



## 酸性霧の樹冠への沈着と森林衰退

井川 学<sup>\*</sup>、松本 潔<sup>\*\*</sup>、大河内 博<sup>\*\*\*</sup>

### Acid fog deposition on canopy and forest decline

Manabu IGAWA,<sup>\*</sup> Kiyoshi MATSUMOTO,<sup>\*\*</sup> and Hiroshi OKOCHI<sup>\*\*\*</sup>

#### 1. 緒言<sup>\*</sup>

かつてわが国は、1960 年をピークとする高い二酸化硫黄濃度のために森林が衰退したが、その後は二酸化硫黄による激しい衰退は終了した。その典型例が丹沢大山のモミである。しかし、1980 年以降、これとは別の地域での新たな衰退が始まり、丹沢山塊山頂のブナ林は枯木のオブジェと化している。一方で、丹沢山塊北側斜面では美しいブナ林が今も広がっており、衰退の地理的依存性は極めて大きい。このような森林衰退の及ぼす環境影響は極めて大きく、生態系破壊、水資源の枯渇ばかりでなく、山塊の崩壊にもつながる。この地域では玄倉川での急な出水のために、多くの犠牲者を出した水難事故が記憶に新しいが、ブナは保水能力が大きいのでその衰退を放置するなら同様な事故は今後もさらに頻発するであろう。このように森林衰退は極めて深刻な問題であるにもかかわらず、その原因解明はこれまでなされておらず、適切な改善策も得られていない。

研究代表者は既に、酸性霧の実態と森林衰退への影響に関する研究を 20 年近く続けている。これまでの研究から、丹沢で起こりうる pH3 の酸性霧の長期暴露により、ブナが枯れることを明らかにした。このような事象の発生機構を明らかにすることは極めて重要な課題であるため、これを 19 年度から 20 年度までの工学研究所の共同研究として行った。

平成 19 年度には、次のような研究を行なった<sup>1)</sup>。

#### 1. 酸性霧の成分分析と濃度支配要因の解明

丹沢大山をフィールドとして霧水の成分分析によって

霧の特徴とその酸性化機構を解明した。特に霧水の粒径分布の時間変動を検討した。

#### 2. 丹沢大山の林内雨と樹幹流の分析

丹沢大山のモミ、ブナおよび被害を受けていないスギの樹冠下で林内雨、樹幹流を採取分析し、溶脱する金属イオンごとの特徴を明らかにした。

#### 3. 実験室における疑似酸性霧暴露実験

正常なブナ苗木に酸性溶液を暴露し、枝葉からの溶脱成分をフィールドと同様な手法で分析した。また、膜に結合したカルシウムは酸によりどれだけ溶脱するかを、蛍光顕微鏡を用いて明らかにした。

平成 20 年度はさらに、次のテーマの研究を行った。

#### 1. 酸性霧の成分分析と濃度支配要因の解明

新たに測定項目を増やすとともに、霧沈着量の支配要因について解析を進めた。また、視程の変化も常時観測した。

#### 2. 丹沢大山のモミの林内雨と樹幹流の分析による酸性霧へのモミの応答の把握

初年度の分析に加えて、林内雨液量と組成を、雨のとき、霧のとき等で詳細に検討した。また、有機物の成分分析も行った。

#### 3. 実験室における疑似酸性霧暴露に対する苗木の応答

これまでの暴露条件に加えて、オゾンの暴露も開始した。暴露後に、葉の内部構造、組成の変化について SEM-EDX、IR 等の機器により詳細に解明した。

この研究遂行により目標とする到達点としては、丹沢大山における大気汚染物質および酸性霧沈着実態の把握、発生源ごとの汚染の寄与度の解明、酸性霧による衰退のメカニズムの解明、樹種による酸性霧への抵抗性の違いの解明である。以下に、今年度の研究成果を中心にこれまでに明らかになったことを述べる。将来的にはさらに、汚染源からどのように酸性物質が生成し拡散しているか、

<sup>\*</sup>教授 物質生命化学科

Professor, Dept. of Material and Life Chemistry

<sup>\*\*</sup>准教授 山梨大学

Associate professor, Yamanashi University

<sup>\*\*\*</sup>教授 早稲田大学

Professor, Waseda University

その山岳地形依存性はどうか、丹沢にはこれまでにどれだけ汚染物質が沈着したのか、このまま汚染物質の影響が継続するなら生態系はどのように変わるのか、健全な生態系を維持するためにどの程度まで大気汚染に対する規制を強めることが必要なのか、等についても明らかにしていきたい。

## 2. 実験

### 2.1 大山でのフィールド観測

霧水試料は関東平野南西部に位置する丹沢山塊の東端、大山(標高 1252 m)の中腹に位置する大山阿夫利神社下社(標高 680 m)で、自動霧水採取装置とパッシブ霧水採取装置を用いて採取した。得られた試料は吸引ろ過(孔径  $0.2\mu\text{m}$  メンブランフィルター)し分析に供した。また、気象状況を把握するため、中腹において降雨強度、風向風速、気温、湿度を観測した。麓の大気汚染物質濃度については伊勢原市役所の常時監視測定データを用いた。また、大山の南東斜面、標高 400 m–1252 m (山頂)間の各標高において、林外雨、スギおよびモミの林内雨と樹幹流、霧、ガスを約 1 ヶ月毎に採取した。また、890m 地点ではモミ林内雨の方角による沈着量差について検討するため、1 本のモミの樹幹の周囲の 3 ヶ所(北、南、西)に林内雨採取器を設置した。680 m 地点では沢水を約 1 週間毎に採取した。

これらの試料は吸引濾過処理を行った後に、導電率および pH は、それぞれ伝導率計、pH 計により測定を行った。また、主要無機イオンはイオンクロマトグラフ(IC)、中性糖(アルジトールアセテート誘導体)はガスクロマトグラフ(GC)<sup>2)</sup>、ウロン酸は紫外可視分光光度計(UV-VIS)<sup>3)</sup>、ホウ素は誘導結合プラズマ発光分光光度計(ICP-AES)により定量した。また、気象場の把握を行なうために、風向風速、降雨強度、温湿度の観測も行なった。

