

## 二重標識水法によるコウノトリのエネルギー消費量推定手法の検討

\* 内藤和明<sup>1</sup>**Applicability of the doubly labeled water method for the estimation of metabolic rate of Oriental White Stork, *Ciconia boyciana***\* Kazuaki Naito<sup>1</sup><sup>1</sup> Graduate School of Regional Resource Management, University of Hyogo / Hyogo Park of the Oriental White Stork

128, Shounji, Toyooka, Hyogo Pref. 668-0814, Japan

\* E-mail: kaznait@stork.u-hyogo.ac.jp

**Abstract** The doubly labeled water (DLW) method, the isotope-based technique used to measure the metabolic rates of animals, was used for Oriental White Stork kept in captivity in individual cages. CO<sub>2</sub> productions of 3 storks were calculated based on the turnover of isotopes (<sup>2</sup>H and <sup>18</sup>O) referring to one-pool and two-pool models. Estimated metabolic rate was 1,512.67 to 1,661.29 kJ day<sup>-1</sup> (average of 3 storks) and it was roughly equivalent to 52.0 to 75.8% of diets supplied before and during experimental period.

**Key words** *Ciconia boyciana*, DLW, Doubly labeled water method, Metabolic rate, Validation

## はじめに

動物のエネルギー消費量を推定する方法として、チャンバーを用いて呼吸による二酸化炭素の排出量を測定し、エネルギー消費量を計算する手法があるが、実験室のような管理された環境での測定となり、通常の飼育施設や野外環境には適用できない。チャンバー法に代わる、日常的な行動が可能な状態での動物のエネルギー消費量を測定するための方法として酸素と水素の安定同位体を用いた二重標識水法 (DLW法) が使われてきた。二重標識水法では次のような原理により動物のエネルギー消費量が測定される。

まず、水素と酸素の安定同位体 (<sup>2</sup>H, <sup>18</sup>O) で標識された水を動物の体内に投与する。投与された同位体は主に呼吸により二酸化炭素 (CO<sub>2</sub>) として、また排泄物等により水 (H<sub>2</sub>O) として体内から少しずつ排出される。この時、<sup>2</sup>Hは水として排出されるのに対して、<sup>18</sup>Oは二酸化炭素と水の両方として排出されるので、<sup>2</sup>Hと<sup>18</sup>Oの除去率の差から二酸化炭素の生産率を推定することができる。これに変換式を適用することでエネルギー消費量が計算される。鳥類ではこれまでに、キンクロハジロ (Bevan et al. 1995)、ウトウ (Shirai et al. 2012a)、オオミズナギドリ (Shirai et al. 2012b)、チョウゲンボウ (Masman et al. 1988)、シュバシコウ (Mata et al. 2010) などのエネルギー消費量が推定されている。

コウノトリは絶滅が危惧される大型鳥類であり、個体数が世界で2,500未満と推定されている (IUCN 2012)。日本では繁殖個体群が一度絶滅したが、兵庫県豊岡盆地で2005年から再導入され (Ezaki et al. 2013)、野外での繁殖の結果2016年1月現在で野外個体数が91個体に達している。また、2015年からは千葉県野田市、福井県越前市でも再導入が実施されている。再導入個体群のモニタリングが随時行われ、繁殖生態 (Ezaki and Ohsako 2012)、遺伝的多様性 (内藤ほか 2012)、長距離移動 (大迫 2016)、食性 (田和ほか 2016) などに着目した研究が実施されてきた。食性に関する研究 (田和ほか 2016) では、コウノトリの採餌環境と採餌した生物の種類が月毎に明らかにされている。しかし、直接観察による記録を元にしており、採餌物を同定できないことや同定できてもサイズが記録できない場合が少なくないため、コウノトリの野外での採餌量を正確に推定することが困難という課題がある。二重標識水法を活用すれば、直接観察の限界を補い採餌量あるいはエネルギー消費量を推定できる可能性がある。その初期段階として、本研究では、飼育個体を用いて二重標識水法によるエネルギー消費量の推定を行い、この方法の適用可能性を検討した。

