

海水からの炭酸カルシウム合成過程における重元素安定同位体比分別の解析 ーバイオミネラリゼーション制御機構の解明に向けてー

有賀 智子¹, 鈴木 道生², 下田 玄³

¹ 産業技術総合研究所計量標準総合センター, ² 東京大学大学院農学生命科学研究科,

³ 産業技術総合研究所地質調査総合センター

概要

貝類やウニ、サンゴ等の海洋生物はバイオミネラリゼーションの働きにより海水中のカルシウムイオン (Ca^{2+}) を炭酸カルシウム (CaCO_3) として効率的に固定している。この過程においては、バイオミネラリゼーションタンパク質と呼ばれる生物種特異的なタンパク質が、生成される CaCO_3 結晶の結晶多形を厳密に制御している。バイオミネラリゼーションタンパク質を活用して CaCO_3 の結晶多形を自在に制御することが可能になれば、海水中の Ca を用いて大気中の CO_2 を CaCO_3 として低コスト・高効率に固定する技術の開発に繋がる可能性がある。しかしながら、バイオミネラリゼーションタンパク質による CaCO_3 結晶多形の制御機構については解明されていない。筆者らはこの解明に、 CaCO_3 結晶形成の過程で起こるストロンチウム (Sr) と Ca の安定同位体分別の検出を活用できるのではないかと考えた。本研究では、人工的に再現したバイオミネラリゼーション反応系において合成した CaCO_3 結晶や結晶多形の異なる数種類の貝類試料の Sr および Ca の安定同位体分別を検出することで、バイオミネラリゼーションタンパク質の機能解析を目指した。

CaCO_3 結晶形成の過程で起こる Sr や Ca の安定同位体分別の程度は非常に微細であるため、この検出には Sr および Ca の安定同位体比 ($^{88}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$, $^{44}\text{Ca}/^{42}\text{Ca}$) 測定技術の高精度化が欠かせない。そこで最初に、 $^{88}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ 測定技術の高精度化に資する以下の技術開発を行った。(1) Sr レジンを用いた Sr /マトリクス分離手法の確立: 本研究では $^{88}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ 測定にマルチコレクター型誘導結合プラズマ質量分析法 (MC-ICP-MS) を用いるが、MC-ICP-MS を用いて高精度な $^{88}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ 測定を達成するには、化学分離によって測定試料に含まれるマトリクス元素を可能な限り除去する必要がある。本研究では Sr レジンと呼ばれる抽出イオンクロマトグラフィー樹脂を使用した Sr /マトリクス分離手法の確立を行った。その結果、良好な Sr /マトリクス分離と高い Sr 回収率 (97%) を達成した。(2) MC-ICP-MS を用いた $^{88}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ 測定法の高感度化: 本研究が測定対象とする合成 CaCO_3 結晶は合成できる試料量が微量であり抽出できる Sr 量も極微量であることから、微量試料の測定にも対応できるよう $^{88}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ 測定法の高感度化に取り組んだ。その結果、従来法と比較して約 4 倍の高感度化を達成した。続いて(1)で最適化した Sr /マトリクス分離手法を用いて上述の合成 CaCO_3 結晶や貝殻試料を処理し、良好な分離を達成した。分離済みの試料については、今後 $^{88}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ ならびに $^{44}\text{Ca}/^{42}\text{Ca}$ 測定を行う予定である。

1. 研究目的

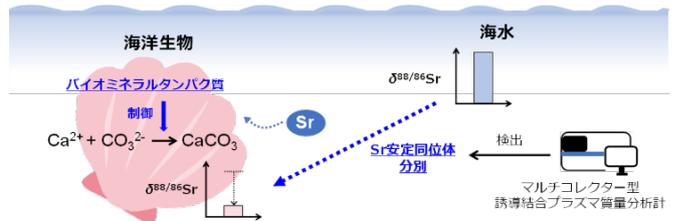
貝類やウニ、サンゴ等の海洋生物はバイオミネラリゼーション (生体鉱物化作用) の働きにより海水中のカルシウムイオン (Ca^{2+}) を炭酸カルシウム (CaCO_3) として効率的に固定している。この過程においてはバイオミネラリゼーションタンパク質と呼ばれる種特異的なタンパク質

が結晶形成を制御しているものの、その具体的な機能については明らかになっていない。この機能を明らかにしてそれを自在に制御することができれば、海水中の Ca を用いて大気中の CO_2 を CaCO_3 として低コスト・高効率に固定する技術の開発に繋がる可能性がある。

重元素は同一の元素であっても同位体間で化学反応性に差が見られることから、種々の化学反応を経ることで安定同位体比組成が天然の同位体比からずれていくことが知られている。この安定同位体比組成の変動(以下、安定同位体分別と呼ぶ)は化学反応の履歴を追跡する化学トレーサーとして自然界における元素循環や生体内の金属代謝経路の解明のために広く用いられている¹⁾等。バイオミネラル化の過程における重元素の安定同位体分別の検出が、CaCO₃結晶形成制御機構やバイオミネラル化タンパク質の機能解析にも有用なのではないかと発想した。

海水から合成されたCaCO₃には、主要重元素であるCaの他にも海水由来のストロンチウム(Sr)やマグネシウム、ナトリウム等も含まれる。CaCO₃中のSrやCaの安定同位体分別は結晶の沈殿速度や結晶多形の違い(カルサイト/アラゴナイト)等の要因の影響を受けることが知られているが、バイオミネラル化タンパク質はこれらの要因を厳密に制御する機能を持つと推測されることから、CaCO₃中のSrやCaの安定同位体分別の検出はバイオミネラル化タンパク質の機能を間接的に知るための手段となると考えられる。そこで本研究では、バイオミネラル化を人工的に再現した反応系において*in vitro*で合成されたCaCO₃結晶ならびに結晶多形や形態の異なる数種類の貝類の貝殻におけるSrやCaの安定同位体分別を検出することにより、バイオミネラル化制御機構の解明を試みる(Fig. 1)。

CaCO₃中のSr, Caの安定同位体分別はいずれも0.5%程度の非常に微少なレベルが多く、その検出には相対標準偏差<0.001%レベルでの非常に高精度な同位体比測定技術が欠かせない。本研究ではSrとCaの安定同位体分別の検出のために⁸⁸Sr/⁸⁶Srおよび⁴⁴Ca/⁴²Caの測定を行うが、この測定には高精度な同位体比分析が可能なマルチコレクター型誘導結合プラズマ質量分析装置(以下、MC-ICP-MSと呼ぶ)を使用する。⁴⁴Ca/⁴²Caの測定には表面電離型質量分析装置を使用することが一般的であるが、本研究では多数の試料を測定することを考慮して、ハイスループット測定が可能なMC-ICP-MSを用いた。



