

**神奈川工科大学 環境化学技術研究所
研究成果報告書**

第 4 号
平成 25 年度

神奈川工科大学
工学教育研究推進機構

目 次

1 : はじめに	i
2 : 研究所研究員	ii
3 : 研究成果	
3-1 : 発がん性物質の早期発見を目指した新規化合物の合成と環境及び生体モニタリングへの応用	
高村岳樹	1
3-2 : 塩素化エチレン汚染水の浄化を目的とした三酸化二鉄ナノ粒子/ポリ乳酸多孔質複合体の作製	
三枝康男	7
3-3 : 化学ループ利用による環境対応型プロセスの研究	
大庭武泰	12
3-4 : 多重溝により表面を改質した酸化チタン単結晶の光触媒活性	
伊熊泰郎	17
3-5 : 土壤中の重金属を回収するリユース型バルク状吸着材料および新しい電極の開発	
竹本 稔	24
4 : 河川水温についての市民フォーラム（平成 26 年 1 月 13 日）講演要旨	
4-1 : 神奈川県内の河川水温の推移とその影響について	
石綿進一, 斎藤和久, 高村岳樹	32
4-2 : 神奈川県内河川における夏季の水温一斉調査結果 -最高水温とアユの生息-	
神奈川県内河川水温一斉調査会	41
4-3 : 神奈川県の淡水魚と河川環境	
勝呂尚之	60
4-4 : 河川環境と水循環	
西岡 哲	64
4-4 : 神奈川県内の河川水温の経年変化	
石綿進一, 斎藤和久, 高村岳樹	68
5 : 学外発表論文	81

はじめに

本学の「環境技術開発センター」は、平成 16 年度文部科学省「ハイテク・リサーチ・センター整備事業」に採択された研究プロジェクト「重金属、揮発性有機化合物（VOC）などによる土壤・地下水汚染対策技術の研究開発」の拠点として設置された。厚木市に位置する神奈川工科大学環境技術開発センターは、この地域を含む神奈川県内を中心とした地域の土壤・地下水の汚染状況を十分に把握し、この地域で実現可能な浄化技術を創出し、産業廃棄物の排出を伴わない地下水・土壤の最適な処理プロセスを提示するために、本研究プロジェクトを発足させた。

この研究プロジェクトは平成 16 年度「ぬれ纖維接触装置（WFC）による Cr(IV)汚染土壤の処理」、「超臨界水に対するシリカ、重金属化合物の溶解・反応特性の解明」、「重金属除去用多孔質無機材料の開発」「排ガス・排水中に含まれる揮発性有機化合物の無害化と回収」「無機化学プロセスによる汚染物質の分解および回収」の 5 テーマ・5 教員で発足した。

その後、一部のテーマ変更・メンバー交代を経て「超臨界流体を用いた土壤・地下水処理技術」、「移動型プラントの最適化および土壤処理装置の開発」、「排ガス・排水中に含まれる揮発性有機化合物の無害化と回収」、「無機化学プロセスによる汚染物質の分解および回収」、「重金属イオン除去用吸着材の開発」、「環境汚染物質の毒性評価」の 6 テーマ・6 教員によってこの研究プロジェクトを進めてきた。これらの成果については「神奈川工科大学 環境技術開発センター 研究報告 第 1 集—第 5 集」に詳細に記載されている。

本研究成果では、特に産業廃棄物の副生を伴わない環境浄化技術として、加圧二酸化炭素を用いた地下水中の VOC 除去の小型プラントを 20 年度に完成した。これにより超臨界・加圧二酸化炭素を用いた地下水中の VOC の処理および超臨界・亜臨界水を用いた土壤中の重金属の除去方法の技術基盤の構築が完遂し、現在、実地応用に向けた基礎的知見を集積しつつある。