<sup>1</sup> 兵庫県立大学大学院地域資源マネジメント研究科/兵庫県立コウノトリの郷公園

668-0814 兵庫県豊岡市祥雲寺128

\* E-mail: kaznait@stork.u-hyogo.ac.jp

## 材料と方法

### 1. 二重標識水の投与と採血

供試個体は兵庫県立コウノトリの郷公園で飼育されている、血液採取などのハンドリングに慣れ、健康上特段の問題がない23歳のオス1個体 (J256)、いずれも12歳のメス2個体 (J333, J337) の計3個体とした。これらの個体は縦横5 m × 8 m、高さ4 mのケージでそれぞれ単独で飼育されていた。二重標識水の投与7日前 (2014年12月11日) から最後に採血した日の2日前 (12月24日) までの間の給餌量は、オスについてはドジョウ100g及びマアジ450gの計550g、メスについてはドジョウ100g及びマアジ400gの計500gであった (Table 1)。ただし、二重標識水の投与4日前である12月14日にはいずれの個体にも給餌が行われず、また、最後に採血した日の前日である12月25日のみ、オスについてはドジョウ50g及びマアジ500gの計550g、メスについてはドジョウ50g及びマアジ450gの計500gが給餌された。いずれの個体にも期間中の餌の食べ残しはなかった。

98 atom % <sup>18</sup>O標識水 (大陽日酸, F030027) と99 atom % <sup>2</sup>H標識水 (大陽日酸, 151882) を2 : 1の割合で混合した後、濃度0.9%となるように塩化ナトリウムを溶解した二重標識水を調製した。調製の過程では、前後に精密天秤で容器を計量してそれぞれの物質を0.1mgの精度で測定した。最後に、0.22 μm孔径のフィルターで濾過してオートクレーブで滅菌して保存した。ヘパリンナトリウム溶液で共洗った後に1.2mL程度の二重標識水を吸い込んだシリンジを、投与の直前に供試個体数分準備し運搬用の容器に入れて飼育ケージに持ち運んだ。シリンジを準備する過程の前後に精密天秤で計量し、吸い込んだ二重標識水の量を0.1mgの精度で測定した。

二重標識水の投与は2014年12月18日に行った。供試個

体を捕獲後すぐに体重を測定した後、血液試料 (投与前) を2 mL採取した。次にシリンジに入った二重標識水を液漏れしないように注意しながら腹腔内に注射し、投与時刻を記録した。供試個体をケージ内に一旦解放し、2.06時間後 (以下2時間後と表記) 及び3.57時間後 (以下3.5時間後と表記) にそれぞれ再捕獲して血液試料 (投与後) を2 mLずつ採取した。以後は約48時間間隔で投与後8日までの計4回、個体を捕獲して体重を測定した後、2 mLの血液試料を採取した。

二重標識水投与後のシリンジをコンテナに入れて持ち帰った後に精密天秤で計量し、個体毎の正確な投与量を求めた。また、採取した血液試料は速やかに1.5mLエッペンンドルフチューブに分注して6,200rpmで5分遠心し血球を沈殿させ、上清を別チューブに移した後、精密天秤で計量しながら超純水で約6倍に希釈し測定試料とした。血液試料から調製したこの測定試料及び希釈に用いた超純水の酸素及び水素の安定同位体比を平衡IRMS法により測定した。測定は大陽日酸 (株) に委託した。

### 2. 二重標識水法の計算

同位体の希釈容積 (<sup>2</sup>Hについては $N_d$ 、<sup>18</sup>Oについては $N_o$ 、いずれもmol) 及び個体の推定水分含有量をプラトー法及び切片法により求めた (Speakman 1997)。プラトー法については、投与2時間後及び3.5時間後のそれぞれの同位体濃度を用いて算出した。 $N_d$ 及び $N_o$ の計算には次の式を用いた。

$$N_d = \frac{H_{inj} \times (H_i - H_d)}{H_b - H_i}$$

$$N_o = \frac{O_{inj} \times (O_i - O_d)}{O_b - O_i}$$

ここで、 $N_d$ 及び $N_o$ はそれぞれ<sup>2</sup>H及び<sup>18</sup>Oで推定した希釈容積 (mol) を、 $H_{inj}$ 及び $O_{inj}$ は二重標識水の投与量 (<sup>2</sup>H

Table 1. Tested individuals and their diets before and during experimental period.