安定同位体分別の検出によるバイオミネラル化タンパク質の機能解析

Fig 1. Schematic diagram of this study

本研究では実試料の測定を行う前に、まずは高精度な⁸⁸Sr/⁸⁶Sr測定を行う上で問題となる、下記の技術的課題の解決を試みた。(1)Sr レジンをを用いた Sr/マトリクス分離手法の確立:ICP-MSを用いた⁸⁸Sr/⁸⁶Srの測定においては、測定試料に含まれるCaが主に⁸⁸Srに対してスペクトル干渉を引き起こし、⁸⁸Sr/⁸⁶Sr測定の信頼性を損なう。本研究で測定の対象としているCaCO₃結晶や貝殻試料の主成分はCaであるため、特にSr/Caの十分な分離については留意する必要がある。また、本研究では測定の対象としていないが、Sr放射起源同位体比(⁸⁷Sr/⁸⁶Sr)の測定においては測定試料に含まれるルビジウム(Rb)が非常に深刻なスペクトル干渉を引き起こす。したがって⁸⁷Sr/⁸⁶Srの測定も視野に入れる場合には、Sr/Rbの十分な除去についても考慮する必要がある。本研究では、CaCO₃を主成分とする試料中の⁸⁸Sr/⁸⁶Sr測定値の信頼性向上を目指して、SrとCaおよびRbの分離手法を最適化した。(2)MC-ICP-MSを用いた⁸⁸Sr/⁸⁶Sr測定法の高感度化:本研究が測定対象とするCaCO₃結晶や貝殻試料のうち、特にCaCO₃結晶は合成できる試料量が微量であり抽出できるSr量も極微量であることから、同位体比測定手法の高感度化も重要な技術課題となる。そこで本研究ではThermo Fisher Scientific社(アメリカ合衆国・マサチューセッツ州)製のMC-ICP-MSであるNeptune plusを用いた同位体比測定において、高感度測定に使用されるJetサンプルコーンとXスキマーコーンの組み合わせ(以下、Jet/Xとする)がSr同位体比測定にも利用できるかを検証した。Sr同位体比測定には一般的にStandardサンプルコーンとHスキマーコーンの組み合わせ(以下、Standard/Hとする)が使用される。Jet/Xは銅や鉛等一部の元素の同位体比測定に用いられているが、⁸⁸Sr/⁸⁶Srの高感度測定に適用された例は少なく、Jet/XのSr同位体比測定への適用性については議論が十分ではない。そこで本研究ではJet/XのSr同

位体比測定への適用性を検証するため、Standard/H と Jet/X の組み合わせについて①Sr 同位体比標準 NIST SRM 987 の測定値、②共存 Ca が $^{88}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ 測定値に与える影響を比較した。②について検証した理由としては、Sr 以外の元素(セリウム等)の同位体比測定に Jet/X を使用した先行研究において、共存元素が引き起こすスペクトル干渉の程度が Standard/H を使用した場合よりも強くなったという報告があるためである²⁾等。加えて、実試料測定への Jet/X の適用性を検証するため③複数の先行研究において $^{88}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ が測定されているサンゴの標準物質 JCp-1 と魚類の耳石の標準物質 FEBS-1 の $^{88}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ 測定を行い、文献値と比較した。

最後に、前項目(1)で検証した Sr/マトリクス分離手法を用いて CaCO_3 結晶や貝殻試料の化学分離を行った。(2)で検証した $^{88}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ の高感度測定法を用いた実試料測定は 2025 年度中を予定している。

2. 研究方法

2.1 試薬と測定試料

2.1.1 試薬

測定溶液の調製や酸分解には、関東化学株式会社(日本・東京)製造の微量元素分析用の硝酸(UltrapurTM-100 HNO_3)と塩酸(UltrapurTM-100 HCl)を使用した。溶液の希釈には比抵抗値 18.2 $\text{M}\Omega$ 以上の milli-Q 水(メルク株式会社, ゲルムシュタット, ドイツ)を用いた。 $^{88}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ 測定の際に使用する Sr の同位体標準物質として、アメリカ国立標準技術研究所(NIST; アメリカ合衆国・メリーランド州)が頒布する NIST SRM 987 を用いた。 $^{88}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ の質量差別効果補正には、ジルコニウム(Zr)元素標準液(関東化学株式会社)を使用した。Sr/マトリクス分離条件の最適化を行うための実試料として、NIST SRM 1567b wheat flour(NIST)を使用した。Jet/X の実試料分析への適用性を検証するため、JCp-1 coral(地質調査総合センター, 日本・茨城)と FEBS-1 otolith(カナダ国立研究機構, カナダ・オンタリオ州)を用いた。

2.1.2 合成 CaCO_3 結晶の調製

鈴木らの研究により、高分子有機化合物(ポリビニルアルコール, 以下 PVA とする)を触媒として使用することにより、バイオミネラリゼーション反応系を人工的に再現することが可能であり、人工的にアラゴナイト結晶構造を有する CaCO_3 結晶を調製できることが示されている。そこで本研

究では、PVA の有無や反応時間等の反応条件を変化させて複数種類の CaCO_3 結晶を調製した。

調製の際には塩化カルシウムを Ca 源、炭酸アンモニウムを CO_3 源として結晶形成反応を行った。反応液には Sr 源として塩化ストロンチウムを添加した。反応液中の各化合物の終濃度は塩化カルシウムが 20 mM, 炭酸アンモニウムが 20 mM, 塩化ストロンチウムが 90 μM , PVA が 0.005%である。PAV の添加あり・添加なしのそれぞれの混合液を、室温で攪拌しながら 1 時間, 3 時間, 72 時間または 216 時間反応させた。反応後は 4°C, 12000 g で 15 分間遠心分離し、沈殿を乾熱機に入れ一晚 70°C で乾燥させ、合成 CaCO_3 結晶を得た。各合成 CaCO_3 結晶は、反応条件を区別するためにそれぞれに試料番号を割り振った(Table 1)。