2009 年度より、環境汚染物質の革新的除去技術の更なる高度化を目指し、また現在深刻な問題となっている有害未知有機物質や重金属による閉鎖空域汚染に対応するため、研究テーマを「超臨界水・亜臨界水による重金属処理」、「完全酸化型光触媒の開発」、「難分解性有機化合物の分解特性」、「土壤中の重金属を回収するリユース型バルク状吸着材料の開発」「変異原物質の地域環境での循環およびタンパク質等の生化学物質との相互作用」、「リサイクル型重金属浄化システム」の 6 テーマ・6 教員によってこの研究プロジェクトを進めている。このことにより、①地域汚染の早期発見を可能とし、②汚染物質、汚染状況にあわせた最適な除去方法の選択を伴う、③除去処理後に有害二次生成物を排出しないゼロエミッション型の総合的な環境浄化システムの構築を目指している。本研究組織は「環境キャラクタリゼーション」「環境質制御」「環境素材開発」の 3 研究室からなる。

環境技術開発センターは以上の研究を推進するとともに、環境研究に関わる普及・啓発活動

を目的とした環境教育を実施している。25年度はこの一環として、市民、学生、各種環境保全団体等多くの主体を対象に、神奈川県内の河川水温の一斉調査を行った。そして、その成果などを報告するため「市民フォーラム」を開催した。本報告書では、これらの発表を含めた新たな知見についても記載した。

環境化学技術研究所
所長 高村 岳樹

研究所研究員

研究所の研究員は以下で構成されている（平成25年度現在）

研究室名	研究員	研究内容
環境キャラクタリゼーション	工学部応用化学科 教授 高村岳樹 教授 三枝康男	○環境汚染物質の生態影響評価 とその場分析方法の開発 ○種々の浄化方法による汚染物質処理後の 安全性評価, ○環境汚染物質のキャラクタリゼーション ○難分解性有機化合物の新分解法の開発
環境質制御	工学部応用化学科 准教授 大庭武泰 教授 小島博光	○可動型の VOC,重金属処理システムの構 築と運用 ○廃棄物がないその場土壤処理システムの 開発と評価 ○環境データの即時公開システムの構築
環境素材開発	工学部応用化学科 准教授 竹本 稔 教授 伊熊泰郎	○紫外線による VOC 等の有機化合物の完 全酸化による処理法の開発 ○廃棄物とならない高度に吸着・脱着可能 なバルク状(塊状)の吸着材料

客員研究員：石綿進一（NPO 法人神奈川ウォーター・ネットワーク）

発がん性物質の早期発見を目指した新規化合物の合成と環境および生体モニタリングへの応用

応用化学科 氏名 高村岳樹

1. 研究の目的

環境中には様々な発がん性物質が存在していることが知られているが、これまでにその活性本体は全体の20～30%程度が明らかとされているのみであり、その全体像の解明には至っていない。こうした環境汚染物質は、これまで微生物等を用いる遺伝毒性試験により、その活性の評価を行なってきた。これまで、相模湾流入河川の水環境の遺伝毒性調査を微生物を用いて継続的に行なってきており、境川等の2、3の河川はきわめて遺伝毒性が強いことを明らかとしてきた。また、厚木市内の土壤抽出物の変異原性も明らかとしている。こうした遺伝毒性活性の活性本体の単離、同定を現在行なっているが、微生物による遺伝毒性評価は菌体の処理時間（24時間以上）がかかり、感度も十分でない欠点がある。こうした背景から、「遺伝毒性物質を簡便に検出する試薬」の合成を行なうことを本研究の目的とした。

この研究における基礎的な背景は蛍光物質である BODIPY が核酸塩基の一つであるデオキシグアノシン（dG）に隣接するとその蛍光活性が著しく減弱する性質を利用していいる。これまでに dG のデオキシリボース部位に蛍光物質 BODIPY を結合した化合物（ここでは仮称 BODIPY-dG とする）を合成し、その評価を昨年度行った。この化合物は dG のグアニンの影響により BODIPY 自体の蛍光が減弱されているが、遺伝毒性物質の影響により dG のアルキル化剤処理により誘発されるグアニン塩基のデブリネーションや酸化的損傷がおこると蛍光が復活し強い蛍光をしめす（図1）。