Ind	Sex	Birth Date	*Amount of supplied diets per day			
			Dec. 11-13, 2014	Dec. 14	Dec. 15-24	Dec. 25
J256	Male	Mar. 27, 1991	Loach 100g + Horse mackerel 450g	None	Loach 100g + Horse mackerel 450g	Loach 50g + Horse mackerel 500g
J333	Female	Apr. 1, 2002	Loach 100g + Horse mackerel 400g	None	Loach 100g + Horse mackerel 400g	Loach 50g + Horse mackerel 450g
J337	Female	Apr. 6, 2002	Loach 100g + Horse mackerel 400g	None	Loach 100g + Horse mackerel 400g	Loach 50g + Horse mackerel 450g

\* All supplied diets were consumed within each day.

または $^{18}\text{O}$ , mol) を,  $H_b$ 及び $O_b$ はバックグラウンド (二重標識水の投与前) の同位体の濃度 ( $^2\text{H}$ または $^{18}\text{O}$ , ppm) を,  $H_i$ 及び $O_i$ は二重標識水の投与後最初の試料の同位体の濃度 ( $^2\text{H}$ または $^{18}\text{O}$ , ppm) を,  $H_d$ 及び $O_d$ は投与した二重標識水の同位体の濃度 ( $^2\text{H}$ または $^{18}\text{O}$ , ppm) を示す. 各個体について,  $^2\text{H}$ の希釈で求められた希釈容積を $^{18}\text{O}$ の希釈で求められた希釈容積で割ることにより, 希釈容積率 ( $R_{dilspace}$ ) を求めた (Speakman 1997). 体内水分の最初の同位体濃度 ( $^2\text{H}$ または $^{18}\text{O}$ , ppm) を切片法により計算するときには, 投与後2日後から8日後までの計4回の血液試料の同位体濃度から指数関数による回帰式を求めその切片の値を使用した.

$^2\text{H}$ 及び $^{18}\text{O}$ の排出率 ( $k_d$ または $k_o$ ,  $\text{day}^{-1}$ ) は2試料法を用いて次のように計算した.

$$k_d = \frac{\ln(H_i - H_b) - \ln(H_f - H_b)}{t}$$

$$k_o = \frac{\ln(O_i - O_b) - \ln(O_f - O_b)}{t}$$

ここで,  $H_f$ 及び $O_f$ は最後に採取した試料の同位体濃度 ( $^2\text{H}$ または $^{18}\text{O}$ , ppm),  $t$ は二重標識水の投与後最初の試料から最後の試料を採取するまでの時間 (days) である (Lifson and McClintock 1966; Speakman 1997).

$^2\text{H}$ 及び $^{18}\text{O}$ の排出率から二酸化炭素の排出率 ( $r\text{CO}_2$ ) を計算する際には, one-poolモデルとtwo-poolモデルの二つが一般に用いられている (Speakman 1997).  $^{18}\text{O}$ に比較して,  $^2\text{H}$ はタンパク質のアミノ基の水素とより可逆的に交換するために (Culebras and Moore 1977; Matthews and Gilker 1995),  $^2\text{H}$ の希釈により推定された希釈容積は,  $^{18}\text{O}$ に基づく推定値よりも3-4%大きくなるとされる (Schoeller et al. 1986; Speakman et al. 1993). one-poolモデルはこの食い違いを無視して $^{18}\text{O}$ の希釈容積を体水分量とみなして二酸化炭素の排出率を推定し, two-poolモデルは $^2\text{H}$ 及び $^{18}\text{O}$ の排出率を補正する計算式により二酸化炭素の排出率を推定する. 本研究では二つのモデルによる推定値を両方用いて $r\text{CO}_2$ を算出した. one-poolモデルに用いた式は,

$$r\text{CO}_2 = \frac{N}{2.078} (k_o - k_d) - 0.0062 \times k_d \times N$$

two-poolモデルに用いた式は,

$$r\text{CO}_2 = \frac{N}{2.078} (k_o - R_{dilspace} \times k_d) - 0.0062 \times N \times R_{dilspace} \times k_d$$

である (Speakman 1997).  $r\text{CO}_2$  ( $\text{mL CO}_2 \text{ day}^{-1}$ ) からエネルギー消費量への単位の変換は,  $1\text{mL}$ の $\text{CO}_2 = 25.11\text{J}$ と仮定して行った (Gessaman and Nagy 1988). 水分の排出率 ( $rH_2O$ ) は, 呼吸, 皮膚, 及び排泄等を通じた水の消失率に等しい. 本研究では $^2\text{H}$ の排出率を用いて次の計算式により $rH_2O$ を求めた (Bevan et al. 1995).

$$rH_2O = \frac{(N_f - N_i) \times \ln[(H_i \times N_i)(H_f \times N_f)]}{\ln(N_f/N_i) \times t}$$

ここで,  $N_i$ は二重標識水の投与直後の希釈容積を意味し,  $N_o$ の値であると仮定した.  $N_f$ は最後の試料を採取した時の希釈容積を意味し, 二重標識水の投与直後の希釈容積に基づいて計算された体水分率と同じ値であると仮定して, 最後の試料を採取した時の体重から計算された値を用いた.

