄養塩として極めて重要である。例えば、人為的なリン酸資源の局在化は、水環境の富栄養化や栄養塩バランス (N/P バランス) の崩壊を引き起こすため、生態系の破壊につながる危険性もある。そのため、環境変化の現状把握や予測、修復を実現する上で、各水環境下におけるリン酸循環の理解が必要不可欠となっている。

リン酸の P-O 結合は、水環境中においては安定であるため、その $\delta^{18}\text{O}$  は水環境中で保存されると考えられる。そこで、先行研究では、リン酸の $\delta^{18}\text{O}$  を負荷源推定の指標として活用できると考え、多様な水環境やその主要な負荷源においてリン酸の $\delta^{18}\text{O}$  を分析してきた。しかし、従来の研究の結果、以下の二点が問題となった。

#### (1) 各負荷源の $\delta^{18}\text{O}$ 変動範囲が重複

河川・湖沼・海洋といった水環境に対するリン酸負荷源の $\delta^{18}\text{O}$  は、+10~+20‰の範囲で重複していることが明らかになった。したがって、リン酸の $\delta^{18}\text{O}$  のみを指標として用いた場合、各負荷源の混合割合の定量化はもちろん、主要な負荷源の特定すらも困難となる。

#### (2) 水圏生物の再無機化により供給されるリン酸の $\delta^{18}\text{O}$ が不明確

水圏生物に取り込まれたリン酸は、細胞内酵素の作用によって周辺環境水と全ての酸素原子を交換して同位体平衡に達することが知られており、水圏生物中の有機態リン酸の $\delta^{18}\text{O}$  は、周辺環境水の $\delta^{18}\text{O}$  を反映する。しかし、この有機態リン酸が細胞外酵素によって再無機化されることで生成するリン酸は、作用した酵素や反応基質である有機態リン酸の種類によって大きく変動することが先行研究によって明らかになっている。したがって、水圏生物の再無機化に由来するリン酸の $\delta^{18}\text{O}$  を精度および確度よく推定することは困難である。

そこで本論文は、リン酸の $\Delta^{17}\text{O}$  を指標として活用することで、これらの問題を解決できないか検討した。 $\Delta^{17}\text{O}$  は、 $\delta^{17}\text{O}-\delta^{18}\text{O}$  プロット上で原点を通る傾き 0.528 の直線からの $\delta^{17}\text{O}$

の差で表される。一般の化学反応は、この 0.528 の傾きに沿って $\delta^{17}\text{O}$  と $\delta^{18}\text{O}$  が変化するので $\Delta^{17}\text{O}$  は不変である、したがって、 $\Delta^{17}\text{O}$  は、互いに異なる $\Delta^{17}\text{O}$  を持つ同一化学種同士の混合割合の変化だけを反映して変化する特徴を持つ。リン酸の酸素同位体組成は、生物に取り込まれた際に体液の  $\text{H}_2\text{O}$  と酸素同位体交換平衡に達するため、リン酸の $\Delta^{17}\text{O}$  はこの体液  $\text{H}_2\text{O}$  の $\Delta^{17}\text{O}$  を反映する。哺乳類の体液  $\text{H}_2\text{O}$  は、摂取された周辺天水に加えて呼吸で取り込まれた大気酸素も寄与するため、哺乳類由来のリン酸は負の $\Delta^{17}\text{O}$  ( $-100 \times 10^{-6}$  以下) を示すことが知られている。一方、プランクトンなどの水圏生物では、体液  $\text{H}_2\text{O}$  の大部分が周辺環境水（日本の陸水で $+30 \times 10^{-6}$  前後）に由来するため、正の $\Delta^{17}\text{O}$  を示すことが予測される。さらに、その後の有機態リン酸の合成反応や再無機化反応は、一般の化学反応過程であり、 $\Delta^{17}\text{O}$  は不変である。以上の特徴から、水環境中のリン酸の $\Delta^{17}\text{O}$  を  $10 \times 10^{-6}$  レベルの確度・精度で分析できれば、これを指標に用いることで、人為由来のリン酸と水圏生物の再無機化由来のリン酸を区別できる可能性が高い。本論文は、リン酸の $\Delta^{17}\text{O}$  を高確度・高精度で定量する新手法を開発するとともに、これを用いて水環境中のリン酸やリン酸の主要負荷源の $\Delta^{17}\text{O}$  を定量し、この主要負荷源を特定する指標としての $\Delta^{17}\text{O}$  の有用性を検討することを主目的として実施した。水環境中のリン酸の $\Delta^{17}\text{O}$  を定量した研究は過去に報告されておらず、本論文が世界初の報告である。