2.1.3 貝殻試料および無機 CaCO_3 結晶の採取

二枚貝, 巻き貝の中から数種類の(アコヤガイ *Pinctada fucata*, ホタテ *Mizuhopecten yessoensis*, イワガキ *Crassostrea nippona*, アワビ *Haliotis discus*, オオアサリ *Saxidomus purpurata*)を選択し、貝殻を採取した。貝殻は粉砕機 WC-3(大阪ケミカル, 日本・大阪)で粉砕して粉末にした。これらの貝殻は、どの部分をサンプリングするかにより CaCO_3 結晶の結晶多形(カルサイト/アラゴナイト)が異なる。各貝殻試料のサンプリング方法概要と各 CaCO_3 結晶の特徴を表にまとめた(Table 1)。アコヤガイ試料(Table 1 の N3, N4, N5)について、サンプリング方法の詳細は以下の通りである。アコヤガイの稜柱層については、貝殻から該当する部分をハサミで物理的に切り取って断片を採取し、Table 1 の N4 を得た。このアコヤガイ稜柱層を 30%次亜塩素酸ナトリウム(NaClO)溶液に浸して 4°C で 1 日間静置することで稜柱層を分解し Table 1 の N3 を得た。また、アコヤガイ貝殻全体を同様に 30% NaClO 溶液で処理し稜柱層を分解した後、残存した稜柱層のみを物理的に取り除くことで真珠層(Table 1 の N5)を得た。ホタテ(Table 1 の N6), イワガキ(Table 1 の N7), アワビ(Table 1 の N8), オオアサリ(Table 1 の N9)の各試料のサンプリング方法については Table 1 に示した。また、これら貝殻試料(バイオミネラリゼーション由来の CaCO_3 結晶)との比較を行うため、無機 CaCO_3 結晶であるアイスランドスパー(Table 1 の N1, 無機カルサイト)とモロッコ産アラゴナイト(Table 1 の N2, 無機アラゴナイト)も同

様に粉碎し、比較対象として $^{88}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ 測定に供した。各貝殻試料と無機 CaCO_3 結晶の $^{88}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ 測定値は、それぞれの結晶多形の違いに基づいて、結晶多形と Sr 安定同

位体分別の間に相関関係があるかを議論する目的で比較した (Table 2)。

Table 1. Overview of sampling method and characteristic of CaCO_3 crystal for each shell samples, and reaction conditions for synthetic CaCO_3 preparation

試料番号	サンプリング方法概要	CaCO_3 結晶の特徴
N1	アイスランドスパーを削って粉碎	無機カルサイト
N2	モロッコ産アラゴナイトを削って粉碎	無機アラゴナイト
N3	アコヤガイ (<i>Pinctada fucata</i>) の稜柱層を NaClO 処理し柱状のカルサイトを単離	有機物を含まない生物カルサイト (二枚貝由来)
N4	アコヤガイ (<i>Pinctada fucata</i>) 稜柱層を削って粉碎	有機物を含む生物カルサイト (二枚貝由来)
N5	アコヤガイ (<i>Pinctada fucata</i>) を NaClO 処理して真珠層のみを削って粉碎	生物アラゴナイト (二枚貝由来)
N6	ホタテ (<i>Mizuhopecten yessoensis</i>) 貝殻の白い部分を削って粉碎	生物カルサイト (二枚貝由来)
N7	イワガキ (<i>Crassostrea nippona</i>) 貝殻の白い部分を削って粉碎	生物カルサイト (二枚貝由来)
N8	アワビ (<i>Haliotis discus</i>) の真珠層を削って粉碎	生物アラゴナイト (巻貝由来)
N9	オオアサリ (<i>Saxidomus purpurata</i>) 貝殻の白い部分を削って粉碎	真珠層ではないアラゴナイト, 外側
試料番号	合成 CaCO_3 調製の反応条件	
S1	PVA 添加 反応時間: 1 時間	
S2	PVA 添加なし 反応時間: 1 時間	
S3	PVA 添加 反応時間: 3 時間	
S4	PVA 添加なし 反応時間: 3 時間	
S5	PVA 添加 反応時間: 72 時間	
S6	PVA 添加なし 反応時間: 72 時間	
S7	PVA 添加 反応時間: 216 時間	
S8	PVA 添加なし 反応時間: 216 時間	

Table 2. Purpose of comparison of $^{88}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ value for each sample combination

$^{88}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ 値比較の組み合わせ	$^{88}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ 値比較の目的
試料番号 N2 と N5	鉱物アラゴナイトと生物アラゴナイトの比較 (バイオミネラリゼーションによるアラゴナイトの形成過程で起こる Sr 同位体分別の検出)
試料番号 N8 と N9	生物アラゴナイトのうち真珠層であるもの (N8) と真珠層ではないもの (N9) の比較
試料番号 N1 と N7	鉱物カルサイトと生物カルサイトの比較 (バイオミネラリゼーションによるカルサイトの形成過程で起こる Sr 同位体分別の検出)
試料番号 N3 と N4	貝殻には CaCO_3 以外にも有機物が含まれ、有機物内にも一定量の Sr が含まれることが予想される。そこで、有機物内の Sr と鉱物内の Sr を区別なく測定してしまっていないかを確認

2. 2 酸分解

測定試料はマイクロ波試料分解装置 (UltraWAVE, マイルストーン社, イタリア・ソリーゾレ) を用いて酸分解した。ポリテトラフルオロエチレン製の分解容器に適量の試料を秤量し、68% HNO_3 と 30% HCl の 4:1 混合液を添加した。マイクロ波は 1500 W に設定した。昇温プログラムは以下の通りである: 20 分間かけて段階的に温度を 230°C まで上昇させ、20 分間維持する。

2. 3 Sr/マトリクス分離

Sr/マトリクス分離には、Sr レジンTM (Eichrom 社, アメリカ合衆国・イリノイ州) を用いた。レジンの容量はロードする Sr 量に合わせて 0.4 mL あるいは 2.0 mL を選択した。

2. 4 $^{88}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ 測定法

$^{88}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ 測定には MC-ICP-MS (Neptune plus; Thermo Fisher Scientific 社) を使用した。試料導入系として、フッ素樹脂製のネブライザーと、石英ガラス製のダブルパスプレ

ーチャンバーを使用した。MC-ICP-MS の測定条件は、使用の度に ^{88}Sr の信号強度が最大になるよう最適化した。最も典型的な測定条件を **Table 3** に示した。測定の際には ^{83}Kr , ^{84}Sr , ^{85}Rb , ^{86}Sr , ^{87}Sr , ^{88}Sr , ^{90}Zr , ^{91}Zr , ^{92}Zr のイオンビームを同時に観測した。

