

C-2 酸性物質の生態系に与える影響に関する研究

(1) 酸性物質の植物環境系に与える影響に関する研究

研究代表者 国立環境研究所 佐竹研一

環境庁 国立環境研究所

地球環境研究グループ	統括研究官	安野正之
	酸性雨研究チーム	佐竹研一
地域環境研究グループ	化学物質生態影響評価チーム	笠井文絵
化学環境部	上席研究官	相馬光之
	動態化学研究室	瀬山春彦、田中 敦
	計測技術研究室	横内陽子
水圏環境部	土壌環境研究室	高松武次郎、服部浩之
	水環境工学研究室	井上隆信
生物圏環境部	分子生物学研究室	田中 浄
	生態機構研究室	上野隆平

(委託先)	静岡大学農学部	久保井徹
	宇都宮大学農学部	深見元弘
	筑波大学第一学群	中野孝教

平成5年度～7年度 76,616千円  
(平成7年度予算額 25,468千円)

[要旨]

森林や湖沼や河川などの自然生態系の中では、生物を中心として土壌、水、大気の間で物質代謝が行われており、酸性物質の影響は生物の生存を支える環境要因に直接間接に及んでいる。酸性雨と被害の関係を明確に捕らえるためには、このような生態系構成要素とその相互関係に関する基本的な理解が不可欠である。本研究では生態系の理解に必要な生物地球化学的研究手法の検討開発を行う一方、酸性物質の生態系影響と言う観点からその影響機構を解析し研究を進めた。

[キーワード] 生態系、酸性雨、酸性物質、樹木枯損、ナラタケ、生物間相互作用  
ワックス、スギ、pH、樹幹流、生長、発芽

(1)-1 ナラタケの発芽、生長に及ぼす酸性物質の影響

要旨

酸性雨とナラタケによる森林被害の因果関係を明らかにするため、ナラタケの菌糸の生長、胞子の発芽に及ぼす酸性物質の影響を調べた。その結果、菌糸の生長の至適pHは素寒天培地でも麦芽エキス寒天培地でも6～7で、酸の種類によらずpHが酸性になるほど生長は低下した。しかし、pH3～4でも生長するなど比較的耐酸性で、菌糸の生長が完全に停止するのは、pH2.5以下であった。

また、無菌条件下での胞子の発芽の至適pHも6~6.5で、pH4以下で発芽数は大きく減少し、3以下では全く発芽しなかった。一方、土壤微生物が共存した場合はpH4~4.5で最も発芽数が多く、pH5以上では共存する細菌類の影響で発芽がみられなかった。これらの結果から、ナラタケにとっての至適pHは6~6.5であるが、多くの微生物が共存しその影響を受ける自然環境下では、より酸性の条件の方が生育に適していると考えられた。

## 1. はじめに

酸性雨は地球規模の環境問題の一つであり、ヨーロッパやアメリカの森林衰退の原因の一つと考えられている。わが国でも、赤城山のシラカバ、ミズナラ、カラマツ、丹沢大山及び福岡県宝満山のモミ、関東平野の寺社林、屋敷林のスギなどの枯損が指摘されているが、その原因については、酸性雨、オゾンやSO<sub>2</sub>ガス、各種ストレス（寒凍害、かんばつ、病虫害）などが上げられており、今のところ特定されていない。また、赤城山の立ち枯れたシラカバなどの形成層にはナラタケ (*Armillaria mellea*) の根状菌糸束が侵入しているのが観察されることから、これらの立ち枯れの直接的な原因はナラタケによる被害と推定される。赤城山は関東平野の北西に位置し、首都圏から汚染物質が移流してくるため、酸性の霧（最低pH: 2.90）が発生している<sup>3)</sup>。これらのことから、酸性雨や酸性霧がナラタケの増殖、生長に影響を及ぼし、その結果として、ナラタケによる森林被害をもたらされたことも予想される。そこで、酸性雨とナラタケによる森林被害との因果関係を明らかにすることを目的とし、その第一段階としてナラタケの胞子の発芽及び菌糸の生長に及ぼす酸性物質の影響を調べた。

ナラタケは担子菌に属し、スギ、マツ類、ヒノキなどの各種針葉樹、ナラ・カシ類、カンバ類などの各種広葉樹、クワ、チャ、サクラ、リンゴ、ナシ、ジャガイモなどの特用作物や園芸作物に、ならたけ病（根朽病）をおこす病原菌として世界的に知られている。これまでにナラタケの生長に及ぼす土壤の要因が調べられ、有機物の多い土壤中で生長が良いこと、土壤中の酸素濃度と関係があることなどが報告されている。日本でも、ならたけ病の被害実態調査や防除に関する研究は行われているが、その発生要因は現在のところ解明されていない。

## 2. 実験方法

### (a) ナラタケの菌糸の生長に及ぼす酸性物質の影響

ナラタケ菌は、1992年10月に赤城山で採取した菌 (A)、及び発酵研究所より分譲された菌 (No. 31619) (B) の2種類を用いた。培地は、素寒天培地（寒天1.5%）と麦芽エキス寒天培地（麦芽エキス1%、寒天1.5%）を用いた。寒天及び麦芽エキスはいずれもDifco製を用いた。オートクレーブ滅菌した培地に、メンブレンフィルター（0.22 $\mu$ m）を通し除菌した1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>液及び1M NaOH液を種々の量添加し、pH 2~8の培地を作成した。各培地にナラタケの菌糸を接種し、25°Cで3週間培養した。1週ごとに菌糸の長さを測定し、さらに、培養開始直後と3週後の培地のpHを測定した。培地のpHは酸化イリジウムpH電極で測定した。