## 結果と考察

投与後2日後から8日後までの計4回の血液試料の同位体濃度は経過時間と共に指数関数的に減少し, 全3個体とも, また $^{18}\text{O}$ 及び $^2\text{H}$ のいずれも回帰係数は1.000であった (Fig. 1). 投与後初期の $^{18}\text{O}$ 及び $^2\text{H}$ の濃度は, 個体毎に作成した回帰式から計算される値よりも低かった. すなわち, 2時間後あるいは3.5時間後のうち当てはまりの良い方のデータで比べると, 推定よりも実測の方が5~11%小さい値であった. また, J333のみ投与2時間後の安定同位体濃度が3.5時間後よりも高かったのに対し, 2個体については逆であった. この要因として, 3個体の体重の違いが考えられる. 一般に, 投与液が体内で平衡に達するまでの時間は体サイズが大きいほど長くなる (Speakman 1997). J333は3個体中で最も体重が軽かったので, 他の2個体よりも早く平衡に達したと考えられる. よって, プラトー法による推定値については, J333については投与2時間後の安定同位体濃度を基にした値を, 他の2個体については投与3.5時間後の濃度を基にした値を用いることにして3個体のエネルギー消費量の平均を算出し, one-poolモデルによる値とtwo-poolモデルによる値を比較すると, one-poolモデルによる値の方が7.4%高かった. また, 切片法により算出したエネルギー消費量の平均値もone-poolモデルに

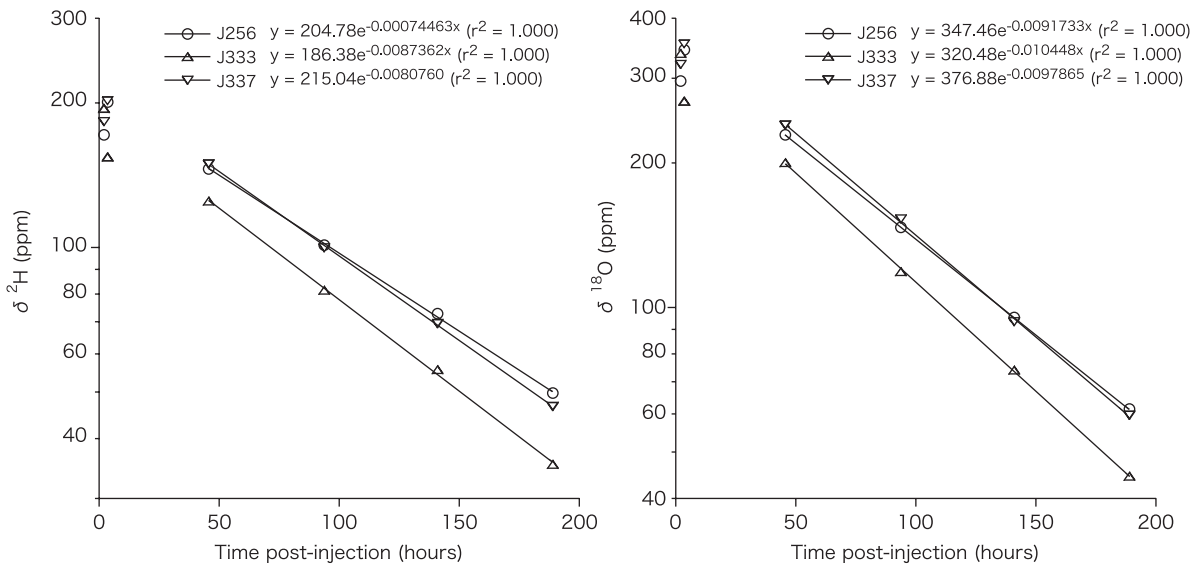


Fig. 1. Change of  $\delta^2\text{H}$  and  $\delta^{18}\text{O}$  enrichment for 3 captive Oriental White Storks. Regression formula was determined based on the enrichments during 2-8 days after injection.