$^{88}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ 測定における質量差別効果の補正は、Zr を外部補正元素として使用する外部補正法とスタンダードサンプルブラケット法を組み合わせて行った(式 1~2)。式中の“corr”は各同位体比の補正值，“obs”は観測値，“ref”は参照値を示す。 $^{88}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ の参照値として 8.375209³⁾を用いた。“m”は各同位体の質量数を示す。本補正法は 2 つのステップで構成される。最初に下記の式(1)に基づき、NIST SRM 987 標準溶液の $^{88}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ 観測値と参照値のずれから $^{92}\text{Zr}/^{90}\text{Zr}$ の補正值を求める。次に下記の式(2)、測定試料を挟み込んだ前後の標準溶液の $^{92}\text{Zr}/^{90}\text{Zr}$ の補正值の平均値を $^{92}\text{Zr}/^{90}\text{Zr}$ の参照値とし、 $^{92}\text{Zr}/^{90}\text{Zr}$ 参照値と観測値のずれと $^{88}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ 観測値から $^{88}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ 補正值を求める。試料中の $^{88}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ の同位体分別の程度は非常に微細なレベルであることから、 $^{88}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ は下記の式(3)に基づき NIST SRM 987 からのずれとして千分率 δ 値(‰)で表記した。

$$\left(\frac{^{92}\text{Zr}}{^{90}\text{Zr}}\right)_{\text{corr}} = \left(\frac{^{92}\text{Zr}}{^{90}\text{Zr}}\right)_{\text{obs}} \times \left[\frac{\left(\frac{^{88}\text{Sr}}{^{86}\text{Sr}}\right)_{\text{ref}}}{\left(\frac{^{88}\text{Sr}}{^{86}\text{Sr}}\right)_{\text{obs}}} \right]^{\left[\frac{\ln\left(\frac{m^{92}}{m^{90}}\right)}{\ln\left(\frac{m^{88}}{m^{86}}\right)} \right]} \quad (1)$$

$$\left(\frac{^{88}\text{Sr}}{^{86}\text{Sr}}\right)_{\text{corr}} = \left(\frac{^{88}\text{Sr}}{^{86}\text{Sr}}\right)_{\text{obs}} \times \left[\frac{\left(\frac{^{92}\text{Zr}}{^{90}\text{Zr}}\right)_{\text{ref}}}{\left(\frac{^{92}\text{Zr}}{^{90}\text{Zr}}\right)_{\text{obs}}} \right]^{\left[\frac{\ln\left(\frac{m^{88}}{m^{86}}\right)}{\ln\left(\frac{m^{92}}{m^{90}}\right)} \right]} \quad (2)$$

$$\delta \left(\frac{^{88}\text{Sr}}{^{86}\text{Sr}}\right) = \left[\frac{\left(\frac{^{88}\text{Sr}}{^{86}\text{Sr}}\right)_{\text{sample}}}{\left(\frac{^{88}\text{Sr}}{^{86}\text{Sr}}\right)_{\text{NIST SRM 987}}} - 1 \right] \times 1000 (\text{‰}) \quad (3)$$

Table 3. Instrumental settings for MC-ICP-MS

Instrument settings									
RF power		1200 W							
Guard electrode		On							
Plasma Ar gas flow rate		15.0 L min ⁻¹							
Auxiliary Ar gas flow rate		0.60–0.70 L min ⁻¹							
Sample gas flow rate		0.93–0.96 L min ⁻¹							
Nebulizer		PFA nebulizer for SC-micro							
Sampling uptake time		90 s							
Wash time		20 min							
Data acquisition parameters									
Scan type		Static mode							
Cycles/blocks		50 cycles/block							
Zoom optics		Focus quad, –3.00 V Dispersion quad, 0.00 V							
Resolution		≈300							
Integration time		8.389 s							
Cup configuration									
L4	L3	L2	L1	C	H1	H2	H3	H4	
⁸³ Kr	⁸⁴ Kr	⁸⁵ Rb	⁸⁶ Sr	⁸⁷ Sr	⁸⁸ Sr	⁹⁰ Zr	⁹¹ Zr	⁹² Zr	

3. 研究結果および考察

3.1 Sr レジンを用いた Sr/マトリクス分離条件の最適化

Sr レジンを使用した Sr/マトリクス分離は以下のステップから構成される。

Milli-Q 水と 0.05 mol L⁻¹ 等の希釈した HNO₃ を用いて Sr レジンを洗浄する **ステップ 1**、濃い HNO₃ を使用したコンデューションの **ステップ 2**、試料をレジンにロードする **ステップ 3**、レジンをリンスする **ステップ 4**、0.05 mol L⁻¹ 等の希釈した HNO₃ を用いた Sr 溶出の **ステップ 5**。

Sr レジンによる Sr/マトリクス分離手法を確立するため、各分離ステップについてそれぞれの以下の条件を最適化した。

ステップ 1 Sr レジン洗浄:

ステップ 1 については、レジンの洗浄に使用する milli-Q 水と 0.05 mol L⁻¹ HNO₃ の容量を最適化した。0.4 mL のレジンの場合、レジン容量の 10 倍(4 mL)の milli-Q 水で洗浄することにより Sr のブランク値を 0.1 pg 程度まで減少させることができた。2.0 mL レジンの場合には、レジン容量の 10 倍(20 mL)の milli-Q 水で洗浄することにより Sr のブランク値を 0.7 pg 程度まで減少させることができた。続いて 0.05 mol L⁻¹ HNO₃ で洗浄すると再度僅かな量の Sr が溶出

したが、その後レジンの容量の 10 倍の $0.05 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$ で洗浄することにより、Sr ブランク値は 0.4 mL レジンの場合には 0.1 pg 、 2.0 mL レジンの場合には 0.4 pg まで減少させることができた。

ステップ 3 試料ロード:

Sr レジンに試料をロードする際には、ロード前に試料の溶媒を濃い HNO_3 に置き換える必要がある。濃 HNO_3 の濃度については、先行研究でも $3 \sim 8 \text{ mol L}^{-1}$ まで様々な濃度が選択されている⁴⁻⁶等。本研究では、高い Sr 回収率が得られ、かつ Sr 画分中に残存する Ca や Rb の濃度を低く維持できるような HNO_3 濃度を検証するため、試料ロード時の HNO_3 濃度を最適化した。 HNO_3 濃度の最適化には NIST SRM 1567b の酸分解液を使用した。NIST SRM 1567b を 6 g 酸分解し、分解液を 6 つに分割した。それぞれを蒸発乾固させた後に 2 つずつを 1 セットとして $1, 3, 8 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$ にそれぞれ再溶解した。各セットのうち一方を別々の 0.4 mL Sr レジンにロードした。もう一方を同様に 2.0 mL の Sr レジンにロードした。その後、試料と同一の濃度の HNO_3 で Sr レジンをリンスし、Sr 画分を分取した。各 Sr 画分に含まれる Sr, Rb, Ca 濃度から Sr 回収率、Rb/Sr 濃度比、Ca/Sr 濃度比を求めた。以上の操作は 3 回繰り返す、結果を $\text{mean} \pm 1\text{SD}$ ($n = 3$)として示した(Fig. 2)。 2.0 mL レジンの場合にはすべての HNO_3 濃度で Sr 回収率は 90%以上になった。最も高い回収率は $8 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$ 使用時の $97.7\% \pm 1.2\%$ であった。一方の 0.4 mL レジンの場合には $8 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$ 使用時は高い回収率($96.3\% \pm 0.5\%$)が得られたが $1, 3 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$ の場合には Sr 回収率は非常に低くなった(Fig. 2)。この結果は、レジンの容量が小さい場合には低い濃度の HNO_3 ではレジんに Sr が十分保持されないことを示している。また、Sr 画分に残存する Ca と Rb の Sr に対する濃度比を見ると、Rb の場合には 0.4 mL レジンと 2.0 mL のレジンの両方において $8 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$ 使用時に最も低い Rb/Sr 濃度比が得られた。一方の Ca の場合には $8 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$ 使用時に最も高い Ca/Sr 濃度比が得られた。これは、Ca と Sr の化学的性質が類似していることにより、高い HNO_3 濃度では Sr だけでなく Ca の Sr レジンへの吸着も増大することを示している。以上の結果から 8 mol L^{-1} を最適の HNO_3 濃度として選択することとした。