また、酸の種類によって、菌糸の生長に差が生じるかどうかを明らかにするため、素寒天培地に種々の量の1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、HNO<sub>3</sub>、HCl液を添加後、B菌を接種し25°Cで6週間培養し、同様に、菌糸の長さや培地のpHを測定した。

これらの実験は3連で行い、結果は平均値で示した。

### (b) ナラタケの胞子の発芽に及ぼす酸性物質の影響

赤城山で採取したナラタケ子実体より胞子を集め、実験に供した。胞子約1mgを滅菌水 100mlに分散させた後、H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>とNaOH液でpH 2~8に調整した素寒天培地上に0.5mlを接種し、25℃で培養した。1週後に肉眼で菌糸の伸長が確認できたものを発芽した胞子として、発芽数を調べた。

また、土壤微生物共存下でのナラタケ菌の胞子の発芽に及ぼすpHの影響を調べるため、土壤抽出液（淡色黒ボク土に5倍量の蒸留水を添加し、1時間振とう後ろ過したろ液）100mlに胞子約1mgを分散させた後、同様に種々のpHに調整した素寒天培地に接種し、発芽数を調べた。

## 3. 結果及び考察

### (a) ナラタケ菌の菌糸の生長に及ぼす酸性物質の影響

ナラタケは、幾つかの生物種からなる複合種と考えられ、欧米では分類が進んでいるが、日本では分類が十分に確立していない。本研究では、PDA培地（ポテト・ブドウ等寒天培地）上の形状が明らかに異なるA（根状菌糸束形成せず）、B（根状菌糸束形成）、2種の菌を用い酸性物質の影響を調べた。

素寒天培地での培養開始直後の培地のpHと菌糸の生長速度との関係は2種の菌で傾向がやや異なり、B菌は酸性域でも生長速度が大きく低下しないのに対して、A菌ではpH5以下の酸性で半分以下に低下した。しかし、最も生長速度が大きいのはpHが6~7であること、菌糸の生長が完全に停止するのはpH2.5以下のときであることなどは両菌に共通していた。

栄養分のほとんどない素寒天培地でも菌糸の生長に伴い培地のpHは変化した。菌糸が生長しなかったpH3以下の培地のpHはほとんど変化しなかったが、培養開始直後のpHが3~6の培地のpHは3週後には高くなり、7以上のpHは低下した。その結果、A菌ではpHが約6.5、B菌では約7.0に収束する傾向にあった。糸状菌の菌糸は有機酸の生成、アンモニアの酸化、陽イオンと陰イオン利用および排出の不均衡などによりpHを変化させることが知られている。

3週後の培地のpHと菌糸の生長速度との関係は全体的にpHが6~7に集まってきたがA菌、B菌ともpH6~7の中性域で最も生長が良く、酸性になるほど生長速度は低下し、pH2.5では完全に生長は停止した。菌の生長に伴って培地のpHが変化するため、菌の正確な至適pHを求めることは困難なことが多いが、この菌の場合、直後のpHとの関係、培地のpHの変化、3週後のpHとの関係から、pH6~7の中性域が最も生長に適していると考えられる。

麦芽エキス寒天培地では菌糸の生長速度は、両菌ともpH5~7で大きく、4以下になると大きく低下し、2.5以下では全く生長しなかった。素寒天培地での生長速度と比べると、B菌は両培地ではほぼ同じ様なパターンを示したが、A菌は、素寒天培地でpH5ぐらいで生長速度が大きく低下したのに対して、麦芽エキス寒天培地では5以下でも生長速度が大きく低下せず、B菌とほぼ同じパターンを示した。この培地でも、菌糸の生長によって、培地のpHが変化した。その変化は素寒天培地の場合と同じような傾向であった。

また、酸の種類によって、菌糸の生長への影響が異なるかどうかを硫酸、硝酸、塩酸で比較したが、3種類の酸で影響にほとんど差がみられず、いずれもpHが低下するほど、生長速度は低下した。

したがって、ナラタケは、菌の種類、培地の種類によって若干の違いはあるものの、いずれもpH6~7で最も生長が良く、酸の種類によらず、pHが低下するほど生長速度も低下するが、pH4以下

でも生長しうる比較的耐酸性の菌と考えられる。

#### (b) ナラタケ菌の胞子の発芽に及ぼす酸性物質の影響

胞子を滅菌水に分散させた後、培地に接種した場合、pH3~8で発芽が見られたが、最も発芽数が多かったのはpH6~6.5で、pH4以下で大きく減少した。これは、菌糸の生長とpHとの関係とほぼ同じような関係であった。

一方、土壌抽出液に胞子を分散させて、培地に接種した場合は、発芽数はpH4~4.5で最大となり、5以上では全く発芽がみられなかった。pH4以下の培地では、細菌のコロニーは少なく、コロニーの大きさも小さかったが、4.5以上の培地では細菌のコロニーが培地上のかかなりの面積を占めた。pH5以上の培地でナラタケの発芽がみられなかったのは、これら細菌類の影響と考えられ、顕微鏡で観察すると、胞子の周囲を細菌のコロニーが被っているのが見られた。細菌類の増殖に不適な5以下の酸性の培地では、その影響は小さかったと推定される。一般に、細菌、放線菌類は生育可能なpH範囲が狭く、pH5以下の酸性域は生育に適さない。以上の結果は、他の微生物との競合、相互作用のある自然環境下では、ナラタケ自身の至適pHより低く、他の微生物の影響を受けにくい酸性の環境の方が、ナラタケの生育に適していることを示しており、酸性雨の影響を評価する場合、単に特定の生物への影響を調べるだけでなく、生物間相互作用など生態系全体への影響を評価する必要があることを示唆している。酸性雨とナラタケによる森林被害との関係については、本研究の結果だけでは言及できないが、少なくとも自然環境下では、pH4~5の酸性雨は細菌の増殖を阻害してナラタケの増殖を促進する可能性があると考えられる。