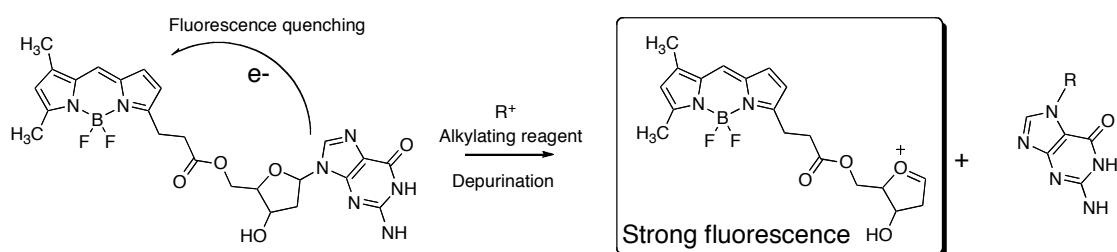


図1：合成した BODIPY-dG の性質

この化合物は低濃度でアルキル化剤と反応し、蛍光を生じる事が明らかとなった。本年度は、この性質を利用した新たなDNA損傷プローブの作成に取り組んだ。

2. 研究の必要性及び従来の研究

これまでに環境中には様々な発がん性物質の活性を測定する化学的な系は存在しない。分析化学的には GC や HPLC-MS などの高額な機器を用いて個々の化合物を測定する

ことが可能である。しかしながら、この方法では、汚染している物質が既知の場合、および標準物質が用意可能なときのみに有効である。一方、環境は多種の化合物の混合している状態で存在しており、DNA 損傷能などの活性を測定することは、化合物情報が明らかとされていない場合でも、微生物試験等により可能である。しかしながら、微生物試験は特別の研究施設や無菌操作などの操作手法を身につけていることが必要である。そのため、環境試料の DNA 損傷能を簡便に測定できる試薬があれば、今後の環境評価にきわめて有効に用いられることが期待される。これまでに、デオキシグアノシンのデオキシリボース部位の 5'位の水酸基に BODIPY-FL を結合させた化合物を用いて試験を行ってきたが、グアニン塩基とデオキシリボース間の結合（グリコシド結合）は酸などの処理により切れやすく、また、細胞内においては、グリコシラーゼなどの作用により切断され蛍光発光することが新たに分かってきた。そのため、DNA 損傷性とは異なる性質を検出する恐れがある。そこで、酸や酵素の作用にも耐えられるより剛直な結合を有する化合物の合成が必要となる。グリコシド結合の切断のされやすさは、デオキシリボースのヘミアセタール構造に由来するため、デオキシリボースを他のアルキル鎖に変更し、得られた化合物の評価を行った。当初、プリン塩基が

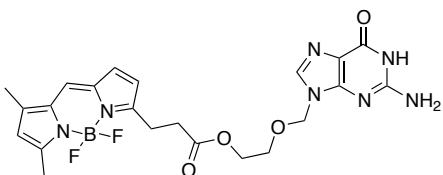


図 1 Acyclovir に結合した BODIPY-FL

デオキシリボースから脱離することで蛍光をしめすことを推定していたが、過去の実験によりプリン塩基に化学修飾が起きれば、蛍光復活が生じることが推察されたため、脱塩基を伴わない蛍光プローブを作成する。

。

3. 期待される効果

本研究で合成する化合物を用いることにより、誰でも簡単に環境試料の DNA 鎮切断能を測定することができる。キットとしての販売や、または pH 試験紙のような YES-NO 試験により、活性の検出する系を構築することができる、簡易な環境分析を行なうことが期待される。また細胞内の検出では、その応用として、より広範な DNA 損傷性物質の検出に用いることができる。

4. 研究の経過及び結果

合成は、デオキシグアノシンと構造が類似しているアシクロビルを選択し、BODIPY-dG と同様の化学構造の化合物の合成を進めた(図 1)。デオキシグアノシンと同様に、まずプリン塩基の環外のアミノ基にフェノキシアセチル基を導入することから行った。アルキル末端基の水酸基をまずシリル保護を行い、さらに、フェノキシアセチル基の導入を試みた。しかしながらフェノキシアセチルクロライドや、同様の酸無水物を反応させたが、収率は極めて低く、直接的に合成することは困難であることが分かった。これはアミノ基の電子密度が低く、求核性が乏しいことに由来する。一般的に、グア