### 2.2 エピクチクラワックスや植物細胞壁成分に対する酸性霧の影響

葉面を保護するエピクチクラワックスの流亡や変質過程、植物細胞壁成分への酸性霧の影響を調査するために、9年生モミ苗木から採取した枝葉に対し硝酸でpH調整した擬似酸性霧(SAF)を小型チャンバー( $0.6\text{ m}\times 0.6\text{ m}\times 高さ 0.9\text{ m}$ )の中で曝露し、接触溶液を一定時間毎に回収した。葉表面におけるワックスの状態を走査型電子顕微鏡(SEM-EDX)により観察した後に、ワックスをクロロホルムにより抽出し<sup>4)</sup>、フーリエ変換赤外分光光度計(FT-IR)やサイズ排除クロマトグラフ(SEC)、GCにより分析した。なお、接触溶液中の塩基性陽イオンや中性糖、ウロン酸およ

びホウ素は、フィールド試料と同様に測定した。また、酸性霧処理した針葉から細胞壁をアルコール不溶性画分(AIR)として抽出し、細胞壁内のホウ素の存在形態をSECにより測定した<sup>5)</sup>。

### 2.3 モミおよびスギ針葉中のmCa、全葉内カルシウム(tCa)に対する酸性霧の影響

9年生モミ苗木に対し2007年5月から2008年7月(1–3月、8月を除く)まで、硝酸でpH調整したSAFを大型チャンバー( $2.4\text{ m}\times 2.4\text{ m}\times 高さ 1.8\text{ m}$ )の中で1週間に4時間の曝露を行った。また、比較検討のために大山で衰退が確認されていないスギ(7年生苗木)についても同様な処理を行った。酸性霧処理した針葉は、ミクロトームにより断面厚 $50\mu\text{m}$ にカットし、この断面を蛍光プローブであるクロルテラサイクリン(CTC)により染色した。画像撮影は、一定条件下で正立型蛍光顕微鏡システムと自動露光制御備えたカメラにより行い、画像解析ソフトで撮影した画像の蛍光輝度を測定することにより葉内のmCa変化を評価した<sup>6)</sup>。また、tCaについては湿式分解法により測定した<sup>7)</sup>。

### 2.4 酸性霧の単独或いは $\text{O}_3$ との複合ストレスに対するブナ苗木の生長および生理応答

酸性霧の単独影響を調査するために、7年生ブナ苗木に対し2004年9月から2006年7月(1–3月、8月を除く)まで硝酸でpHを調整した溶液を大型チャンバー( $1.8\text{ m}\times 1.5\text{ m}\times 高さ 1.6\text{ m}$ )の中で1週間に4時間の曝露を行った。その影響については、樹高、幹直径、葉数、葉面積、炭素蓄積量および乾物生長量を測定することにより評価した。また、酸性霧と $\text{O}_3$ との複合影響を調査するために、3年生ブナ苗木に対し2007年5月から2008年7月(1–3月、8月を除く)まで、硝酸でpH調整したSAFを大型チャンバー( $2.4\text{ m}\times 2.4\text{ m}\times 高さ 1.8\text{ m}$ )の中で1週間に4時間の曝露を行った。また、 $\text{O}_3$ の曝露は2007年9月から2008年7月(1–3月を除く)に行い、 $60\text{ nl l}^{-1}$ で1週間に28時間の曝露を行った。なお、複合ストレスに対するブナ苗木の応答は、乾物生長量、デンプン含有量および葉内の無機イオン濃度の測定等により評価した。

## 3. 結果および考察

### 3.1 大山で観測される雨と霧の特徴

図1に林外雨(以下全て、試料は特に断らない限り2007年12月12日から2008年12月21日まで)の体積加重平均による沈着量、pH、成分割合、降水量を示した。大山での降水量は940 m地点でやや低いものの、標高による変化は小さかった。沈着量をみると890 m地点の沈着量が多いが、こ

これは採取器の上方に樹木の枝葉があり、この影響で $K^+$ の沈着量が増加したためである。890 mを除くと標高による沈着量変化は見られない。pHについても樹冠からの溶脱イオンの影響を受ける890 m地点以外は、ほぼ同じpHを示した。

図2に林内雨の体積加重平均による沈着量、pH、成分割合、降水量を示した。林外雨の降水量は標高依存性を示さなかったが、林内雨はモミ、スギ共に標高の増加により降水量の増加が確認された。これは霧水によるもので、高い標高では霧の発生頻度が増すことと風速が増大するためだと考えられる。大山では1062 m地点は後述するように、パッシブサンプラーによる霧水採取量が非常に多いため、霧の影響が強いものと思われる。また、林内雨による沈着量はモミ、スギ共に標高依存性を示し、林内雨降水量に依存する結果となった。

モミ、スギともに林内雨のpHは標高の上昇と共に低下していた。これは標高の上昇に伴い $SO_4^{2-}$ や $NO_3^-$ といった大気汚染物質を含み酸性度の高い霧水の影響が増すためだと考えられる。モミとスギではスギの方が沈着量が大きくpHも低いのは、衰退したモミとの樹勢の違いによると思われる。

図3に霧水の成分濃度、pH、成分割合、採取量を示した。採取量は1062 m地点において一番多かった。1062 m地点は尾根上にあり地形的な影響で霧の影響を受けやすく、このため採取量が極端に多かったと考えられる。

pHでは、標高が高くなると低下する傾向が見られた。また、1252 mの北側と南側ではpHに大きな違いが無かったが、南側の方が成分濃度は高く液量は少ない。これは、北側は前面に樹木があるため、採取地点で霧が薄くなることによると思われる。化学組成では大きな標高依存性がなかった。940 m地点と1252 m地点における霧水量の差はあまりないが、成分濃度では、1252 m地点の方が高く、高い標高の霧でも高濃度であることがわかる。

どの標高の試料にも海塩粒子である $Na^+$ 、 $Cl^-$ が多く含まれているが、本研究では霧水採取をパッシブサンプラーで採取しているため粗大な海塩粒子の乾性沈着の影響を受け易いと考えられる。

湿性沈着物中には有機炭素だけでなく有機窒素が溶けており、この溶存有機窒素はタンパク質、ペプチド、アミノ酸、尿素などが主であるがその詳しい成分はよく知られていない。図4に2008年4月22日から12月21日までの間に採取した各試料中の溶存有機物質と溶存無機イオンの濃度を示す。溶存有機物質は特に樹幹流から多く検出された。有機窒素は樹幹流や林内雨で高く、季節ごとに見ると7月を中心に高い値が示された。有機窒素は植物由来であると思われるが、7月は林外雨や霧でも

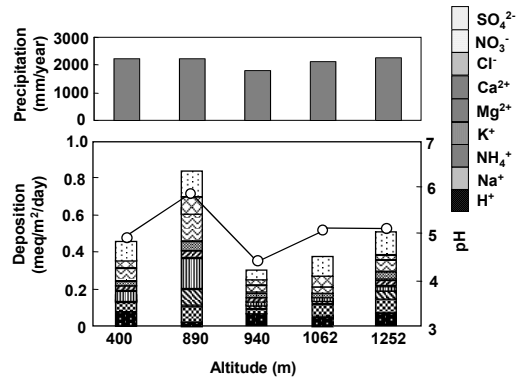


Fig. 1 Deposition of rainfall at different altitudes in Mt. Oyama in 2008.