よる値の方が3.8%高かった (Table 2). なお, 体サイズ以外の要因としては, 二重標識水の投与を腹腔内への注射により行ったため, 一部が腹水内あるいは小腸等の消化器内にしばらく留まり, 体内で平衡化するまでに時間がかかった可能性もある. 二重標識水を速やかに平衡化させ, 投与毎のばらつきを小さくするには血管注射による投与の方が良いかもしれない.

コウノトリが必要とする餌量を余裕を見込んで推定するために, プラトー法を用い, かつone-poolモデルによる推定値から検討すると次のようになる. エネルギー消費量の推定値は, 3個体の平均で $1,500.8 \text{ kJ day}^{-1}$  ( $358.7 \text{ kcal day}^{-1}$ )であった. 3個体のうち体重が最大であるJ256 (オス)のエネルギー消費量の推定値は,  $1,733 \text{ kJ day}^{-1}$  ( $414 \text{ kcal day}^{-1}$ )であった. 二重標識水の投与前後に使用した餌であるドジョウとマアジの100g当たりのカロリーはそれぞれ79 kcal (330 kJ) 及び126 kcal (527 kJ)である (文部科学省の食品成分データベースによる). したがって, 最終日前日を除けば概ねオスには $2,759 \text{ kJ day}^{-1}$  (660 kcal), メスには $2,489 \text{ kJ day}^{-1}$  (595 kcal)が給餌されたことになる. エネルギー消費量の推定値は, J256 (オス)では給餌量の62.8%, J333 (メス)では51.9%, J337 (メス)では59.3%に相当した. 供試個体の数が少なく消化率も考慮されていないので正確な予測は困難であるが, 供試個体が比較的狭い個体ケージで飼育されていたことから, 以上の結果は, 冬期で, 飛翔や歩行等の行動が限定的な条件下での野外個体のエネルギー消費量と概ね類似していると推測される. ただし, 本研究では供試期間を通じて安定した量の

給餌が行われたので, 供試個体は飢餓条件を経験していない. 近縁種であるシユバシコウで行われた研究では, 飢餓条件下でエネルギー消費量が27%減少し, 推定基礎代謝量の1.3倍程度になったという報告もあるので (Mata et al. 2010), 野外に生息するコウノトリにおいては冬季に厳しい餌環境に置かれるとエネルギー消費量が大きく変動することもあるかもしれない. 飢餓条件に対するコウノトリのエネルギー代謝の変化や純粋な野外条件でのエネルギー消費量の推定は今後の課題である.

### 謝 辞

供試個体の捕獲および採血等の作業では, 兵庫県立コウノトリの郷公園の三橋陽子獣医師, 船越稔主任飼育員, 石垣理恵飼育員, 小西史郎飼育員, 高島安明飼育員, 西淳市飼育員, 宮村良雄飼育員, 渡辺一憲飼育員の協力を得た. 2名の査読者からは原稿に関して有益な助言をいただいた. 本研究は, 文部科学省科学研究費補助金基盤研究 (C) 26430206の成果である.

### 摘 要

安定同位体を用いてエネルギー消費量を測定する方法である二重標識水 (DLW) 法をコウノトリに適用した. 飼育下の3個体について, one-poolモデル及びtwo-poolモデルによる同位体 ( $^2\text{H}$ 及び $^{18}\text{O}$ )の排出率を計算し, 二酸化炭素排出量を推定してエネルギー消費量に変換した. 求められたエネルギー消費量は, 3個体の平均で $1,500.8 \text{ kJ day}^{-1}$ で, 期間の前後の給餌量の51.9~62.8%に相当していた.

Table 2. Body masses, background isotope level, dose details, isotope dilution spaces, turnover rates, and metabolic rates for three storks used in the DLW analysis.