$8 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$ 使用時には Ca/Sr 濃度は比較的高くなってしまふものの後述の 3. 2. 2 で詳述する通り、Ca/Sr 濃度比が 10 以下の場合においては $^{88}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ 測定値への Ca の影響は無視できることを確認できたため、Sr の回収率と Sr/Rb 分離の効率を優先し、 8 mol L^{-1} を最適な試料ロード時の HNO_3 濃度として選択した。

ステップ 4 リンス:

試料をロードした後、レジンは試料と同じ濃度の HNO_3 を用いてリンスされる。リンスに使用する HNO_3 の容量は、分離後に Sr 画分中に残存するマトリクス元素の濃度にも影響すると考えられる。そこで、 $8 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$ 使用時の系に関してマトリクス元素をリンスするのに十分な $8 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$ の容量を検証した。 0.4 mL レジンの場合は 4 mL 、 2.0 mL レジンの場合は 20 mL の $8 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$ で試料ロード後のレジンをリンスし、画分を 1 mL ずつ分取してそれぞれに含まれるマトリクス元素(Rb, Ca, Fe, Zn)を定量分析し、ロードした試料に含まれる元素の総量(g)に対する回収率(%)として求めた(Fig. 3)。 0.4 mL レジンの場合には R-2 画分までにロードしたすべてのマトリクス元素が溶出した。各元素の回収率は以下の通りである。

Rb:100%, Ca:104%, Fe:100%, Zn:100%。

2.0 mL レジンの場合には R-4 画分までにロードしたすべてのマトリクス元素が溶出した。

Rb:100%, Ca:103%, Fe:100%, Zn:101%。

マトリクス元素の濃度は Sr 濃度と比較すると大幅に高いことから、完全な Sr/マトリクス分離を担保するために 0.4 mL レジンは 4 mL 、 2.0 mL レジンは 20 mL の $8 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$ でレジンをリンスすることとした。

ステップ 5 Sr 溶出:

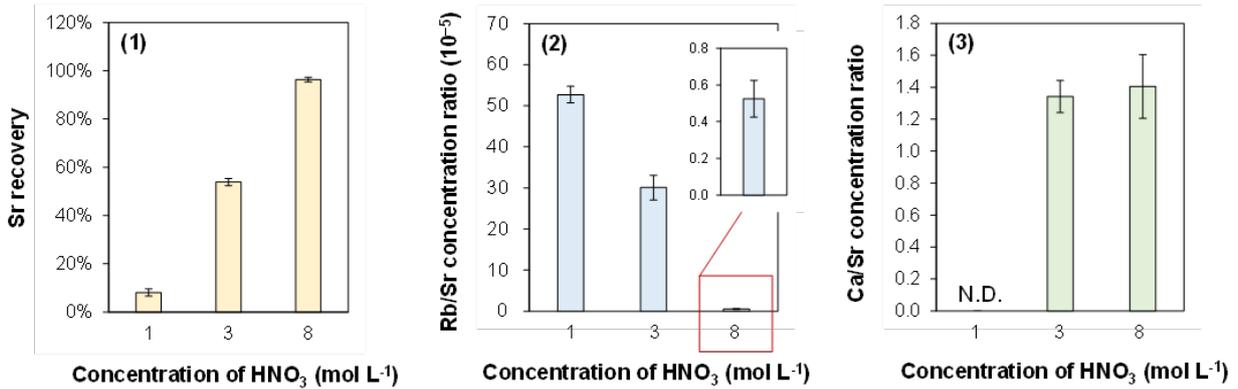
レジンをリンスした後、 $0.05 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$ をレジんに滴下することで Sr レジンに吸着した Sr を溶出させ、Sr 画分として回収する。この際に使用する $0.05 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$ 容量について検証した。 0.4 mL レジンの場合は 0.25 mL ずつ合計 2 mL 分の Sr 画分を分取した。 2.0 mL レジンの場合は 1 mL ずつ合計 15 mL の Sr 画分を分取した。各画分に含まれている Sr を定量分析し、ロードした試料に含まれる Sr の総量(g)に対する回収率(%)として求めた(Fig. 3)。 0.4 mL レジンの場合には E-2 から E-5 の画分中で(合計 1 mL)、

2.0 mL レジンの場合には E-2 から E-6 までの画分中で (合計 5 mL), 98%を超える Sr が回収された。そこで, 0.4 mL レジンでは E-2 から E-5 の画分, 2.0 mL レジンの場合には E-2 から E-6 までの画分を Sr 画分として回収し, $^{88}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ 測定に供することとした。

Sr/マトリクス分離の最適条件:

最適化した Sr/マトリクス分離条件を Table 4 にまとめた。以上の 3. 1 の研究成果については論文発表済 ⁷⁾ である。

(a) 0.4 mL Sr resin



(b) 2.0 mL Sr resin

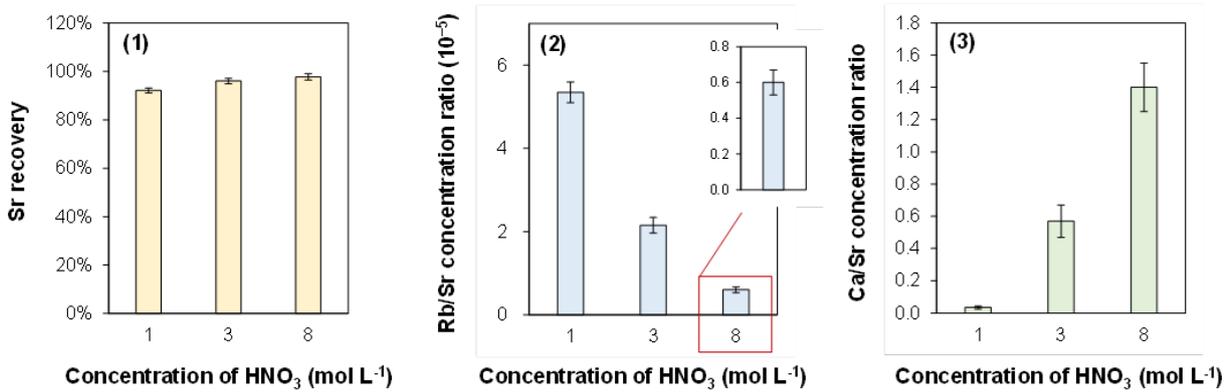
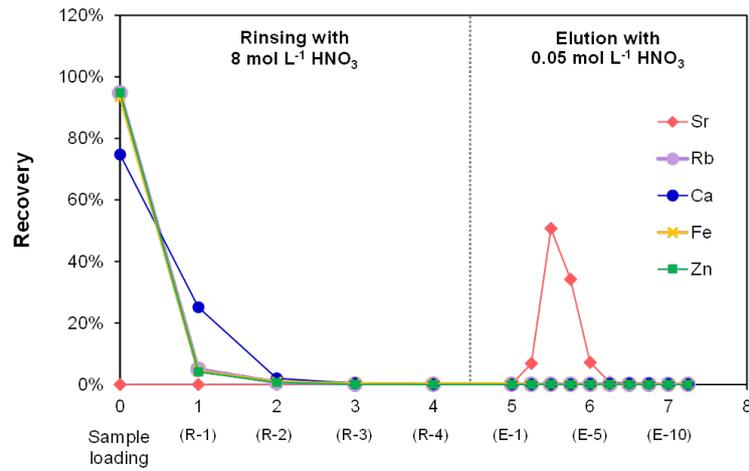


Fig 2. Influence of the HNO₃ concentration on Sr/matrix separation during the sample loading and matrix elution steps, demonstrating its influence on Sr recoveries (a-1 and b-1) and the residual Rb/Sr (a-2 and b-2) and Ca/Sr (a-3 and b-3) concentration ratios in the purified Sr fraction. The figure is a modified version of the one published in Ref. 7.

(a) 0.4 mL Sr resin



(b) 2.0 mL Sr resin

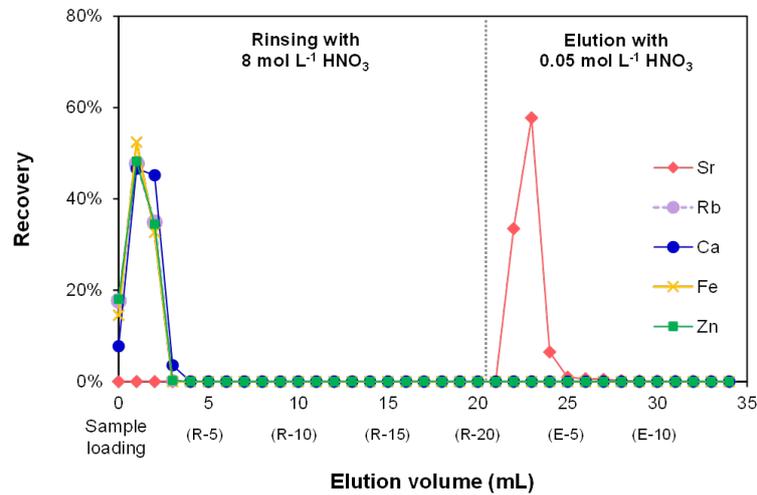


Fig 3. Elution profiles of Sr and matrices obtained from the digested NIST SRM 1567b wheat flour being redissolved in 8 mol L⁻¹ HNO₃. The figure is a modified version of the one published in Ref. 7.

Table 4. Optimized procedures for Sr/matrix separation

ステップ	試薬	試薬容量 (mL)	
		0.4 mL Sr レジン	2.0 mL Sr レジン
1: Sr レジン 洗浄	Milli-Q water	5	20
	0.05 mol L ⁻¹ HNO ₃	5	20
2: コンディショニング	8 mol L ⁻¹ HNO ₃	3	3
3: 試料ロード	8 mol L ⁻¹ HNO ₃	2.5	2.5
4: リンス	8 mol L ⁻¹ HNO ₃	4	20
5: Sr 溶出	0.05 mol L ⁻¹ HNO ₃	1	5

3. 2 MC-ICP-MS を用いた $^{88}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ 測定法の高感度化

$^{88}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ 測定への Jet/X の適用性を検証するため、同位体比標準である NIST SRM 987 の測定値を Standard/H と比較した。また、NIST SRM 987 に Ca を添加した場合に、 $^{88}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ 測定値に及ぼす影響についても比較した。また実試料測定への Jet/X の適用性を検証するため、JCp-1 と FEBS-1 の $^{88}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ 測定を行い比較した。

3. 2. 1 NIST SRM 987 の $^{88}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ 測定値の比較

Fig. 4 に Jet/X コーンと Standard/H コーンを使用した場合の NIST SRM 987 の $^{88}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ 測定値を示した。Jet/X の場合には $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ の NIST SRM 987 に $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ の Zr を添加した溶液を測定した。Jet/X の測定結果は Fig. 4 中で赤い丸で示した。Standard/H の場合には $200 \mu\text{g kg}^{-1}$ の NIST SRM 987 に $400 \mu\text{g kg}^{-1}$ の Zr を添加した溶液を測定した。この結果は Fig. 4 中で青いダイヤモンドで示した。

Jet/X を用いた場合の $^{88}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ 測定値は 0.000 ± 0.023 (mean \pm 2SD, $n = 25$) となり、これは Standard/H を用いた場合の測定値 0.001 ± 0.022 (mean \pm 2SD, $n = 23$) や理論値 (= 0) と良く一致した。測定試料の濃度は Jet/X の方が 4 倍低いにも関わらず、Standard/H の場合と同レベルの測定精度が得られた (Fig. 4)。一方、Standard/H を用いて $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ の NIST SRM 987 を測定した場合には (Fig. 4 中の緑色のダイヤモンド)、測定精度が大幅に低下した。

3. 2. 2 共存 Ca が $^{88}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ 測定値に与える影響の比較

NIST SRM 987 に何通りかの濃度で Ca 元素標準液を添加し、Jet/X を使用した場合と Standard/H を使用した場合では $^{88}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ 測定値に及ぼす影響に違いが出るかを検証した。各コーンの組み合わせを使用して測定した NIST SRM 987 溶液の Sr 濃度は、Jet/X では $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ 、Standard/H では $200 \mu\text{g kg}^{-1}$ に設定した。NIST SRM 987 溶液には、Sr の 2 倍濃度の Zr と様々な濃度の Ca を添加した。Fig. 5 中の丸とダイヤモンドは、それぞれ Jet/X と Standard/H を使用して得られた個々の測定値の平均値を示す。エラーバー個々の測定値 ($n = 3$) の 2SD の範囲を表す。破線は、Ca を添加していない NIST SRM 987 溶液を繰り返し測定した時の $\delta^{88/86}\text{Sr}$ の再現性の範囲を表す。NIST SRM 987 の Sr 濃度と、添加した Ca の濃度比が 10 以下の時、Jet/X と Standard/H の間には測定値に有意な差はなかった。このことから、当初想定された Jet/X は Standard/H よりもスペクトル干渉の影響を受けやすい可能性については、Sr/マトリクス分離が適切に行われ測定試料中の Ca/Sr が 10 以下である場合においては、その可能性が否定された。