#### (1)-2 杉樹幹断面及び根断面のpH分布と外樹皮の強酸性原因物質の検討

##### 要旨

酸化インジウムpH電極及びガラスpH電極を用い杉 (*Cryptomeria japonica* D. Don)の幹を構成する外樹皮、内樹皮、形成層、木質部及び根を構成する外樹皮、内樹皮、形成層のpH測定を行った。その結果、杉の外樹皮はその表面から内部に至るまでpH約3の強酸性を示すことが明らかとなった。一方内樹皮は外樹皮に近い部分がpH約4を示し、形成層に近い部分ではpH約6を示した。杉樹幹の中で最も活性が高いと考えられる形成層のpHは約6.3であり、木質部では若干pHが低下する傾向が見られた。外樹皮の強酸性原因物質を明らかにするため行った化学洗浄（純水、塩酸、塩化バリウム溶液、蟻酸による洗浄）の結果は外樹皮の強酸性が水に不溶性の有機ポリマーと結合しているカルボキシル基によることを示していた。従って、外樹皮に含まれるカルボキシル基は雨水に含まれる各種陽イオンと水素イオンを交換して樹幹流を強酸性にしていると考えられる。

##### 1. はじめに

杉 (*Cryptomeria japonica*)は日本列島に分布する典型的な針葉樹のひとつであり、南は屋久島から北は青森県に至る自然分布が観察される。杉に関しては、酸性降下物の影響を調べるため、林外雨、林内雨、樹幹流の特性等多くの研究が行われ、杉の樹幹流がpH 3.1

(最低値)を示す等非常に酸性であることが明らかとなっている。この値は銀杏 (*Gingo biloda*)のpH 5.8、クヌギのpH 4.3 (*Quercus acutissima*)、クスノキのpH 5.5 (*C*

*innanomum camphora*)等と比較しても極めて低い値である(森崎他、1995)。更に、屋久島から青森に至る杉外樹皮について行った私達の測定結果も試料採取地点が異なるにもかかわらずpH約3を示し、ケヤキ (*Zelcova serrata*) 外樹皮の示したpH 4.3-4.8や松 (*Pinus densiflora*)のpH4.0-4.7よりもはるかに強酸性であった。

一般に樹木の外樹皮の示すpHはそれぞれの樹木の外樹皮の構成有機物や酸性汚染物質を含む湿性沈着物や乾性沈着物の影響を受けると考えられる。従って酸性汚染物質の杉外樹皮の表面濃縮が外樹皮が強酸性を示す一つの理由として考えられる。しかし、日本の雨の平均pHは4.7であり、地域によらず杉外樹皮が強酸性を示すことや、同じ地域の他の樹種の外樹皮のpHと杉の外樹皮のpHは対照的である点を考えると、杉外樹皮の強酸性を表面濃縮だけで説明するのは難しいと思われる。

本研究では、杉の外樹皮がなぜ強酸性を示すのかを明らかにするため、杉の樹幹及び根の断面について詳細にpHの測定を行うと共に、化学洗浄法によって外樹皮の強酸性原因物質の特定を行った。又その成果にもとずき杉の樹幹流がなぜ強酸性を示すのかについても考察を行った。

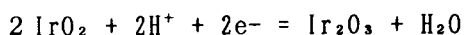
## 2. 研究試料および研究手法

### (a) 試料採取場所及び試料採取方法

研究に用いた杉試料は屋久島(鹿児島県)、日光(栃木県)、つくば(茨城県)、恐山(青森県)より採取した(図1)。この内恐山は多くの硫黄や温泉や火山性酸性湖そして湖を囲む深い森林の存在する火山地帯であり国定公園に指定されている。恐山では杉を三カ所から採取した。その内の一カ所は硫黄化合物を含む硫黄口の近くである(恐山 Site A)。他の二カ所は典型的な杉の植林地であり、その内の一カ所は杉“美林”(恐山 Site B)として知られる場所で恐山の硫黄口地帯からは約3.5km離れている。一カ所は普通の植林地(恐山Site C)である。杉の根は、1993年の台風時に土砂崩れを起こした屋久島の杉林から採取した。採取したこれらの試料は10°C以下で保存した。

### (b) pHの測定

樹皮、形成層、木質部のpHの測定は酸化イリジウムpH電極(TOA:Metox pH sensor MXT-4101C)とフラットタイプガラス電極(Yokogawa:K9220YE)を用いて行った。酸化イリジウム電極は水のpH測定のために新しく開発された電極で、その測定原理は酸化イリジウムフィルムと水素イオンの間の反応にもとずいている。



$$E = E^0 - 2.303RT/F \times \text{pH}$$

酸化イリジウム電極とガラス電極による測定値はpH 1 から13の範囲で一致するが、ガラス電極よりもレスポンスが早く、かつ100 $\mu$ l以下の少量の水のpHの測定を行うのに適していた。野外及び実験室におけるpHの測定の際には、測定試料の上に薄いセルローズシート(1cm $\times$ 2cm)を置き、これに100 $\mu$ lの純水を加えて濡らし測定を行った。