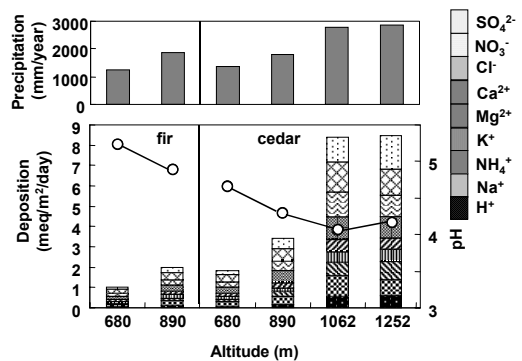


Fig. 2 Deposition of throughfall at different altitudes in Mt. Oyama in 2008.

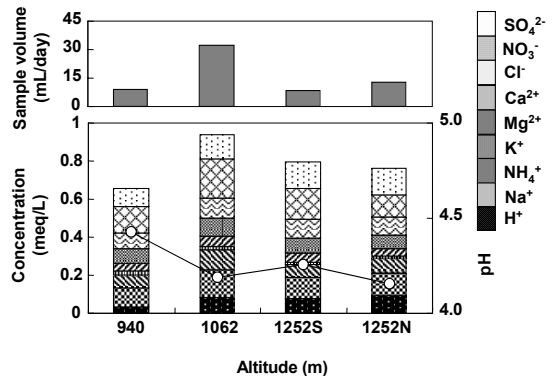


Fig. 3 Fog-water concentration at different altitudes in Mt. Oyama in 2008.

高い濃度になった。

ガス成分濃度の標高分布については、全体にばらつきがあるが $NH_3$ ガス濃度は標高の上昇に伴って減少している。 $NH_3$ ガスは都市部や農村部で濃度が高く、これらの地域が

ら離れるにつれて減少するものと考えられる。 $\text{HNO}_3$ ガスは標高の上昇に伴い減少していた。これは $\text{NO}_x$ の酸化により生じた $\text{HNO}_3$ ガスが斜面を上っていく際に霧などに沈着し、除去されていることを示唆している。 $\text{SO}_2$ と $\text{HCl}$ ガスは標高の上昇に伴い増加する傾向を示した。 $\text{SO}_2$ は乾性沈着速度が小さく、沈着しにくいこと、 $\text{HCl}$ ガスは酸性ガスと海塩粒子との反応による発生が考えられるが、都市部の上層気塊の移流が標高の高いところほど影響を与えていることも考えられる。

### 3.2 大山の気象要因

大山では標高680 m（谷部）、1062 m（尾根上）、1252 m（山頂）の3地点に風向風速計を設置している。各地点における風向には特徴があり、680 mでは谷に沿う方向、1062 m（尾根上）では尾根を横切る方向からの風が多く、1252 m（山頂）では風向が南側にまとまり特に南西と南東からの風が多い。1252 m地点において風向が南側にまとまっているのは、観測装置が山頂の南斜面側に設置されているためと考えられるが、谷に沿って流れてきた風を観測していることによる。

各標高の平均風速は1062 mが大きい場合がほとんどである。季節別の平均風速を見ると、夏季において1252 mの風速が1062 mよりも若干高くなる傾向を示したが、その他の季節では1252 mの風速よりも1062 mが上回る。1062 mにおける風向は、冬季から夏季にかけては南西、南南西からの寄与が大きいが、秋季には北東からの寄与が大きくなる。北東からの風は南西、南南西からの風よりも風速が強い傾向があり、秋季の平均風速は風向の頻度の違いの影響を受けたと考えられる。

大山の標高400 m、680 m、890 m、1062 m、1252 mの5地点で温度測定も行った。一般に山間部での気温は標高の上昇とともに低下する。しかし大山では日中において逆転している地点があった。890 m地点は森の中のため、他の地点に比べ、日中と夜間と気温差が小さかった。また、400 m地点と山頂1252 m地点の温度差は夜間よりも日中の方が大きかった。

図5に2008年後期(9/5-9/18、11/2-12/21)の山頂における視程計のデータによる霧発生イベントの時間帯別発生頻度を示した。一般に霧は夜間の方が発生しやすいと言われているが、大山では日中の方が霧発生時間が長い。これは、大山では夜間よりも日中の方が山頂と麓との気温差が大きいことが関係していると考えられる。

山頂における霧イベント発生と風向との関係では、無風時の発生が一番多かったが、風向判別可能な時では南西の風が一番多く、次いで北西の風が多かった。

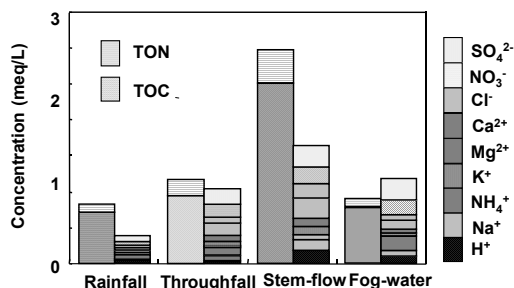


Fig. 4 Concentration of various components at different wet deposition in Mt. Oyama (Apr. 2008 to Dec. 2008).

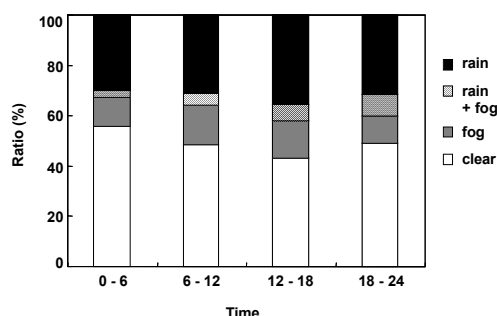


Fig. 5 Frequency of fog and rain at the top of Mt. Oyama.