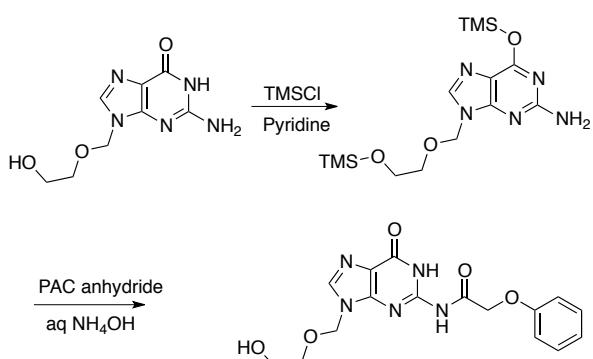


図2 アシクロビルのフェノキシアセチル保護

N^2 -phenoxyaxertylacyclovirを合成することが出来た(図2)。得られたアシクロビル誘導体はジクロロメタン中、DCC共存下、BODIPY-FLと反応させた。しかしながら、反応の進行を確認することが出来なかった。同様の方法でデオキシグアノシン誘導体との反応は容易に進行したが、アシクロビル誘導体では反応が進行しないことは、両者の溶媒への溶解性の違いによるもの推察された。すなわち、 N^2 -phenoxyaxertylacyclovirはジクロロメタンへの溶解性が悪く、反応が進まなかつたと考えられる。同様の溶解性の悪さによる反応への影響は他の保護基を用いたデオキシグアノシン誘導体でも確認された。そこで、溶媒への溶解性を高める目的で、別の保護基を用いた反応を試みることとした。ジクロロメタンへの溶解性を高めるために、より脂溶性の高い保護基を導入するか、 θ 位をベンジルなどの保護基で保護をする等が考えられるが、合成ステップが多くなることにより、目的の化合物を得る量が減少することを恐れて、前者の選択を行った。すなわち、水酸基をTBDMSで保護したアシクロビルの N^2 位のアミノ基をジメトキシリトリル基で保護を行うこととした。

ニンの θ 位を保護することにより、アミノ基の求核性が高まることが知られているので、 θ 位を一時的にシリル基で保護を行い、反応させる方法を試みた。アシクロビルをピリジンに溶解させ、そのTMSClを3等量加えた。さらにフェノキシ酢酸無水物を1.2等量添加し、さらに温和なアルカリ処理を行うことで、目的とする