第二章では、採取したサンプルの詳細と本論文で開発・採用したその前処理手法、酸素同

位体比の分析手法について記した。

都市河川である愛知県天白川の河川水を、2018年2月～2021年3月の間に計6回採取した。また、主要な人為的リン酸負荷源と考えられるものについても、試料を採取した。具体的には、流域の下水処理場の放出水を採取した。また、流域内のホームセンターで化学肥料を購入し、リン酸を純水中に抽出した。各水試料中のリン酸は、先行研究を参考にして複数の手法を組み合わせた前処理手法を用いてリン酸銀 ( $\text{Ag}_3\text{PO}_4$ ) として沈殿・精製した。具体的には、陰イオン交換カラムを用いて水試料中のリン酸を分離・濃縮した後に、 $\text{CePO}_4$  として沈殿させて他のオキシアニオンや有機物からリン酸を単離した。次に  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  として再沈殿させた後に過酸化水素で洗浄し、残存している有機物を完全に除去した。

$\text{Ag}_3\text{PO}_4$  は、真空ライン内に移し、強還元剤である五フッ化臭素 ( $\text{BrF}_5$ ) を用いたフッ素化法によって  $\text{O}_2$  化した。基礎実験を行った結果、反応温度  $250^\circ\text{C}$  で一時間加熱することでリン(P)に結合する全ての酸素原子を  $\text{O}_2$  化できることが明らかになった。発生した  $\text{O}_2$  は、沸点差を利用して反応副生成物から分離・精製した後に  $-250^\circ\text{C}$  に冷却されたクライオスタットに捕集・濃縮した。その後、拡散導入型質量分析計 (IRMS) に導入し、 $\delta^{17}\text{O}$  と  $\delta^{18}\text{O}$  を同時測定した。

一般には、同位体比既知の標準物質を試料と同様に処理し分析することで、分析システム全体の確度の検証や同位体比の正規化を行う。しかし、リン酸に関しては、一般に認められ

た酸素同位体標準物質が存在しないため、本論文では三種類の  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  ラボ標準を準備し、分析システムの精度の検証と日常的な確度補正のために繰り返し測定した。

また、近年、珪酸塩などの  $\Delta^{17}\text{O}$  を  $10 \times 10^{-6}$  レベルの高確度で分析するために、二種類の標準物質 (VSMOW および SLAP) を用いた正規化法 (VSMOW-SLAP スケール) が一般に用いられるようになってきている。これにより、分析システム全体の微小な差異によって生じる  $\Delta^{17}\text{O}$  分析値の微小な系統誤差を補正でき、研究室間や他の化学種間でも比較可能な高確度の  $\Delta^{17}\text{O}$  が求められる。本論文では、VSMOW-SLAP スケールで酸素同位体比が値決めされている  $\text{H}_2\text{O}$  をリン酸と同時に分析することで、VSMOW-SLAP スケールへのリン酸の正規化方程式を導出することとした。具体的には、同位体比が異なる三種類の  $\text{H}_2\text{O}$  二次標準をリン酸と同様な手法で定量的に  $\text{O}_2$  化し、IRMS で分析した。 $\text{H}_2\text{O}$  二次標準の  $\delta^{18}\text{O}$  の範囲は、 $-46 \sim +31\text{‰}$  とした。河川水中のリン酸の  $\delta^{18}\text{O}$  変動範囲は、 $+5 \sim +10\text{‰}$  程度と予測されるため、 $\text{H}_2\text{O}$  二次標準を用いることで内挿によってリン酸の  $\delta^{17}\text{O}$  と  $\delta^{18}\text{O}$  を正規化できる。さらに、正規化の確度検証を目的として国際標準物質である GISP ( $\text{H}_2\text{O}$ ) と NBS28 (珪砂)、二次標準物質の JFB (MORB) を  $\text{O}_2$  化し、IRMS で分析した。NBS28 と JFB は、ニッケル製の密閉容器内で  $\text{BrF}_5$  と  $500^\circ\text{C}$  で 16 時間反応させることで  $\text{O}_2$  化した。