	J256	J333	J337	Mean	S.E.
Sex	Male	Female	Female		
Initial body mass (kg)	4.55	3.90	4.10	4.18	0.19
Final body mass (kg)	4.75	4.10	4.25	4.37	0.20
Measurement period (day)	7.87	7.87	7.87		
Initial injectate (moles)	0.104	0.079	0.094		
Background enrichment					
$^2\text{H}$ (ppm)	148.04	150.44	150.09	149.52	0.75
$^{18}\text{O}$ (ppm)	1,987.33	1,991.02	1,991.26	1,989.87	1.27
Injectate enrichment					
$^2\text{H}$ (ppm)	311,652.91	311,652.91	311,652.91		
$^{18}\text{O}$ (ppm)	534,638.89	534,638.89	534,638.89		
Initial enrichment determined by plateau method (2 hrs after the injection)					
$^2\text{H}$ (ppm)	319.67	345.07	333.03	332.59	7.34
$^{18}\text{O}$ (ppm)	2,283.60	2,329.12	2,312.10	2,308.27	13.28
Initial enrichment determined by plateau method (3.5 hrs after the injection)					
$^2\text{H}$ (ppm)	349.01	304.69	352.00	335.23	15.30
$^{18}\text{O}$ (ppm)	2,331.36	2,259.68	2,345.03	2,312.02	26.47
Initial enrichment determined by intercept method					
$^2\text{H}$ (ppm)	352.82	336.82	365.13	351.59	8.19
$^{18}\text{O}$ (ppm)	2,334.79	2,311.50	2,368.14	2,338.14	16.43
Final enrichment					
$^2\text{H}$ (ppm)	197.80	185.78	196.75	193.44	3.85
$^{18}\text{O}$ (ppm)	2,048.79	2,035.52	2,050.87	2,045.06	4.81
Body water pool determined by plateau method (2 hrs after the injection)					
$N_d$ (moles)	187.97	126.14	160.43	158.18	17.88
$N_o$ (moles)	186.19	124.16	156.41	155.59	17.91
% Total body water ( $^{18}\text{O}$ )	73.72	57.35	68.73	66.60	4.84
Dulution ratio ( $R_{dilspace}$ )	1.010	1.016	1.026	1.017	0.005
$K_d$ ( $\text{day}^{-1}$ )	0.1590	0.2191	0.1754	0.1845	0.0179
$K_o$ ( $\text{day}^{-1}$ )	0.2020	0.2604	0.2162	0.2262	0.0176
Water efflux rate ( $\text{mL day}^{-1}$ )	192.36	167.67	180.66	180.23	7.13
Metabolic rate estimated by one-pool model					
(kJ $\text{day}^{-1}$ )	2,063	1,293	1,628	1,661.3	222.9
(kcal $\text{day}^{-1}$ )	493	309	389	397.1	53.3
Metabolic rate estimated by two-pool model					
(kJ $\text{day}^{-1}$ )	1,986	1,174	1,434	1,531.5	239.2
(kcal $\text{day}^{-1}$ )	475	281	343	366.0	57.2
Body water pool determined by plateau method (3.5 hrs after the injection)					
$N_d$ (moles)	160.50	159.18	145.34	155.01	4.85
$N_o$ (moles)	160.33	156.27	141.84	152.81	5.61
% Total body water ( $^{18}\text{O}$ )	63.48	72.19	62.32	66.00	3.11
Dulution ratio ( $R_{dilspace}$ )	1.001	1.019	1.025	1.015	0.007
$K_d$ ( $\text{day}^{-1}$ )	0.1807	0.1908	0.1897	0.1871	0.0032
$K_o$ ( $\text{day}^{-1}$ )	0.2230	0.2328	0.2306	0.2288	0.0030
Water efflux rate ( $\text{mL day}^{-1}$ )	200.55	166.23	183.84	183.54	9.91
Metabolic rate estimated by one-pool model					
(kJ $\text{day}^{-1}$ )	1733	1672	1477	1627.1	77.1
(kcal $\text{day}^{-1}$ )	414	400	353	388.9	18.4
Metabolic rate estimated by two-pool model					
(kJ $\text{day}^{-1}$ )	1724	1520	1295	1512.7	123.9
(kcal $\text{day}^{-1}$ )	412	363	309	361.5	29.6
Body water pool determined by intercept method					
$N_d$ (moles)	157.52	131.72	136.46	141.90	7.93
$N_o$ (moles)	158.74	130.99	133.14	140.96	8.91
% Total body water ( $^{18}\text{O}$ )	62.85	60.51	58.50	60.62	1.26
Dulution ratio ( $R_{dilspace}$ )	0.992	1.006	1.025	1.008	0.009
$K_d$ ( $\text{day}^{-1}$ )	0.1797	0.2112	0.1941	0.1950	0.0091
$K_o$ ( $\text{day}^{-1}$ )	0.2200	0.2508	0.2342	0.2350	0.0089
Water efflux rate ( $\text{mL day}^{-1}$ )	198.84	167.52	180.66	182.34	9.08
Metabolic rate estimated by one-pool model					
(kJ $\text{day}^{-1}$ )	1,633	1,306	1,358	1,432.3	101.6
(kcal $\text{day}^{-1}$ )	390	312	324	342.3	24.3
Metabolic rate estimated by two-pool model					
(kJ $\text{day}^{-1}$ )	1,694	1,263	1,181	1,379.3	159.0
(kcal $\text{day}^{-1}$ )	405	302	282	329.7	38.0