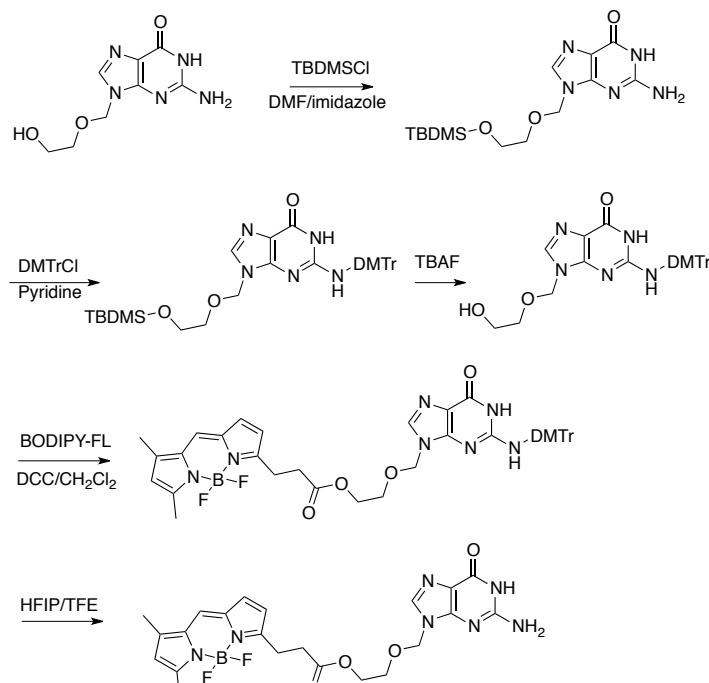


図3 BODIPY-Acyclovirの合成

ピリジン溶媒を用い、ジメトキシクロライドを3等量用いることでアミノ基のトリチル保護を行うことが出来た。この化合物は PAC 保護に比して、非常にジクロロメタンなどのハロゲン有機溶剤に易溶であった。得られた化合物をもちいて、先と同様に BODIPY-FL と DCC 共存下反応を試みたところ、スムーズに反応が進行し、目的の化合物を得ることが出来た。得られた BODIPY-Acyclovir 誘導体に、メタンスルホン酸やエピクロロヒドリンなどの N7 位を攻撃するアルキル化剤を処理することにより、強い蛍光発光を観察することが出来た。これは、N7 位に修飾が起きるだけで蛍光が復活するという当初の予測通りであることが分かった。

◦

5. 今後の計画

今後、得られた新規 BODIPY 誘導体の細胞内挙動や安定性を検討し、環境試料への適応条件等を検討する。今後さらに改良をすすめ、環境モニタリングや生体内モニタリング、さらには培養細胞などにおいても使用可能な試薬の提供を行い、その基礎的知見を提供する。最終的には数種の遺伝子損傷が検出可能な新たなキットの開発、提供を行なうことが目標である。この研究をさらに発展させ環境分析や培養細胞、生体内での遺伝毒性物質の迅速スクリーニング法の開発や活性本体同定に本試薬を利用する。

6. 研究成果の発表

(1) 学会発表

1. UVA 照射下の PhO が誘発する塩基損傷を部位特異的に持つプラスミド の 作製とヒト細胞における TLS 解析, 長野聖也、川西優喜、高村岳樹、八木孝司 (日本環境変異原学会第 42 回大会)
2. 大気中の多環芳香族化合物の変異原性の再評価 高村岳樹・三崎健太郎・荻野真宏 (日本化学会第 94 春季年会)
3. Identification of ribosyladenosine and ribosylinosine as specific metabolites of poly(ADP-ribose) in blood and urine, Mitsuko Masutani, Hiroaki Fujimori, Tomoko Yoshida, Hiromi Harada, Motoharu Kohata, Takeji Takamura-Enya, 19th Int. Conference on ADP-ribosylation

(2) 論文

1. Estimation of chloroform inhalation dose by other routes based on the relationship of area under the blood concentration-time curve (AUC)-inhalation dose to chloroform distribution in the blood of rats. Take M, Takeuchi T, Haresaku M, Matsumoto M, Nagano K, Yamamoto S, Takamura-Enya T, Fukushima S. J. Environ. Sci. Health A, Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng. 2014;49(3):253-261
2. Translesion DNA synthesis across various DNA adducts produced by 3-nitrobenzanthrone in *Escherichia coli*. Kawanishi M, Kanno T, Nishida H, Takamura-Enya T, Yagi T. Mutat Res. 2013; 754(1-2):32-8.
3. Adduct formation and repair, and translesion DNA synthesis across the adducts in human cells exposed to 3-nitrobenzanthrone. Kawanishi M, Fujikawa Y, Ishii H, Nishida H, Higashigaki Y, Kanno T, Matsuda T, Takamura-Enya T, Yagi T. Mutat Res. 2013 May 15;753(2):93-100
4. Photoassisted defluorination of fluorinated substrates and pharmaceuticals by a wide bandgap metal oxide in aqueous media. Hidaka H, Tsukamoto T, Oyama T, Mitsutsuka Y, Takamura T, Serpone N. Photochem Photobiol Sci. 2013 May;12(5):751-9.