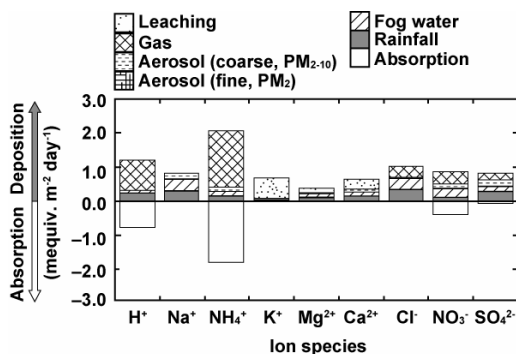


Fig. 6 Contribution of each deposition pathway to throughfall chemistry based on the measurement for a fir stand at 680 m altitude.

### 3.3 森林樹冠への沈着寄与度

森林床に到達した降水の化学組成は、(1) 森林樹冠からの水分蒸発、(2) 葉表面に付着した乾性沈着物の洗浄、(3) 樹冠への成分吸収或いは樹冠からの成分溶脱により影響を受ける<sup>8)</sup>。2004年のフィールド観測結果に基づき、大山中腹（標高700 m）におけるモミ樹冠下の林内雨成分沈着量に対する霧水、林外雨、エアロゾルおよびガスの寄与度を樹冠収支法により見積もり、その結果を図6に示した。

H<sup>+</sup>およびNH<sub>4</sub><sup>+</sup>はそのほとんどが大気ガス由来であり、林内雨沈着フラックスの70%以上を占めていた。一般的に、NH<sub>3</sub>ガスは畜産、化学工場、生物呼吸および微生物分解を発生源としており、雨水や霧水の酸性度を低下させる最も重要な成分である。NO<sub>3</sub><sup>-</sup>およびSO<sub>4</sub><sup>2-</sup>は湿性沈着、乾性沈着共にほぼ同程度の割合を占めており、これらのイオン種の排出源は主に工業地帯の固定発生源や自動車をはじめとする交通手段の移動発生源からのNO<sub>x</sub>やSO<sub>2</sub>である。現在、我が国において観測される霧水の酸性度にはHNO<sub>3</sub>が大きく関与しているが、これに対する沈着寄与は大山中腹で低い方からエアロゾル (PM<sub>2.5</sub>, 1%)、エアロゾル (PM<sub>2.5-10</sub>, 14%)、林外雨 (14%)、霧水 (29%)、ガス (42%)の順であった。樹冠から溶脱した無機イオン成分はK<sup>+</sup>、Mg<sup>2+</sup>およびCa<sup>2+</sup>であり、これらの総溶脱量(K<sup>+</sup>+Mg<sup>2+</sup>+Ca<sup>2+</sup>)は、H<sup>+</sup>吸収量とほぼ等しい。また、林内雨沈着フラックスへの各溶脱成分が占める割合は、K<sup>+</sup>、Mg<sup>2+</sup>およびCa<sup>2+</sup>でそれぞれ92, 35, 46%であった。

### 3.4 エピクチクラワックスに対する酸性霧の影響

植物葉が空気に触れる表面部分は、エピクチクラワックスと呼ばれるクロロホルム可溶性非揮発性の脂質層で覆われている。このワックス層は、水分の損失を抑制しており、これによって植物は陸上で生存が可能となっている。pH 2, 3, 5に調整したSAFの曝露後、モミおよびスギ針葉の表面エピクチクラワックスの状態をSEMにより観察し、その結果を図8に示した。これより、SAFのpH低下に伴いモミ針葉表面の損傷が大きくなることが観察され、特にpH 2

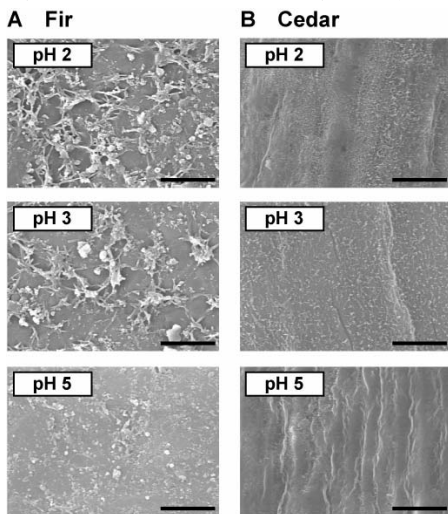


Fig. 7 Scanning electron micrographs of the leaf surface of fir (A) and cedar (B) exposed to SAF at pH 2, 3, and 5. The SAF were nitric acid with ammonium sulfate and sodium chloride. Scale bar is 10  $\mu$ m.

処理区ではワックスの層厚が減少し下層部位が露出していることも確認された。このような変質は葉表面の親水性を増加させ、結果として濡れ性上昇の要因となる<sup>9)</sup>。また、紫外線に対する防御力の低下や病害虫・微生物に対する抵抗力の低下、クチクラ蒸散や栄養塩類の溶脱等が促進されることが考えられる。一方、スギ針葉では著しい流亡や変質現象が確認されなかった。このことから、ワックスの流亡や変質の度合は、霧水の酸性度に依存すると共に樹種により大きく異なることが新たに明らかとなった。

図8にはSAFのpHと抽出したエピクチクラワックス量との関係を示した。モミ針葉中のワックス量は、SAFの酸性度の増加に伴い減少傾向を示しており、pH 5処理区に比べpH 2処理区で有意に減少した ( $P < 0.05$ )。これは、葉面への酸性霧液滴の沈着によりワックスが溶解したためであるが、スギではpHの低下によるワックス量の減少は確認されなかった。図9にモミおよびスギ針葉から抽出したワックスのSECクロマトグラムを示した。モミではSAFのpHの低下に伴い主に低分子量領域の成分が溶解しており、これら

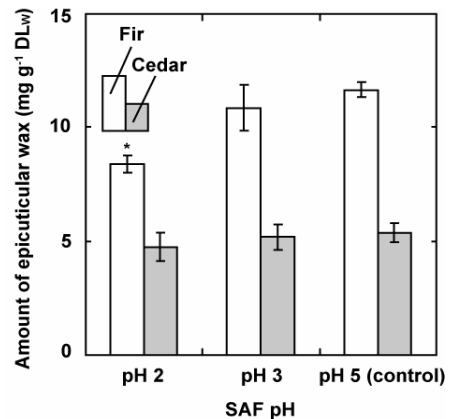


Fig. 8 Effect of pH of SAF on the amount of epicuticular wax.