キーワード コウノトリ, DLW, 二重標識水法, 代謝量, 有効性

## 引用文献

- Bevan RM, Speakman JR, Butler PJ (1995) Daily energy expenditure of tufted ducks: a comparison between indirect calorimetry, doubly labelled water and heart rate. *Functional Ecology*, 9:40–47.
- Culebras JM, Moore FD (1977) Total body water and the exchangeable hydrogen. I. Theoretical calculation of nonaqueous exchangeable hydrogen in man. *American Journal of Physiology*, 232:R54–59.
- Ezaki Y, Ohsako Y (2012) Breeding biology of the Oriental White Stork reintroduced in Central Japan —Effects of artificial feeding and nest-tower arrangement upon breeding season and nesting success—. *Reintroduction*, 2:43–50.
- Ezaki Y, Ohsako Y, Yamagishi S (2013) Re-introduction of the oriental white stork for coexistence with humans in Japan. In Soorae PS (ed) *Global Re-introduction Perspectives: 2013*. IUCN/SSC Reintroduction Specialist Group (RSG) & Environment Agency-ABU, Dhabi, pp. 85–89.
- Gessaman JA, Nagy KA (1988) Energy metabolism: errors in gas-exchange conversion factors. *Physiological Zoology*, 61:507–513.
- IUCN (2012) IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.1.
- Lifson N, McClintock R (1966) Theory of use of the turnover rates of body water for measuring energy and material balance. *Journal of Theoretical Biology*, 12:46–74.
- Masman D, Daan S, Beldhuis HJA (1988) Ecological energetics of the kestrel: daily energy expenditure throughout the year based on time-energy budget, food intake and doubly labeled water methods. *Ardea*, 76:64–81.
- Mata A, Massemin-Challet S, Caloin M, Michard-Picamelot D, Le Maho Y (2010) Seasonal variation in energy expenditure and body composition in captive White Storks (*Ciconia ciconia*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 155:19–24.
- Matthews DE, Gilker CD (1995) Impact of 2H and 18O pool size determinations on the calculation of total energy expenditure. *Obesity Research*, 3 (Suppl.1) :21–29.
- 内藤和明・西海 功・大迫義人 (2012) 豊岡の飼育下および野外のコウノトリの遺伝的多様性と繁殖計画への示唆. *野生復帰*, 2:57–62.
- 大迫義人 (2016) コウノトリの10羽の集団による長距離移動の例. *野生復帰*, 4:69–73.
- Schoeller DA, Ravussin E, Schutz Y, Acheson KJ, Baertschi P, Jéquier E (1986) Energy expenditure by doubly labeled water: validation in humans and proposed calculation. *American Journal of Physiology*, 250:R823–R830.
- Shirai M, Ito M, Yoda K, Niizuma Y (2012a) Applicability of the doubly labelled water method to the rhinoceros auklet, *Cerorhinca monocerata*. *Biology Open*, 1:1141–1145.
- Shirai M, Yamamoto M, Ebine N, Yamamoto T, Trathan PN, Yoda K, Oka N, Niizuma Y (2012b) Basal and field metabolic rates of Streaked Shearwater during the chick-rearing period. *Ornithological Science*, 11:47–55.
- Speakman JR, Nair KS, Goran MI (1993) Revised equations for calculating CO<sub>2</sub> production from doubly labeled water in humans. *American Journal of Physiology*, 264:E912–E917.
- Speakman JR (1997) *Doubly labelled water. Theory and practice*. Chapman & Hall, London, 399 p.
- Speakman JR (1998) The history and theory of the doubly labeled water technique. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 68 (suppl) :932S–938S.
- 田和康太・佐川志朗・内藤和明 (2016) 9年間のモニタリングデータに基づく野外コウノトリ *Ciconia boyciana* の食性. *野生復帰*, 4:75–86.

(2017年 2月28日受理)