(3) 助成金採択

科研費基盤 (C) DNA 損傷を簡易に検出する新規蛍光プローブの合成と環境および生体試料への

応用

塩素化エチレン汚染水の浄化を目的とした
三酸化二鉄ナノ粒子/ポリ乳酸多孔質複合体の作製

神奈川工科大学・工学部・応用化学科 三枝康男

1. 目的

土壤、地下水や河川水の汚染物質として、塩化メチレン、トリクロロエチレン (TCE) やテトラクロロエチレン等の塩素化炭化水素類があり、これらを回収除去、或いは分解・無毒化させる浄化技術の開発が進められている。¹⁾

当研究室でも、塩素含有有機化合物を温和な条件下で接触分解できる四酸化三鉄²⁾ (Fe_3O_4) と、天然に存在する穀物や芋類を原料とし、自然界に存在するバクテリアなどの微生物によって水と二酸化炭素にまで生分解（酵素分解）されるポリ乳酸³⁾ (PLLA) を組み合わせ、様々な形で複合化させて、塩素化合物を効率よく分解除去し、無毒化させることのできる環境浄化材料の開発を進めてきた。^{4~7)} これらを汚染水のろ過材として使用する場合、水の透過径路として一般に $100 \mu\text{m}$ 以上の細孔が必要とされるが、一例を挙げれば、PLLA のジオキサン溶液に Fe_3O_4 のナノ粒子を分散させ、これを溶媒蒸発法、凍結溶出法、凍結乾燥法の各手法によって乾燥させて作製した多孔質複合体では、数十～ $100 \mu\text{m}$ 程度の細孔を有していることがわかった。同じ酸化鉄に属する三酸化二鉄(Fe_2O_3)もまた、塩素化合物を接触分解することが報告されている。

⁸⁾

本研究では、これまでの四酸化三鉄に代えて三酸化二鉄を用いてろ過材を作製する条件について、比較的大きな細孔を形成させることのできる凍結溶出法と凍結乾燥法を用いて検討を加えた。

2. 実験

2-1. Fe_2O_3 ナノ粒子の調製⁹⁾

窒素雰囲気下で塩化鉄 (III)・六水和物 (1.081 g, 4 mmol) と塩化鉄 (II)・四水和物 (0.3976 g, 2 mmol) を純水 (150 mL) に溶解させた。これに濃アンモニア水 (28 wt-%) (15 mL) を加えると直ちに黒色に変化した。これを 50°C で 30 分かき混ぜて Fe_2O_3 の懸濁液を調製した。これを遠心分離して回収し、純水で 2 回洗浄・遠心分離した後、100°C で 5 時間仮焼して Fe_2O_3 ナノ粒子を得た。収量 : 0.2794 g。

2-2. Fe_2O_3 ナノ粒子/PLLA 多孔質複合体の作製

2-2-1. 凍結溶出法による作製

PLLA (1.00 g) をジオキサン (8.37 g) に溶解させ、これに純水 (0.63 g) と Fe_2O_3 ナノ粒子 (0.05 g) を加えて 30 分超音波照射した後、冷凍庫に入れて 1 晩凍結させた。これを多量の氷水中に所定時間浸漬させ、凍結状態でジオキサンを溶出させて、多孔質複合体を得た。

2-2-2. 凍結乾燥法による作製

PLLA (1.00 g) を所定量のジオキサンに溶解させ、これに所定量の純水と Fe_2O_3 ナノ粒子 (0.05 g) を加えて 30 分超音波照射した後、冷凍庫に入れて 1 晩凍結させた。これを -50°C で 8 時間

凍結乾燥させて、多孔質複合体を得た。ここでは、それぞれのジオキサン量に対して、一定量の純水を添加したもの（表1）と、それぞれのジキサン量に対して、PLLAが溶解できる限度の純水を加えたもの（表2）の両方で検討した。

Table 1 それぞれのジオキサン量に対して、一定量の純水を添加したもの

ジオキサン	8.37 g	10.00 g	12.00 g
純水	0.63 g	0.63 g	0.63 g

Table 2 それぞれのジオキサン量に対して、PLLAが溶解できる限度の純水を加えたもの

ジオキサン	8.37 g	10.00 g	12.00 g
純水	1.50 g	2.00 g	2.50 g

これらの組成を中心として、各試薬の量を変えて多孔質複合体を作製した。

2-3. TCEに対するFe₂O₃ナノ粒子の分解能の評価

50mLバイアル瓶に純水(30 mL)、TCE(1.0 μL)、ベンゼン(1.0 μL)とFe₂O₃ナノ粒子(0.90 g)を仕込んで密栓し、室温でかき混ぜた。所定時間の後にバイアル瓶内のヘッドスペースガス(1.0 μL)をマイクロシリングで正確に採取し、ガスクロマトグラフィー(GC)によって残留するTCE濃度を測定することでFe₂O₃ナノ粒子の分解能を評価した。