### (c) 樹皮の酸性原因物質の推定方法

カルボキシル基やイオウを含む酸性基は外樹皮が酸性を示す際の水素イオンの供給源としての可能性が高い。これらの基の存在は化学洗浄前後のpH測定から推定した。この推定に用いた外樹皮は、乾性及び湿性の酸性汚染物質の影響を避けるため、最表層ではなく、より内部のものを用いた。作成したこの外樹皮試料（外樹皮薄片）は0.1-0.15mmの厚さを持ち（1cm×2cm）重さは約12mgであった。

酸性基の推定を行う最初の段階では、まず、外樹皮薄片のpHの測定を行った。次に、外樹皮薄片を20度Cで純水で十分に洗浄し水溶性の酸成分を取り除いた後、水溶性酸成分の寄与を推定するためpHの測定を行った。

次の段階では、全酸性基の寄与を推定するため、0.001Mの塩酸溶液で外樹皮薄片を洗浄しその前後で純水洗浄後外樹皮薄片のpHの測定を行った。この段階では例えば酸性基に結合している $K^+$ は水素イオンと置き換わると考えられる。この段階で洗浄液中に溶出した陽イオン量はICP-AES (Jarrell Ash:ICAP 750)で定量した。

第三段階では、カルボキシル基及びイオウを含む酸性基の寄与を推定するため酸で洗浄した外樹皮薄片を1M  $BaCl_2$ 溶液で処理した。これはカルボキシル基やスルホン酸基やエステル硫酸基がバリウムと結合しバリウム塩を作ることにもとづいている。それから、外樹皮pHへのカルボキシル基の貢献度を測定するため0.05M  $HCOOH$ 溶液でカルボキシル基に結合したバリウムを遊離させ、この外樹皮のpHの測定を行った。次にこの外樹皮薄片を1M  $HCl$ 溶液で洗浄しイオウを含む酸性基からバリウムを遊離させイオウを含む酸性基の外樹皮pHへの貢献度を推定した。

### 3. 結果

それぞれ測定原理の異なる酸化イリジウム電極とガラス電極を用いて杉の外樹皮、内樹皮、形成層のpHを測定した結果は同じ値を示していた。又、屋久島及び恐山から採取した杉の樹幹断面を構成する外樹皮、内樹皮、形成層、そして木質部のpH分布はいずれも似たパターンを示していた。外樹皮のpHはおよそ3であり、この値は外樹皮内ではほぼ一定の値を示していたが、恐山の硫気口の近くで採取した外樹皮の最表面だけはpH 2.3-2.7を示していた。内樹皮のpHは内部に行くに従って4から6へと少しずつ増大した。従って樹幹断面のpHの分布は外樹皮から内樹皮に移り変わる部分で急激な変化が見られた。樹幹断面内でのpHの最大値は形成層で見られ、その値はpH約6.3であった。同じく外樹皮、内樹皮、形成層、木質部で構成されている樹木の根の断面のpH分布も樹幹のそれと同様であった。

外樹皮を純水で洗浄し測定したpHは洗浄前のそれとあまり差がなかったが、その洗浄液は若干酸性となった。このように外樹皮の酸性は純水洗浄では変化が見られなかったが酸洗浄の結果pH 2.9-3.0を示していたものがpH 2.4へと変化した。この結果は外樹皮の中からのカリウム等の陽イオンの溶出と連動していた。そしてこの外樹皮を塩化バリウム溶液で処理することによってpHは2.4から4.3へと増加し、蟻酸処理をすることで4.3から2.4へと変化した。そしてこの外樹皮を1M  $HCl$ 溶液で処理してもそのpHには変化が見られなかった。

#### 4. 考察

一般に樹皮の表面は乾性沈着物や湿性沈着物で汚染され、このことが樹皮の化学的性質に影響していると考えられている。しかし、杉 (*C. japonica*) の外樹皮のpHは約2.9-3.1とあまりにも強酸性であり、しかも外樹皮の内部でもその強酸性は変わらない。又、この外樹皮の性質は相対的に見て汚染があまりないと考えられる屋久島でも、かなり汚染が進行していると考えられる日光街道でも自然起源の酸性物質で汚染されていると考えられる恐山でも大きな変化がない。そして、純水による洗浄によってもそのpHが変化しないところから、外樹皮の強酸性は水に不溶性の酸性基にもとずいているのではないかと考えられる。

外樹皮の酸による洗浄が外樹皮からの陽イオンの溶出を伴うことは水素イオンと外樹皮に含まれる陽イオンとのイオン交換反応が起きていることを示している。酸による洗浄の結果、外樹皮のpHが2.4になることは水素イオンによって置き換わった酸性基の寄与がそれだけになることを示し、又塩化バリウム処理によってpHが4.3になると言うことは酸性基の水素イオンとバリウムが置き換わったことによる。又、蟻酸処理によってバリウムが水素イオンと置換し、pH4.3になったことは、外樹皮の強酸性が殆どカルボキシル基によっていることを示している。なぜなら、水に不溶性の有機物と結合しているカルボキシル基と結合しているバリウムは蟻酸処理によって取り除かれるが、エステル硫酸基やスルホン酸基と結合しているバリウムは蟻酸処理によっては取り除かれないからである。

内樹皮と外樹皮の間のpH値の大きな差は両樹皮に含まれるカルボキシル基の量に差があることを示していると考えられる。又、外樹皮は死細胞で構成されており内樹皮は生細胞で構成され、内樹皮が変化して外樹皮となることを考えると、内樹皮から外樹皮への変化の過程で多くのカルボキシル基が合成されるのではないかと考えられる。一方、内樹皮は形成層で作られ、形成層が樹幹断面の中で最も活性の高い層であることから、形成層の示すpH 6.3の値が形成層の生理的活性を最も高く維持するのに適したpHではないかと考えられる。