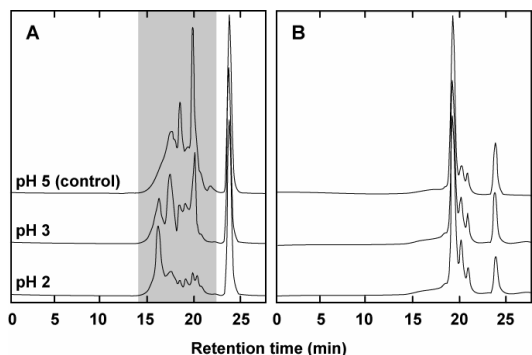


Fig. 9 SEC chromatogram of the epicuticular wax in fir (A) and cedar (B) treated with SAF at pH 2, 3, and 5.

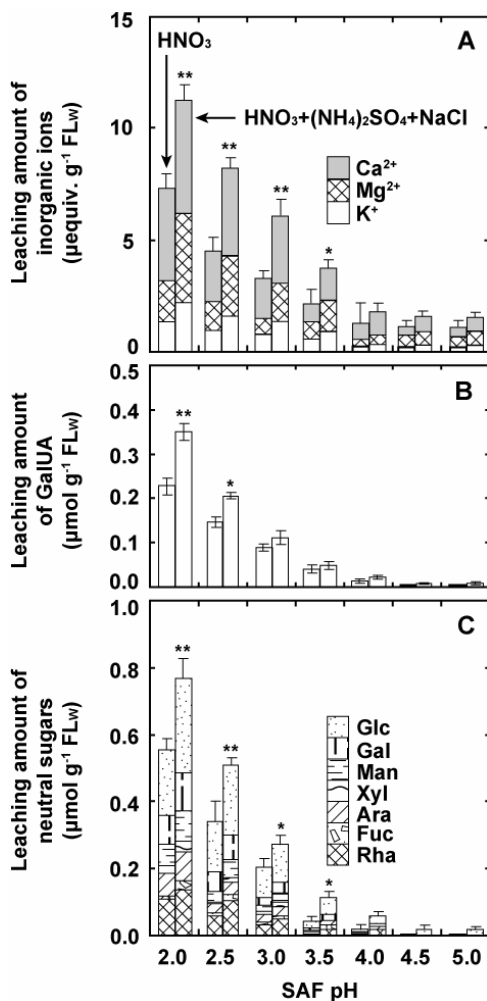


Fig. 10 Effect of pH of SAF on the concentrations of base cations (A), uronic acid (B), and neutral sugars (C) leached from the needles.

の溶解成分は親水性の低級アルコールであろうと推測される。一方、スギではワックス量に変化が見られなかったように、分子量分布でも霧水酸性度の影響は確認されなかった。また、分子量校正曲線を使用して算出されたモミおよびスギの分子量分布は、それぞれ200–3500、100–800 g mol<sup>-1</sup>であった。このように、酸性霧によるワックスの溶解性やその構成成分がモミとスギで異なっており、このことが樹種による耐酸性の違いとして現れると考えられる。

### 3.5 溶脱量や植物細胞壁成分に対する酸性霧の影響

モミ針葉に対するSAFの曝露終了後に、枝葉に接触したSAF溶液を回収し、葉からの成分溶脱量を測定した。6時間曝露処理後のSAFのpHと無機イオン、中性糖およびウロン

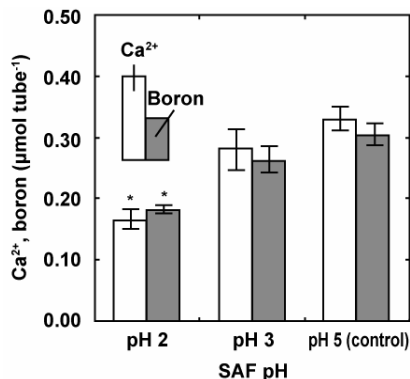


Fig. 11 Effect of SAF pH on Ca<sup>2+</sup> and boron contents in dRG-II-B. \*, significant at  $P < 0.05$ .

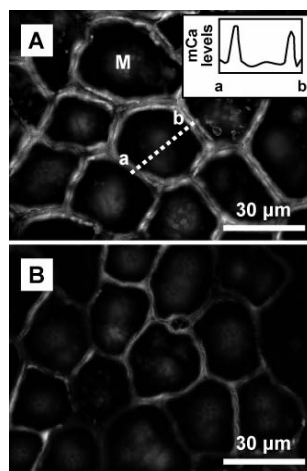


Fig. 12 Digitally acquired images showing treatment effects on mCa in current-year fir needles. (A) pH 5 (control); (B) pH 3.

酸溶脱量との関係を図10に示した。溶脱現象はpH 5付近でも確認されるが、SAFの酸性度の増加に伴いこれらの成分の溶脱量は増加した。図にはHNO<sub>3</sub>に(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>およびNaClを添加した系だけでなくHNO<sub>3</sub>単独系の溶脱量変化についても示した。HNO<sub>3</sub>単独系に比べ2種の塩を添加した系では、モミ針葉からの各成分の溶脱量が明らかに増加し、特にpH 3.0–3.5付近でその増加率は顕著となった。大山でのフィールド観測でも林内雨中のpHNO<sub>3</sub>が3.0–3.5の時に樹冠からの成分溶脱量が急増することを確認しており、このことは酸性霧の植物影響について検討する上で重要な情報と成り得る。溶脱は葉内の塩基性陽イオンと霧水中のH<sup>+</sup>やNH<sub>4</sub><sup>+</sup>とのイオン交換現象であるので、無機イオンや糖類の溶脱量は表面エピクチクラワックスの流出の度合いに依

存すると推測される。実際、塩を添加した系ではエピククラワックスの損傷が大きいことを確認しており、このことが葉からの成分溶脱量を増加させる一因となっている。

このように、酸性霧の影響によりモミ針葉から $\text{Ca}^{2+}$ や糖類が溶脱することは確認されており、細胞壁への影響が懸念される。そこで、モミ針葉の細胞壁からdRG-II-ホウ酸錯体 (dRG-II-B) を可溶化し、次にdRG-II-Bの形態やその分子量に対する影響を新たに調査した。SAF曝露したモミ針葉からAIRを分画し、これにエンド型ポリガラクトソナーゼ (EPG) を処理することで細胞壁のdRG-II-B領域を可溶化することができる。モミ針葉から抽出したEPG可溶性成分のSECクロマトグラフィー分析を行った。どの処理区においても、dRG-II-Bと単量体RG-II (mRG-II) が検出された。各成分の分子量はdRG-II-Bで12.0 kDa、mRG-IIで6.2 kDaであり、mRG-IIの分子量はdRG-II-Bのそれに比べ半減していた。また、総RG-II (= dRG-II-B + mRG-II) に占めるdRG-II-Bの割合はpH 5処理区で82.6%であったのに対し、pH 2処理区では76.1%まで減少していた。図11には

dRG-II-B検出時における $\text{Ca}^{2+}$ およびホウ素含有量を各処理区毎に示したが、これらの成分含有量はSAFの酸性度の上昇に伴い明らかに減少した。酸性霧により引き起こされる細胞壁からのホウ素や $\text{Ca}^{2+}$ の溶脱がdRG-II-Bによる架橋を切断させ、その結果として細胞構造が弱まったことが予想される。