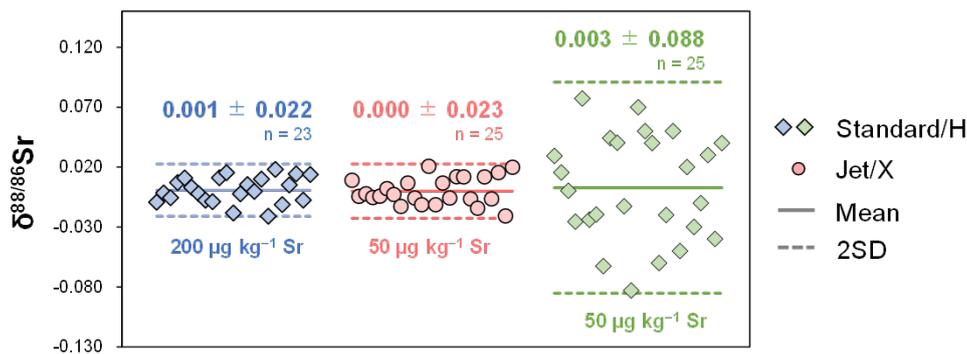


Fig 4. Elution profiles of Sr and matrices obtained from the digested NIST SRM 1567b wheat flour being redissolved in $8 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$. The figure is a modified version of the one published in Ref. 7.

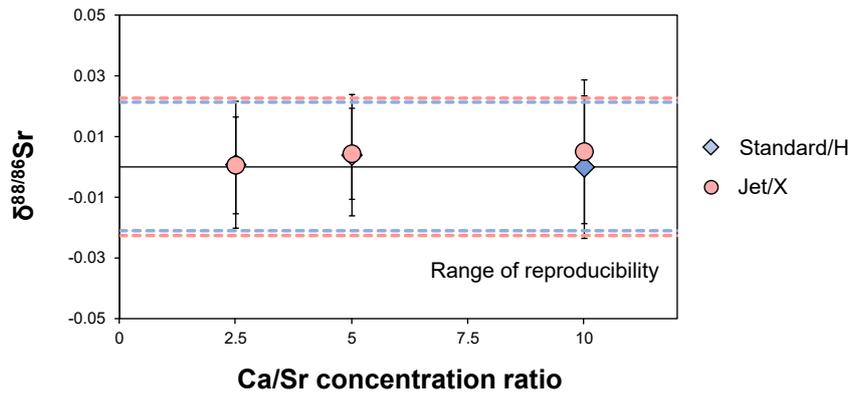


Fig 5. Effect of Ca on measured $\delta^{88/86}\text{Sr}$ values for NIST SRM 987 obtained using Standard/H and Jet/X cone combinations. The figure is a modified version of the one published in Ref. 17.

3. 2. 3 JCp-1 および FEBS-1 の $^{88}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ 測定値の比較

以上のことから、NIST SRM 987 の高精度測定には Jet/X は適用可能であることが示唆された。次に、実試料の $^{88}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ 測定への適用可能性を検証するために、先行研究において数多くの測定値が報告されている JCp-1 と FEBS-1 の $^{88}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ を測定した。JCp-1, FEBS-1 の主成分は CaCO_3 であり、本研究の対象とする試料と組成が類似していることから、適用性の検証には最適と考えた。

測定の結果を **Fig. 6** に示した。Jet/X 使用時の測定値を赤い丸で、Standard/H 使用時の測定値を青いダイヤで

示し、先行研究で報告されている文献値を白い四角で示した。Jet/X による JCp-1 の測定値は 0.194 ± 0.022 (mean \pm 2SD, $n = 18$) となり、Standard/H による測定値 0.191 ± 0.024 (mean \pm 2SD, $n = 14$) ならびに文献値とも良く一致した。FEBS-1 の場合には Jet/X による測定値は -0.058 ± 0.026 (mean \pm 2SD, $n = 19$) となり、Standard/H による測定値 -0.033 ± 0.035 (mean \pm 2SD, $n = 19$) ならびに文献値とも良く一致した。以上のことから、Jet/X は実試料の $^{88}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ 測定へも適用可能であることが示唆された。

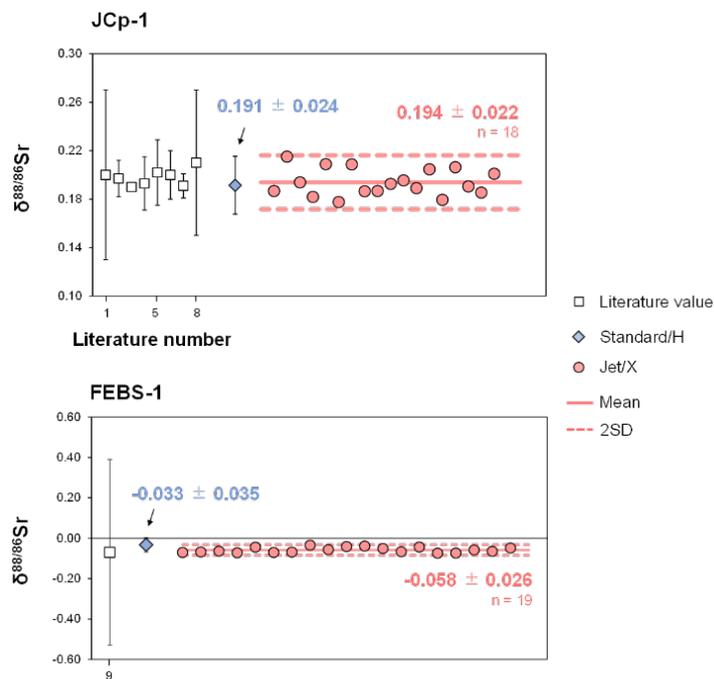


Fig 6. The $\delta^{88/86}\text{Sr}$ values of JCp-1 and FEBS-1 obtained in this study using Standard/H and Jet/X and their comparison with literature data. Literature corresponding to each number is presented here, i.e., 1, Ref. 8; 2, Ref. 9; 3, Ref. 10; 4, Ref. 11; 5, Ref. 12; 6, Ref. 13; 7, Ref. 14; 8, Ref. 15; 9, Ref. 16. The figure is a modified version of the one published in Ref. 17.