2-4. 測定

走査型電子顕微鏡(SEM)観察は、島津SS-550を用いて行った。試料にはあらかじめ金蒸着したものを用いた。広角X線回折(WAXD)は、リガクRINT2500VHFを用いて測定した。GCは、キャピラリーカラムを備えた島津GC-8Aを用いて測定した。測定は、FID検出器を用い、キャリアガス(窒素)流量5気圧、水素ガス流量5気圧、インジェクション温度80°C、カラム温度50°C、検出器温度250°Cで行った。

3. 結果と考察

3-1. Fe₂O₃ナノ粒子の調製

文献⁹⁾に従い、Fe₂O₃ナノ粒子を調製して、WAXDにより同定した。この回折曲線で、小角側から30、36、42、53、57、62、72、75°付近にFe₂O₃に帰属できるピークが検出されたことにより、今回調製した物質がFe₂O₃であることが確認できた。

3-2. Fe₂O₃ナノ粒子/PLLA多孔質複合体の作製

3-2-1. 凍結溶出法による作製

Fe₂O₃ナノ粒子(0.05 g)、PLLA(1.00 g)、ジオキサン(8.37 g)と純水(0.63 g)を用いて作製した複合体のSEM写真をFig. 1に示す。

複合体が目的とした多孔質形態を有していることが確認できた。形態上のもう一つの特徴として、不均一で丸状にランダム方向に広がった組織の成長が認められた。細孔径は浸漬時間が長いものほど大きく、1日浸漬したもので概ね10 μm以下(写真A)、3日で30~65 μm(同B)、5日で50~75 μm程度(同C)と見積もられた。

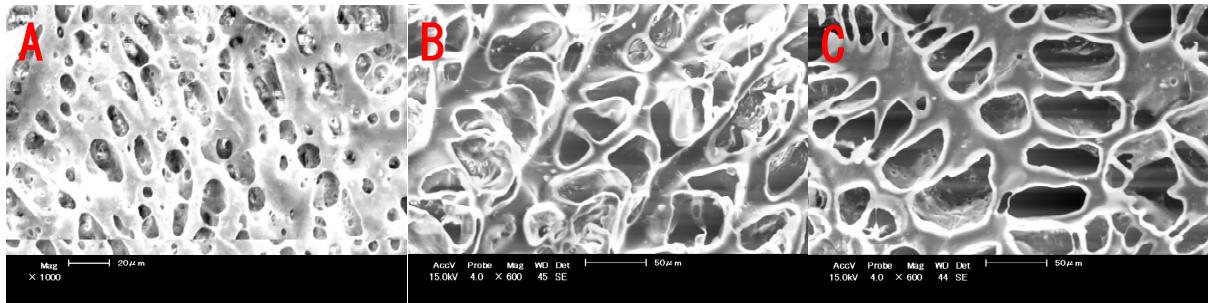


Fig. 1 凍結溶出法によって作製したFe₂O₃/PLLA多孔質複合体のSEM写真.

3-2-2. 凍結乾燥法による作製

Fe₂O₃ナノ粒子 (0.05 g)、PLLA (1.00 g) と純水 (0.63 g) に対して、ジオキサンの量を 8.37、10.00、12.00 g と変えて作製した複合体の SEM 写真を Fig. 2 に示す。