第三章では、結果と考察を記した。

まず、三種類の  $\text{H}_2\text{O}$  二次標準から導出した VSMOW-SLAP スケールへの正規化方程式

の確度を検証した。GISP と NBS28、JFB の $\delta^{18}\text{O}$  と $\Delta^{17}\text{O}$  は、VSMOW-SLAP スケールに正規化された先行研究の報告値と誤差範囲で一致し、本研究で開発した正規化方程式を用いることで $\Delta^{17}\text{O}$  を VSMOW-SLAP スケールに高確度で正規化できることが確認された。

また、三種類の  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  ラボ標準の量を変えてそれぞれ繰り返し分析した結果、試料量に依らず $\delta^{18}\text{O}$  と $\Delta^{17}\text{O}$  は一定値を示した。これは、他の含酸素物質（ブランク  $\text{O}_2$ ）の寄与が無視できるほど小さいことを意味している。したがって、複数回測定の実験値をリン酸の $\delta^{18}\text{O}$  と $\Delta^{17}\text{O}$  の真値とした。このときの $\Delta^{17}\text{O}$  の標準偏差 (1SD) は、 $9\sim 20 \times 10^{-6}$ であった。

これは、同一試料を繰り返し前処理・測定することで  $10 \times 10^{-6}$  以下の標準誤差 (1SE) で $\Delta^{17}\text{O}$  を定量可能であることを意味している。さらに、同位体比既知のリン酸を人工河川水に溶解して前処理したところ、前処理の前後で $\delta^{18}\text{O}$  に $-1.2\%$ の同位体分別が認められた一方で、 $\Delta^{17}\text{O}$  に有意な変化は見られなかった。したがって、本論文で開発した分析システムを用いることで、リン酸の $\Delta^{17}\text{O}$  を VSMOW-SLAP スケールで高確度かつ高精度で決定できることが確認された。また、ブランク補正や同位体分別の補正などは不要である。

以上の分析システムを用いて定量化した河川水中のリン酸の $\Delta^{17}\text{O}$  は、 $-107\sim +3 \times 10^{-6}$ の範囲で変動していた。一方、人為由来のリン酸の $\Delta^{17}\text{O}$  は、下水処理場放出水で $-56 \pm 5 \times 10^{-6}$  (1SD)、化学肥料で $-98 \pm 5 \times 10^{-6}$  (1SD)であり河川水中のリン酸と比べて有意に低い $\Delta^{17}\text{O}$  を示した。河川水中のリン酸のうち、低い $\Delta^{17}\text{O}$  を示すものは、下水処理場や化学肥

料といった人為起源に直接由来するリン酸と考えられる。しかし、 $100 \times 10^{-6}$  を超える変動幅を説明するには、 $+3 \times 10^{-6}$  よりも高い $\Delta^{17}\text{O}$  を示すリン酸負荷源も存在していなければならない。

水圏生物に取り込まれたリン酸は、生体内で進行する酸素同位体交換反応によって周辺環境水 ( $\text{H}_2\text{O}$ ) を反映した $\Delta^{17}\text{O}$  となるはずである。河川水 ( $\text{H}_2\text{O}$ ) の $\Delta^{17}\text{O}$  は、 $+28 \pm 6 \times 10^{-6}$  であり、河川水中のリン酸よりも高い $\Delta^{17}\text{O}$  を示した。したがって、水圏生物の再無機化に由来するリン酸が、高 $\Delta^{17}\text{O}$  リン酸を示す主要負荷源と推測した。

人為由来と水圏生物の再無機化由来のリン酸が河川水中のリン酸の主要負荷源とすると、 $\Delta^{17}\text{O}$  をパラメータとした単純なマスバランス式から各負荷源の寄与率を定量化できる。その結果、河川水中のリン酸に対する水圏生物の再無機化に由来しているリン酸の寄与率は、観測期間中に 0%~80%の範囲で変動していることが明らかになった。

最後に第四章に本論文の結論を記した。

本論文は、リン酸の $\Delta^{17}\text{O}$  を指標として活用することで、 $\delta^{18}\text{O}$  のみを指標に用いた従来法に内在していた諸問題を克服し、河川水中におけるリン酸の動的循環が定量化できることを明らかにした。これは、水環境におけるリン酸循環像の理解に直結する重要な貢献である。