### 3.6 葉肉細胞内のmCaに対する酸性霧の影響

植物葉に酸性霧液滴が付着すると、イオン交換作用により $\text{Ca}^{2+}$ を葉表面に分泌することはよく知られており、霧水の酸性度が高いほどその溶脱量は増加する。特に葉肉細胞内に局在するmCaは、細胞膜構造とその機能を維持する上で重要な役割を担い、また環境ストレスに対して強い応答を示すことも報告されている<sup>6)</sup>。このようなCaが酸性霧によりどの程度減少するかを調査することは重要である。ここで使用したCTCは、生体膜と結合しているCaと特異的な親和性を有する選択的蛍光プローブである。図12にはCTCで染色したモミ当年生針葉の $\text{Ca}^{2+}$ -CTC錯体の蛍光発光を示

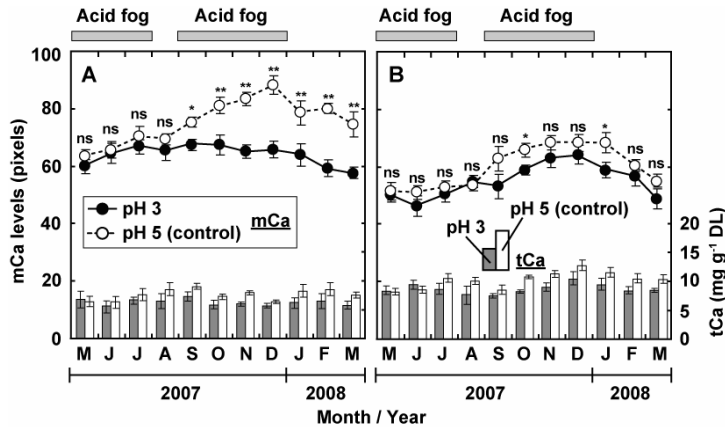


Fig. 13 Seasonal variations in mCa and tCa from current-year needles exposed to SAF of pH 3 and pH 5 (control). (A) Fir needles; (B) Cedar needles. \*, significant at  $P < 0.05$ ; \*\*, significant at  $P < 0.01$ ; ns, not significant.

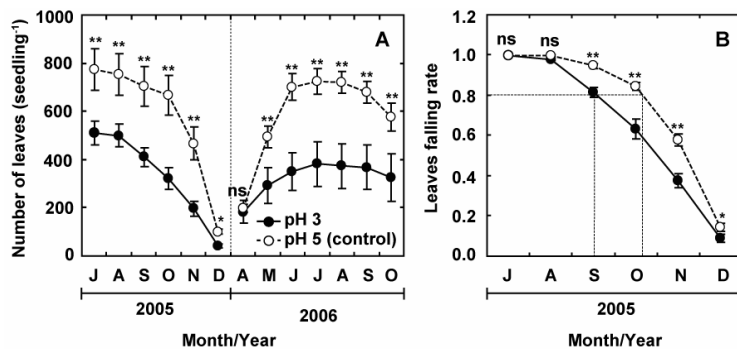


Fig. 14 Effect of SAF treatment on number of leaves during July-December 2005 and during April-October 2006 (A) and relationships between the normalized leaf number index and temperature during July-December 2005 (B). \*, significant at  $P < 0.05$ ; \*\*, significant at  $P < 0.01$ ; ns, not significant.

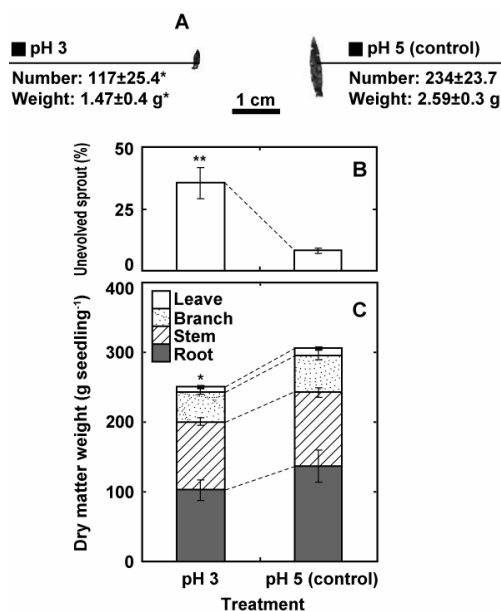


Fig. 15 Effects of long-term exposure to acid fog on beech seedlings relative to the number of winter buds and the weight (A), evolution of sprouts (B), and dry matter weight in parts of beech seedlings (C). \*, significant at  $P<0.05$ ; \*\*, significant at  $P<0.01$

す。図中に表示したダイアグラムより、葉肉細胞に隣接した細胞膜上で蛍光輝度強度が強くなること、つまりmCaが検出されていることを確認した。上下の蛍光画像の大きな違いは、蛍光輝度強度がpH 5処理区に比べpH 3処理区で低いことである。2007年5月から2008年3月までにおけるモミ針葉中のmCaおよびtCaの季節変化を図13に示した。晩夏から初冬にかけてpH 5処理区ではpH 3処理区に比べmCaレベルが大幅に増加しており ( $P < 0.01$ )、2007年12月には最頂点に達した。植物組織は低温のような環境ストレスに曝された時、アポプラストのCa<sup>2+</sup>を細胞内のプールに輸送することがこれまでに明らかとなっている<sup>10)</sup>。それ故に、初秋から冬にかけて気温が下がる時に、pH 5処理区における両樹種の当年生針葉中のmCaレベルは増加したと予想される。図にはスギ針葉中のmCaの季節変化も示したが、モミ針葉の場合と同様に、pH 5処理区における当年生針葉のmCaレベルは冬季に最も高くなった。しかしながら、モミ針葉で観測された結果とは対照的にSAF曝露の影響は確認できなかった。このことは、スギに比べモミは酸性霧に対する高い感受性を保有していることを示している。なお、tCaの季節変化はmCaとは異なりモミおよびスギ針葉共に