3. 2. 4 検出感度の向上

Jet/X コーンと Standard/H コーンを使用した場合の検出感度を比較したところ、Jet/X の使用により検出感度は約 4 倍向上した。これにより、本研究で測定の対象としているごく微量の CaCO₃ 結晶も測定が可能となった。

3. 2 に示した研究成果については論文発表済み¹⁷⁾である。

3. 3 貝殻試料および合成 CaCO₃ 結晶の Sr/マトリクス分離

合成 CaCO₃ 試料ならびに貝殻試料について酸分解を行った後に、3. 1 で示した最適条件で Sr/マトリクス分離を行った。その結果、Table 5 に示した通り、すべての試料について 90%以上の Sr 回収率を達成した。本研究における事前検討によれば、Sr 回収率が 90%以上の場合には Sr/マトリクス分離のステップで起きる同位体分別の影響は無視でき、精確な ⁸⁸Sr/⁸⁶Sr 値が得られることが確認できている。また、Sr 画分に含まれる Rb/Sr 濃度比ならびに Ca/Sr 濃度比を確認したところ、いずれも十分低い値であることが確認できた。以上のことから、合成 CaCO₃ 試料ならびに貝殻試料について良好な Sr/マトリクス分離が達成できたことが示された。

Table 5. Strontium recovery at Sr/matrix separation procedure of each CaCO₃ sample

試料番号	回収率(%)
N1	93
N2	98
N3	95
N4	93
N5	96
N6	92
N7	92
N8	91
N9	92
S1	99
S2	99
S3	99
S4	92
S5	97
S6	97
S7	97
S8	97

4. 今後の課題

2025 年度に貝殻試料および合成 CaCO₃ 結晶の ⁸⁸Sr/⁸⁶Sr 測定を行う予定である。また、これら試料の ⁴⁴Ca/⁴²Ca 測定を行うために必要不可欠な、以下の技術開発も同様にを行う。

(1) ⁴⁴Ca/⁴²Ca 測定における質量差別効果の補正手法の検討: Sr と同様に Ca に関しても質量差別効果の補正手法を検討する必要がある。補正の方法として具体的には、カルシウム元素標準液 NIST SRM 915a を補正溶液として使用する Standard-Sample ブラケティング法の適用を検討する。(2) ⁴⁴Ca/⁴²Ca 測定におけるスペクトル干渉の抑制手法の検討: MC-ICP-MS を用いた ⁴⁴Ca/⁴²Ca 測定では ⁴⁰ArH₂⁺, ¹⁴N₂¹⁶O⁺, ¹⁴N₃⁺等の多原子イオンによるスペクトル干渉の影響が想定されるため、測定条件を最適化しスペクトル干渉の抑制を試みる。

5. 文献

1. A. Paytan *et al.*, *Science*, 2021, **371**, 1346–1350.
2. R. Nakada *et al.*, *Geochem. J.*, 2019, **53**, 293–304.
3. J. Meija *et al.*, *Pure Appl. Chem.*, 2016, **88**, 293–306.
4. C. Durante *et al.*, *Food Chem.*, 2013, **141**, 2779–2787.
5. S. Medini *et al.*, *Food Chem.*, 2015, **171**, 78–83.
6. P. Galler, *et al.*, *Anal. Chem.*, 2007, **79**, 5023–5029.
7. T. Ariga *et al.*, *At. Spectrosc.* 2024, **45** (4), 276–289.
8. T. Ohno and T. Hirata, *Anal. Sci.*, 2007, **23**, 1275–1280.
9. A. Krabbenhöft *et al.*, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2009, **24**, 1267–1271.
10. A. Krabbenhöft *et al.*, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 2010, **74**, 4097–4109.
11. H. Vollstaedt, *et al.*, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 2014, **128**, 249–265.
12. J. Voigt *et al.*, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 2015, **148**, 360–377.
13. N. Fruchter *et al.*, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 2016, **178**, 268–280.
14. J. M. Brazier *et al.*, *Geostand. Geoanal. Res.*, 2020, **44**, 331–348.
15. D. Guiserix *et al.*, *Chem. Geol.*, 2022, **606**, 121000.
16. Z. Yang *et al.*, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2011, **26**, 341–351.
17. T. Ariga *et al.*, *Spectrochim. Acta B*, 2025, **225**, 107134.

Detection of Sr and Ca Stable Isotope Fractionation during CaCO₃ Formation from Seawater to Investigate the Mechanism of Biomineralization

Tomoko Ariga¹, Michio Suzuki², Gen Shimoda³

¹ National Metrology Institute of Japan (NMIJ), National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), ² Department of Applied Biological Chemistry, The University of Tokyo,

³ Geological Survey of Japan (GSJ), National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)

Summary

Marine organisms such as shellfish, sea urchins, and corals efficiently fix calcium ions (Ca²⁺) in seawater as calcium carbonate (CaCO₃) through biomineralization. In this process, species-specific proteins called biomineralization proteins control the crystal polymorphism of CaCO₃. Although controlling the polymorphism of CaCO₃ crystals using biomineralization proteins may lead to the development of a low-cost and highly efficient technology for fixing atmospheric CO₂ as CaCO₃ using Ca in seawater, the mechanism of controlling CaCO₃ crystal polymorphism by biomineralization proteins has not been elucidated. This study aimed to investigate the function of biomineralization proteins by detecting Sr and Ca stable isotope fractionation that occurs during CaCO₃ crystals formation through biomineralization process by several kinds of shellfish and artificially reproduced biomineralization reaction system or in.

Since the magnitude of stable isotope fractionation of Sr and Ca that occurs during CaCO₃ crystal formation is minute, a highly precise and accurate technique for measuring Sr and Ca stable isotope ratios (⁸⁸Sr/⁸⁶Sr and ⁴⁴Ca/⁴²Ca) is essential. Firstly, the following techniques to achieve precise and accurate ⁸⁸Sr/⁸⁶Sr measurement were developed. (1) effective Sr/matrix separation method using Sr resin: to achieve precise and accurate ⁸⁸Sr/⁸⁶Sr measurement using multi-collector inductively coupled plasma mass spectrometry (MC-ICP-MS), highly effective Sr/matrix separation prior to the measurements is essential. In this study, Sr/matrix separation procedure using Sr resin was optimized, resulting in good Sr/matrix separation and high Sr recovery (97 %). (2) Highly sensitive ⁸⁸Sr/⁸⁶Sr measurement method using MC-ICP-MS: since the amount of synthetic CaCO₃ crystals obtained from the artificial biomineralization reaction is extremely small, improvement of the sensitivity of ⁸⁸Sr/⁸⁶Sr measurement using MC-ICP-MS was carried out, resulting in a four-fold increase in sensitivity compared to the conventional method. Finally, the optimized Sr/matrix separation procedure was applied to the synthetic CaCO₃ crystals and shell samples, and effective Sr/matrix separation was achieved.