外樹皮がカルボキシル基を持ち強酸性を示すことは、杉の樹幹流が強酸性を示すことを理解する上で重要である。なぜなら、樹幹流の酸性化が元々の雨水或いは最初の段階の樹幹流に含まれる陽イオンとカルボキシル基に含まれる水素イオンとの交換反応によって引き起こされると考えることが出来るからである。同様のことは土壤間隙水に含まれる陽イオンと根の外樹皮に含まれるカルボキシル基の水素イオンとの交換反応によっても引き起こされると考えることが出来る。更に重金属のような陽イオンもカルボキシル基と結合する事で外樹皮表面に濃縮すると考えられる。

##### (1)-3都市域におけるスギ衰退の潜在的要因

—ワックスの流亡・変質と気孔閉鎖阻害による蒸散と栄養塩溶脱の促進—

#### 要旨

衰退の著しい埼玉県のスギについて、エピクチクラワックスの量と元素組成を分析し、埼玉県以外の関東平野部や山間部のスギの結果と比較した。ワックス量は当年葉の成長が完了する7-8月

以降には自然・人為環境因子の影響を受けて加齢とともに徐々に減少するが、埼玉県では、その速度が他の地域に比べて明らかに速かった。埼玉県のスギでは、ワックスのC/O比の低下も起こっており、葉面は疎水性が低下して濡れ易くなっていると考えられた。この様なワックスの減量と変質は、クチクラ蒸散と葉面からの栄養元素の溶脱を促進させる原因にもなっていた。また、埼玉県のスギでは、葉面に多量のエアロゾルが付着していて、その一部は気孔内部にも侵入していたので、侵入した汚染物質が気孔の閉鎖を阻害し、蒸散や栄養塩の溶脱をさらに促進されていると推測された。葉面に付着したエアロゾルは太陽光の透過も阻害するため、光量不足を引き起こしている可能性もあった。スギは水ストレスに敏感であるので、水分が不足すると葉面のワックス量を増やしてクチクラ蒸散を制御する。従って、埼玉県などで見られるスギの衰退は、ワックスの量的・質的变化や気孔の閉鎖阻害などの植物側の障害に、都市化の影響などが加わって起こる水ストレスが主要因となり、これに栄養塩の欠乏、光量不足、大気汚染物質の直接影響などのストレスが補足的に影響した結果と考えられる。

## 1. はじめに

近年日本の各地で植生の衰退が報告され、大気汚染や酸性降水物との関係が示唆されている。全国のマツ、丹沢山系大山や福岡県宝満山のモミ、赤城山と日光周辺のダケカンバやオオシラビソ、及び都市域、特に関東周辺のスギなどに見られる枯損はその代表的なものである。この内スギでは、枯損は都市域の社寺林などに集中していて、樹木の先端部から始まり次第に下部に及ぶ。このスギ衰退の要因として、これまでにオキシダントなどの大気汚染物質の直接影響、酸性降水物に起因すると思われる土壤の酸性化および都市化による水分条件の悪化などが挙げられてきた。しかし、これらの因果関係には間接的な情報で裏付けられたものが多く、水分ストレスの証拠として最近報告された葉試料の炭素同位体組成の変化が唯一直接的な情報と言える。今後スギ衰退の要因を特定するためには、衰退地域のスギに起こっている潜在的な生理的・化学的变化を様々な角度から調査・研究する必要がある。

この研究では、衰退地域のスギの葉面クチクラワックスを分析して、その流亡や変質の程度を調べ、その変化がクチクラ層を通しての水分や栄養塩の損失にどのような影響を及ぼしているかを検討した。クチクラワックス層は水分と栄養塩の損失ばかりでなく、紫外線や有害物質の侵入、及び病原菌や病害虫の侵入などを防ぐ重要な働きをしているが、常に環境に曝されているため、その影響を受け易い。事実、風雨などの自然現象による物理的作用や大気汚染物質による化学的作用がワックスを流亡・変質させ、結果として蒸散を促進させることなどが知られている。

また、予備的な観察で、スギの葉面には多量のエアロゾルが付着していて、その一部は気孔内部にも侵入していることが分かった。付着粒子は気孔の閉鎖障害を引き起こし、引いては水分や栄養塩の損失を促進させる可能性がある。そのため、この現象これについても合わせて検討した。水分や栄養塩は、クチクラ層だけではなく、気孔を通して盛んに失われるが、植物は気孔の開閉を調節して物質の損失を防いでいる。しかし、一部の針葉樹では、気孔周辺に付着した粒子状物質によって気孔を通しての物質の出入りが阻害されているとの報告もある。日本の都市域のスギにも、葉面に多量のエアロゾルが付着していることが知られているので同様の可能性がうかがえる。



## 2. 実験

### (a) スギ葉試料

スギ (*Cryptomeria japonica*) の葉は、樹齢30年以上で、外気に曝されている樹木 (群落では外縁の木) の高さ約5 mの枝から採取した。採取は、当年葉の展開がほぼ完了した1983年と1984年の8月以降に、埼玉県 (衰退地域) の6地点 (11試料)、茨城県と福島県平野部の8地点 (11試料)、及び茨城県山間部の8地点 (8試料) で行った。試料はワックスの磨滅や融解を防ぐために保湿、冷却 (5°C) して持ち帰り、できるだけ早く分析した。