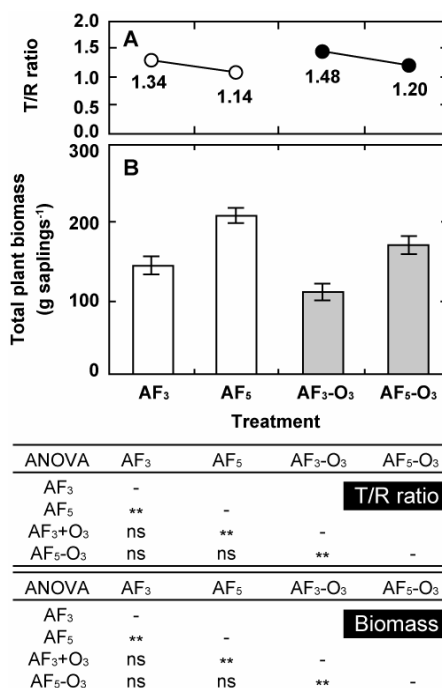


Fig. 16 Effect of long-term exposure to acid fog and/or O<sub>3</sub> on beech saplings relative to the top-root (T/R) ratio (A) and total plant biomass (B). Data are presented as average values and standard errors (n=8).

観測されておらず、このことはH<sup>+</sup>とmCaのイオン交換反応の方がtCaのそれよりも重要であることを示している。

### 3.7 酸性霧の単独或いはO<sub>3</sub>との複合ストレスに対するブナ苗木の生長および生理応答

丹沢山地で観測されるブナ林枯損に対する酸性沈着物の役割を明らかにするために、ブナ苗木に対して2004年9月から2006年7月までの長期間にわたるSAFの曝露実験を行い、その影響について調査した。可視障害はpH 3処理区の大抵の苗木で発生しており、液滴が滞留する葉脈沿い或いは葉縁の先端で特に著しかった。また、pH 3処理区では2005年4月に2個体が、2006年4月にはさらに1個体が枯死した。次に葉の展開パターンに対する酸性霧の影響を調査するために、芽吹き以降に各苗木の葉数を測定し、その結果を図14に示した。2005年7月時点の葉数は、pH 3処理区および対照区でそれぞれ510±48 (n = 10)、775±86 (n = 12)であり、両処理区間の差は有意であった ( $P < 0.05$ )。2006年7月にはこの傾向が一段と明確化し、pH 3処理区の葉数は381±93 (n = 9)まで減少し、対照区 (n = 11)の約53%になった。各処理区における葉数の測定結果から落葉



速度を算出したところ、pH 3処理区では9月頃から落葉が始まっており、この時点の落葉速度は $3.04 \text{ day}^{-1}$ でありpH 5処理区の $1.75 \text{ day}^{-1}$ と比べ約2倍高く、葉数は7月当初の80%程度まで減少した。また、同じく80%となった時期をpH 5と比較すると落葉時期は約1.5ヶ月早まっていた。

幹内の栄養供給状態を把握するために、2006年12月の収穫時に幹根元から3 mm厚の切片を切り出し、ヨウ素デンプン反応を利用してデンプン存在域を青紫に呈色した<sup>11)</sup>。なお、幹内のデンプン蓄積量は、幹断面積に対する染色面積の割合として算出した。その結果、pH 3処理区およびpH 5処理区における平均デンプン蓄積量は、それぞれ $7.73 \pm 1.6$  ( $n = 9$ )、 $21.4 \pm 2.3\%$  ( $n = 11$ )であった。落葉樹は冬芽を形成するために、秋季から冬季にかけて枝や幹中の柔細胞に蓄積したデンプンを材料として使用する。ここで観測された幹内のデンプン蓄積量の減少は、葉数の

減少が主な原因であると考えられる。

2006年12月に各SAF処理区から全てのブナ苗木を収穫したところ、pH 3処理区の冬芽は対照区に比べほとんど生長しておらず、冬芽の数とその質量は、pH 5処理区に比べpH 3処理区で有意に減少していた ( $P < 0.05$ ) (図15)。また、2006年10月時点における総冬芽数に占める未展開冬芽数の割合を示したが、その割合はpH 3処理区で著しく高く ( $P < 0.01$ )、このことが葉数の減少の一因であると推測される。さらに、葉や枝、幹、根といった各部位の乾物生長量を測定したところ、pH 5処理区に比してpH 3処理区で生長量の減少が観測され、特に葉部や根部で有意に低下した ( $P < 0.05$ )。以上のような実験的研究により、丹沢山地で進行しているブナ林衰退の原因の一つとしての酸性霧の影響が明らかになった。しかしながら、丹沢山地では光化学オキシダントの主成分である $\text{O}_3$ の大気濃度も高く、衰退に関与している可能性が指摘されている<sup>12)</sup>。現在、フィールドで観測される濃度レベルの酸性霧や $\text{O}_3$ が樹木の衰退に関与している可能性を検討するには、ブナ苗木に対する長期間の曝露実験が不可欠であり、このような実験例はまだ報告されていない。そこで、2007年5月から2008年7月までブナ苗木に対して長期間の酸性霧と $\text{O}_3$ の曝露実験を行い、生長および生理応答の評価を行った。

図16には総乾物生長量 (=冬芽重量+葉重量+枝重量+幹重量+根重量)および地上部 (=冬芽重量+葉重量+枝重量+幹重量)と地下部重量 (根重量)の比 (Top-root ratio, T/R)を示した。酸性霧あるいは $\text{O}_3$ の影響によりT/Rは減少、すなわち根の生長が抑制されたが、その他の部位については酸性霧単独処理と酸性霧- $\text{O}_3$ 複合処理区間との間に有意な差は見られなかった。酸性霧や $\text{O}_3$ の単独曝露による乾物生長量の低下はこれまでに報告されているが<sup>13, 14)</sup>、酸性霧と $\text{O}_3$ の相加作用についても本実験で設定した条件下において確認された。

表1に各部位におけるデンプン含有量の測定結果を示す。植物体内に貯蔵されるデンプンは次年度の新芽の準備や葉のフラッシュの原動力となるばかりでなく、環境ストレスにより傷付いた箇所の修復に用いられるなど非常に重要な役割を果たす。酸性霧や $\text{O}_3$ の曝露が招いた葉の減少により、植物体内のデンプン含有量は有意に減少した。特にpH 3 SAF- $\text{O}_3$  (AF3- $\text{O}_3$ ) 処理区において相加効果が観測され、根や葉内のデンプン濃度は他処理区に比べ著しく減少していた。根部におけるデンプン蓄積量の測定は、植物全体の炭水化物含有量を予測する上でよい指標となることが知られており<sup>15)</sup>、それ故に、根部のデンプン含有量の低下はブナ苗木の寿命を縮めることが予想される。