### (b) エピクチクラワックスの抽出と付着エアロゾルの分離 (Cape, 1986)

採取した試料から、当年葉と1年葉を約5 cmの細枝を付けたまま分別した。これらは蒸留水で洗浄 (軽く超音波処理) し、50°C以下で表面に付着した水分を乾燥させた。乾燥試料の5 gを取り、20 mlのクロロホルムを加えて15秒間軽く振とうしてワックスを抽出した。試料と器壁は5 mlのクロロホルムで洗浄し、洗液は抽出液に合わせた。抽出液はまず石英ウールで、次に濾紙で濾過して遊離・懸濁したエアロゾルを除去した。抽出液中のワックスはクロロホルムを揮散させて回収し、重量を測定してワックス量を求めた後、元素分析に供した。一方、石英ウール上に捕集されたエアロゾルは、乾燥後ウールごと元素分析に供した。操作は全て6連で行ったが、重量測定は2連分を合わせた試料について行った。

### (c) ワックスのCとOの分析

上で得たワックスをクロロホルムに溶解、濾過 (孔径 0.45  $\mu$ m) した後、再び乾固して精製ワックスを調製した。これを元素分析計 (Carlo Erba, Model 1106) にかけて測定した。なお、酸素の標準には、ワックスと組成の類似した1-Docosanol (C<sub>22</sub>H<sub>46</sub>O) を用いた。

### (d) エアロゾルの元素分析

石英ウールに捕集したエアロゾルの元素組成は中性子放射化とICP-AESで分析した。中性子放射化分析は非破壊で機器的に行い、ICP-AES分析は、高圧分解ポンプを用いて混酸 (HClO<sub>4</sub>/HNO<sub>3</sub>=0.5 ml/1 ml) で溶液化した試料を用いて行った。

### (e) クチクラ蒸散速度の測定

葉齢別に採取したスギ葉を水で軽く洗浄して風乾し、切り口にシリコングリースを塗布した。試料は秤量した後シリカゲルデシケーターに入れ、デシケーターは恒温 (20±3 °C)、暗所に置いた。試料は6-10時間毎に秤量し、減量から水分損失速度を求めた。秤量は葉重が一定になるまで約2週間続けた。実験開始初期には、しばしば気孔蒸散による大きな水分損失が見られたので、減量速度が一定となった期間 (通常、10時間後から60時間後の範囲) の結果から蒸散速度を算出した。

### (f) 葉面からの元素溶脱速度の測定

葉齢別に採取したスギ葉の1 gに適量の水を加えて10分間軽く振とうし、葉面に沈着した易溶性

の元素を除去した。葉はもう一度水洗いして表面の水分を乾かし、切り口にシリコングリースを塗布した。葉は30 mlの希硫酸 (pH = 3) に浸せきし、恒温 (20±3 °C) で2時間ゆっくりと攪拌して元素を抽出した。抽出液は濾過 (0.45 μm) しICP-AESで分析した。

#### (g) 葉面および気孔周辺の電子顕微鏡観察

葉齢別に採取した葉を水で軽く洗浄し風乾した。これを液体窒素に浸して急速冷凍し、直ちに凍結乾燥した。各試料から針葉の一本をとりAuとPdを蒸着した後、走査型電子顕微鏡 (JEOL, JS M-840; EDS: KEVEX 7077QJ) を用いて10-20 kVの加速電圧で観察した。

#### (h) 気孔閉鎖阻害の検証

1年葉を取り、水で軽く洗浄した。切り口を0.001 M アブスシン酸水溶液に浸すとともに、葉面にも溶液を時々かけ流して30分間放置し、気孔を閉じさせた。試料はメチレンブルー溶液に30分間浸せきした後、表面に付着した染料を充分洗い流した。針葉の断面 (切片) を作成して光学顕微鏡で観察し、染料が気孔の孔辺細胞を通過して呼吸腔内部に侵入しているかどうかを調べた。

#### (i) 付着エアロゾルによる光透過阻害の測定

5 gの1年葉を取り、ワックスを抽出したのと同様の方法で (b項参照)、エアロゾルのクロロホルム懸濁液を調製した。懸濁物は遠心分離で集め、エタノールで充分洗浄した後、少量の水に懸濁させて乳鉢に取り出した。これに10 mlの1% Tween 20溶液を加えて充分粉碎・混和した後、全量を190 mlに希釈した。この懸濁液の約3 mlを、液を超音波で分散させながら取り出し、分光光度計で波長700-200 nmの光透過率を測定した。また同様に取り出した11.3 mlの懸濁液をミリポアフィルター (HAWP、0.45 μm、47 mm i.d.) に均一に濾過、乾燥させた後、イマージョンオイルで濾紙を透明化して、太陽光の透過率を照度計 (Integrating photometer, Model LI-188B, LICOR, Inc.) で測定した。なお、上で懸濁液を190 mlに調製したのは、スギの葉面積が5 g当たりで平均で190 cm<sup>2</sup>であることによる。

### 3. 結果と考察

#### (a) エピクチクラワックスの一般的特性

ワックスの量や化学組成は、生育地点の標高、枝の高さ、火山性ガスの暴露など多くの自然環境因子 (ストレス) の影響で変化する。すなわち、ワックスの量は通常ストレスを受けると増加し、C/O比は減少する (ただし、標高の上昇に対しては例外的に増加するが、これは多分紫外線の影響である)。これらの変化の内、高い枝でワックス量が増加する現象は、多くの針葉樹で見られるが、特にスギで顕著である。スギは湿潤な環境を好む樹木で、水ストレスを非常に受け易いことからこのワックスの増加は水ストレスに起因する変化であると推測される。スギにおける枝の高さの上昇に伴うワックス量の増加率と生育地点の雨量係数との関係とは良い相関がみられ、やはりワックスの増加に対する水ストレスの関与を裏付けている。また、スギのワックスは、火山性酸性ガス (H<sub>2</sub>SやSO<sub>2</sub>) の暴露によっても著しく増加する。例えば、青森県恐山の硫気口近くで、ガス (2.3-8.5 μg-S/cm<sup>2</sup>/d) に曝されて生育しているスギの葉は同一地域の対照に比べて3

0%ほど多くのワックスを含有している。しかしいずれの場合も、生育は外見上だけでなく生育速度から判断しても健全であるのでスギはC/O比の比較的小さな成分を盛んに合成し、ワックス量を増やすことで水ストレスやガス暴露に対抗し、健全な生育を保っていると考えられる。この様に、エピクチクラワックスはスギにとって非常に重要な保護物質であるので、自然環境ストレスにさらに人為的なストレスが加わり、ワックスの流亡や変質が促進されれば、スギが致命的な影響を受けることは容易に推測できる。

#### (b) 関東地域のスギにおけるワックスの減少と変質

スギのワックス量とその当年葉と1年葉での差（ワックスの年間減少量に相当する）を、スギの衰退が著しい埼玉県を含む関東平野と衰退が全く見られない関東の山間部で比較し、Table 2に示した。ワックス量は当年葉では埼玉県を含む平野部で多く、1年葉では逆に対照の山間部で多い。平野部の当年葉では、大気汚染物質などのストレスに対抗するためにより多くのワックスが生成されるが、その流亡も著しいと考えられる。平野部では山間部に比べて、年間に葉重1 g当たり約0.62 mg（減少率では9.7%）のワックスが余計に流亡している勘定になる。ワックスは風雨などの自然現象によって加齢と共に徐々に減少するが大気汚染物質はその速度を促進させる。関東平野部におけるワックス減少量（率）の増大は大気汚染物質の影響による可能性が高い。

また、ワックスの質的な変化を見るため、そのC/O比を衰退の著しい埼玉県と衰退の程度の軽い関東平野部のスギで比較した。結果はC/O比は当年葉と1年葉のいずれにおいても埼玉県で顕著に低く、その傾向はC/O比をワックス量で割って規格化した値で比較しても同様であった。大気汚染物質がワックスの化学組成に与える影響については不明な点が多いが、酸性雨の暴露でワックス中のアルカンの鎖長が短くなったりエステル成分が加水分解を受けたりすることが知られているので酸性や酸化性の汚染物質が関与した可能性が示唆される。

いずれにしても、関東の平野部、特に埼玉県のスギでは、ワックスの流亡が促進されると共に、その疎水性を低下させる変質（C/O比の低下）が起こっていることが明らかとなった。これらの変化はいずれも環境ストレスに対するスギの感受性を高めていると考えられる。

#### (c) ワックスの流亡と変質による蒸散と栄養塩溶脱の促進

葉の水分や栄養塩はクチクラ層、とりわけ疎水性のエピクチクラワックスによって守られているので、ワックスの流亡や変質はそれらの損失を促進させると考えられる。ワックス量と葉からの水分損失（クチクラ蒸散）速度との関係を考察するとワックス量と水分損失速度は概ね反比例していて、ワックス量が減少すると、水分損失が著しく盛んになることが分かる。また、埼玉県を除く関東の平野部と山間部のスギを比べると（回帰直線AとBの比較）、ワックス量が同じでも水分損失速度は明らかに平野部のスギで大きい。これには、上で述べた様なワックスの変質（C/O比の減少による疎水性の低下）が関与していると思われる。さらに、埼玉県の1年葉では水分損失速度が極端に大きいが、これにはワックスの変質に加えて、後述する気孔の閉鎖阻害が関与した可能性が高い。

ワックス量と葉から溶出した栄養塩（塩基性陽イオン）量との関係では、栄養塩の溶脱速度も水分損失速度の場合と同様にワックス量と反比例していて、ワックス量が減少すれば溶脱は著し

く盛んになる。埼玉県を除く関東の平野部と山間部のスギの比較でも、溶脱速度は明らかに平野部で大きい。また埼玉県では、気孔閉鎖阻害に起因すると推測される極端に大きい栄養塩の溶脱も観察されている。

これらの結果から、関東の平野部、とりわけ埼玉県のスギでは、ワックスの流亡と変質が水分損失（クチクラ蒸散）と栄養塩溶脱を促進し、スギに重大なストレスを与えている可能性が示唆される。

#### (d) 葉面付着エアロゾルによる気孔閉鎖阻害

エピクチクラワックスは疎水性の有機物であるので、炭素を主成分とする人為起源のエアロゾルを容易に付着する。そのため、葉面にはしばしば多量のエアロゾルが蓄積する。この現象は広葉樹よりも針葉樹において顕著で、スギは最も多量のエアロゾルを付着・蓄積する樹木の一つである。エアロゾルの付着は無論樹種だけではなく、環境の汚染度（エアロゾルの浮遊量）に大きく依存する現象であるため、都市域、たとえば埼玉県などでは付着量が著しく多い。Fig. 4は、スギ葉に付着したエアロゾル量

を、その特徴的な元素であるSb、As及びFeを指標として、埼玉県、関東平野部、及び関東山間部の代表的試料と比較したものである。埼玉県のスギには、山間部の10倍以上に達する多量のエアロゾルが蓄積していることが分かる。この様に多量に付着したエアロゾルは、ワックス流亡の原因となるばかりでなく気孔に侵入してその閉鎖阻害を引き起こす可能性もある。