**Table 1 Effect of long-term exposure to acid fog and/or  $\text{O}_3$  stress on the concentration of starch in roots, leaves, and winter buds and the number of leaves of beech saplings harvested in August 2008.**

Treatment	Amount of starch ( $\text{mg g}^{-1} \text{DLW}$ )			Number of leaves
	Roots	Leaves	Winter buds	
AF <sub>3</sub>	75.2±5.8	9.94±0.7	6.08±0.7	299±28
AF <sub>5</sub>	101±11	14.1±0.9	7.02±0.7	402±39
AF <sub>3</sub> + $\text{O}_3$	53.3±4.3	7.58±0.3	5.99±0.3	205±24
AF <sub>5</sub> - $\text{O}_3$	88.4±10	12.1±0.3	6.71±0.6	321±32
ANOVA	AF <sub>3</sub>	AF <sub>5</sub>	AF <sub>3</sub> - $\text{O}_3$	AF <sub>5</sub> - $\text{O}_3$
AF <sub>3</sub>	-		Roots	
AF <sub>5</sub>	**	-		
AF <sub>3</sub> + $\text{O}_3$	*	**	-	
AF <sub>5</sub> - $\text{O}_3$	ns	*	**	-
ANOVA	AF <sub>3</sub>	AF <sub>5</sub>	AF <sub>3</sub> - $\text{O}_3$	AF <sub>5</sub> - $\text{O}_3$
AF <sub>3</sub>	-		Leaves	
AF <sub>5</sub>	**	-		
AF <sub>3</sub> + $\text{O}_3$	ns	**	-	
AF <sub>5</sub> - $\text{O}_3$	ns	ns	**	-
ANOVA	AF <sub>3</sub>	AF <sub>5</sub>	AF <sub>3</sub> - $\text{O}_3$	AF <sub>5</sub> - $\text{O}_3$
AF <sub>3</sub>	-		Winter buds	
AF <sub>5</sub>	ns	-		
AF <sub>3</sub> + $\text{O}_3$	ns	ns	-	
AF <sub>5</sub> - $\text{O}_3$	ns	ns	ns	-
ANOVA	AF <sub>3</sub>	AF <sub>5</sub>	AF <sub>3</sub> - $\text{O}_3$	AF <sub>5</sub> - $\text{O}_3$
AF <sub>3</sub>	-		Number of leaves	
AF <sub>5</sub>	**	-		
AF <sub>3</sub> + $\text{O}_3$	*	**	-	
AF <sub>5</sub> - $\text{O}_3$	ns	*	**	-

Data are presented as average values and standard errors ( $n=8$ ).

\*, significant at  $P < 0.05$ ; \*\*, significant at  $P < 0.01$ ; ns, not significant.

以上のように、フィールド観測および長期にわたる環境ストレス負荷実験により、酸性霧が森林樹木に及ぼす影響について総合的に明らかにされた。酸性霧ストレスを樹木に負荷することにより、水分ストレスや低温ストレスを招く可能性を示し、また、植物に有害な大気汚染ガスとして知られる $O_3$ の感受性を高めていることが明らかとなった。さらに、大山で衰退が観測されるモミと観測されないスギとで樹種間の比較を行った結果、エビクチクラワックスやmCaレベルに著しい樹種間差異が見出された。

本研究の実施により、緒言で掲げた目的はほぼ達成したと考えられるが、今後はさらに、酸性霧の沈着がフィールドにどのように影響を及ぼしているか、丹沢山塊全体および日本全体に把握し、今後の対策を検討していく必要がある。

#### 謝辞

以上、2008年度の研究成果を中心にこの共同研究で明らかになったことをまとめて示した。なお、この研究は当研究室構成員全員でサンプリングや分析を協力して行っており、この報告は2008年度の嶋原亜土君の博士論文と桜井 怜君の卒業論文を元に行っている。また、採取やデータ取得に当たっては大山阿夫利神社や伊勢原市役所のご協力を頂いた。ここに記して謝意を表する。

#### 4. 引用文献

- (1) 井川 学、松本 潔、大河内 博、神奈川大学工学研究所報、31, 58-63 (2008).
- (2) P. Albersheim, D.J. Nevins, P.D. English, A. Karr, *Carbohydr. Res.*, 5, 340-345 (1967).
- (3) N. Blumenkranz, G. Asboe-Hansen, *Anal. Biochem.*, 54, 484-489 (1973).
- (4) H. Sase, T. Takamatsu, T. Yoshida, *Can. J. For. Res.*, 28, 87-97 (1998).
- (5) T. Ishii, T. Matsunaga, N. Hayashi, *Plant Physiol.*, 126, 1698-1705 (2001).
- (6) M. Jiang, R. Jagels, *Tree Physiol.*, 19, 909-916 (1999).
- (7) M. Igawa, H. Kameda, F. Maruyama, H. Okochi, I. Otsuka, *Environ. Exp. Bot.*, 38, 155-163 (1997).
- (8) G.G. Parker, *Advances in Ecological Research*, 13, 57-133 (1983).
- (9) H. Sase, Y. Takamatsu, T. Yoshida, K. Inubuki *Can J For Res* 1998; 28: 546-556.
- (10) P.G. Schaberg, D.H. DeHayes, G.J. Hawley, P.F. Murakami, G.R. Strimbeck, S.G. McNulty, *Can. J. For. Res.*, 32, 1351-1359 (2002).
- (11) A. Peirs, N. Scheerlinck, A.B. Perez, P. Jancsó, B.M. Nicolai, *Postharvest Biol. Technol.*, 26, 199-207 (2002).
- (12) M. Takeda, K. Aihara, *J. Jpn. Soc. Air Pollut.*, 42, 107-117 (2007) [in Japanese].
- (13) M. Igawa, T. Kase, K. Satake, H. Okochi, *Environ. Pollut.*, 119, 375-382 (2002).
- (14) C.P. Andersen, R. Wilson, M. Plocher, W.E. Hogsett, *Tree Physiol.*, 17, 805-811 (1997).
- (15) P. Ziegler, *Advances in phloem transport and assimilate compartmentation*, Presses Academiques (1991) p. 196-203.