スギ衰退の著しい埼玉県で採取した試料（1年葉）の気孔周辺を走査型電子顕微鏡で観察した結果では気孔に粒子状物質が詰まっているのが認められた。またX線スペクトルの結果から、粒子状物質はFeとCuに富んだ人為起源の汚染物質（エアロゾル）と考えられた。埼玉県のスギでは、いずれの試料でも殆どの気孔にこの様な粒子状物質が詰まっており、その形状と元素組成から、エアロゾル以外にも、土壌粒子、溶融したワックス、藻類や菌類などが含まれると推定された。

アブシン酸処理で気孔を閉じさせたスギ葉を染料溶液に浸し、染料の侵入の有無を光学顕微鏡で観察して、気孔の閉鎖阻害を検証した結果からはスギの衰退が著しい埼玉県の試料（1年葉）では、染料が気孔の孔辺細胞を通過して呼吸腔内部にまで侵入しているのが分かる。埼玉県の試料では、調べた気孔の20-30%でこの様な現象が観察された。一方、山間部の試料では、この様な現象は全く認められなかった。

この様に、衰退の著しい埼玉県のスギには、葉面に多量のエアロゾルが付着していて、一部は気孔に侵入し、その閉鎖を阻害していることが分かった。埼玉県の試料（1年葉）で見られた異常に大きい水分と栄養塩の損失（c項参照）は、付着物質の影響で気孔の閉鎖が不完全であったことに起因すると推測される。

#### (e) 葉面付着エアロゾルによる光透過阻害

葉面に付着したエアロゾルは、気孔障害を通して水分や栄養塩損失の原因となるばかりでなく、多量になれば、光透過を阻害して日照不足を招く恐れもある。エピクチクラワックスを溶解して付着していたエアロゾルを一度分離・回収し、再び溶液中または透明濾紙上に実際の付着密度を再現して、その光透過阻害の程度を測定した結果から透過率は波長や測定法によって多少変動するが、埼玉県では、葉面のエアロゾルに遮断されて植物体に届く光量が70%程度に低下している

と推測される。スギの成長は日照に余り影響されないと言われているが、気象変化による日照不足が重なれば影響が出る可能性も否定できない。また、光量の低下を補償するためにはクロロフィル含量を高める必要があり、それに伴ってMg要求量も増大する。事実、エアロゾルが多量に付着した埼玉県の1年葉ではクロロフィル含量が増える傾向にあり ( $1.12 \pm 0.27$  mg/g-新鮮葉、 $n = 4$ ; 埼玉県以外の関東平野部:  $1.06 \pm 0.19$  mg/g-新鮮葉、 $n = 10$ )、葉のMg含量も明らかに高い ( $1980 \pm 840$  ppm、 $n = 5$ ; 埼玉県以外の関東平野部:  $1100 \pm 220$  ppm、 $n = 9$ )。ワックスの流亡・変質や気孔閉鎖阻害に起因するMgの溶脱促進現象と複合すれば、Mg欠乏の発現が早められる可能性もある。

#### 4. まとめ

以上の結果から、都市域のスギ枯れに対して次の様なシナリオを想定することができる。すなわち都市域では、自動車や工場の排ガスとして放出された酸性・酸化性物質や多様な疎水性有機化合物が直接あるいは雨に溶けて葉に作用し、エピクチクラワックスの流亡と変質を促進する。そのため、ワックスの減少と疎水性の低下が起こり、水分と栄養塩の損失が促進される。この現象は経時的に進行するため、多年葉で特に著しい。また、同じ発生源に由来する粒子状汚染物質(エアロゾルなど)は気孔に侵入してその閉鎖障害を引き起こし、水分や栄養塩の損失をさらに加速する。これらの影響で、都市域のスギは慢性的な水分や栄養塩の欠乏に見舞われる。都市化による近年の高温・乾燥化はこの状況に追い打ちをかける。全国284ヶ所のスギ林の調査から、スギは主に雨量係数が100-230の範囲に分布していて、雨量係数が140未満の所では明らかに生育が悪いと言われている。樹木の先端部では、風、日照などの自然環境条件が厳しく、かつ汚染物質の暴露量も通常多い。また、先端部は本来的に水分ストレスを受け易い部位でもある。そのため、枯損は樹木の先端部から始まり次第に下部に及ぶことになる。スギ衰退の主要因は水欠乏であると考えられるが、栄養塩の損失や光量低下に関連したストレス、ガス状大気汚染物質と葉面付着エアロゾルに含まれる有害物質の毒性などが複雑に影響していると推測される。

以上の研究成果の他下記の課題についても研究を進めたが、その詳細については研究成果報告書を参照されたい。

- (1) 杉樹幹断面及び根断面のpH分布と外樹皮の強酸性原因物質の検討
- (2) ナラタケの発芽、生長に及ぼす酸性物質の影響
- (3) 都市域におけるスギ衰退の潜在的要因
- (4) 酸負荷に伴う土壌・植物系の無機元素の動態
- (5) 植物生育が土壌pH変化に与える影響
- (6) 屋久島の植物-土壌系に見られるカルシウム欠乏性
- (7) 酸による雲母の表面変化
- (8) 土壌アルミニウムの溶出挙動と存在状態
- (9) 屋久島溪流河川水質調査による酸性雨の短期的・長期的影響の評価
- (10) 亜硝酸と過酸化水素の生物複合影響
- (11) 森林樹冠への酸性沈着の影響評価  
- 乾性沈着と溶脱の分別評価法の検討 -