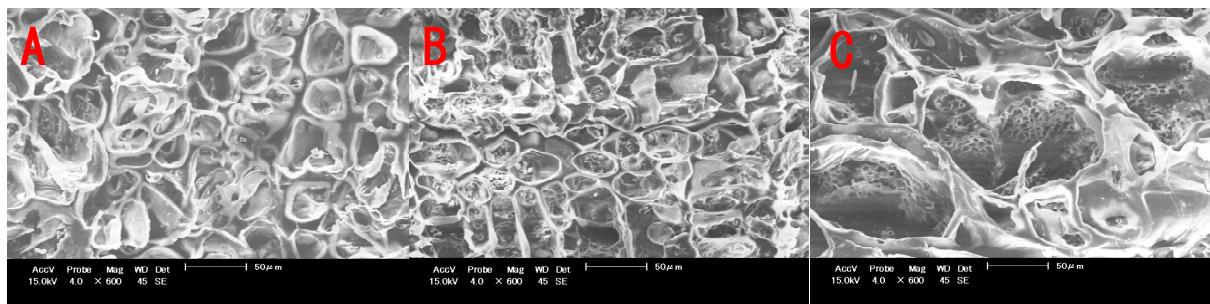


Fig. 2 凍結乾燥法によって作製したFe₂O₃/PLLA多孔質複合体のSEM写真.

どの複合体にも多孔質形態がはっきり確認できた。細孔は、凍結溶出法を用いて作製したものより密であった。細孔径は、ジオキサンの量が少ない順に 30~60 μm (写真 A)、同じく 30~60 μm (同 B)、80~150 μm 程度 (同 C) と見積もられた。

Fe₂O₃ナノ粒子 (0.05 g)、PLLA (1.00 g) とそれぞれのジオキサン量 (8.37、10.00、12.00 g) に対して、PLLA が溶解できる限度の純水 (その順に 1.50、2.00、2.50 g) を加えて作製した複合体の SEM 写真を Fig. 3 に示す。

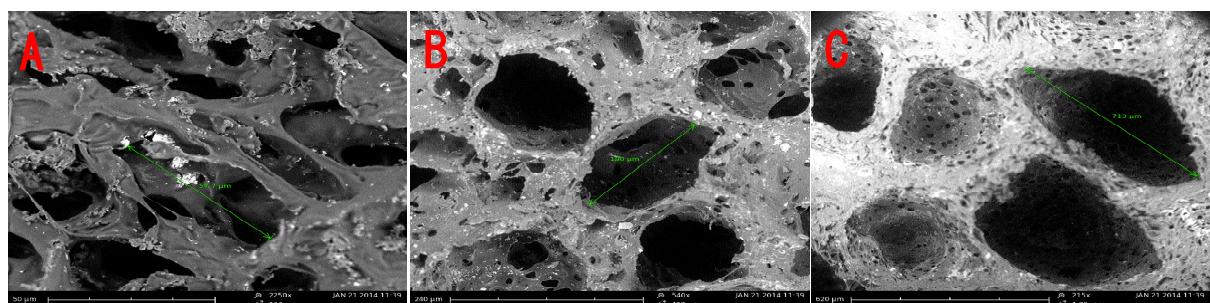


Fig. 3 凍結乾燥法によって作製したFe₂O₃/PLLA多孔質複合体のSEM写真.

前記の結果と一致して、ジオキサンの量が多いものほど、細孔径は大きかった。その一方で、水の量を増したことでの細孔は疎になった。細孔径は、その順に 50~60 μm (写真 A)、

140～190 μm（同B）、700 μm程度（同C）と見積もられた。

3-3. TCEに対するFe₂O₃ナノ粒子の分解能の評価

バイアル瓶に所定量の純水、TCE、内部標準物質となるベンゼンとFe₂O₃ナノ粒子を仕込んで密栓し、室温でかき混ぜた。0、24、48時間後、バイアル瓶内のヘッドスペースガスをマイクロシリジで正確に採取し、GCを用いて残留するTCE濃度を測定することでFe₂O₃ナノ粒子の分解能を評価した（Fig. 4）。尚、ここで言う残留TCE濃度の算出は次の計算式に従った。

$$\text{TCE濃度} (\%) = (1 - T_2 \cdot T_3 / T_1 \cdot T_4) \times 100$$

ここで、
T₁=TCEの空試験の値

T₂=ベンゼンの空試験の値

T₃=TCEの分解試験の値

T₄=ベンゼンの分解試験の値

TCEは、24時間で7.6%、48時間で14.5%が分解した。

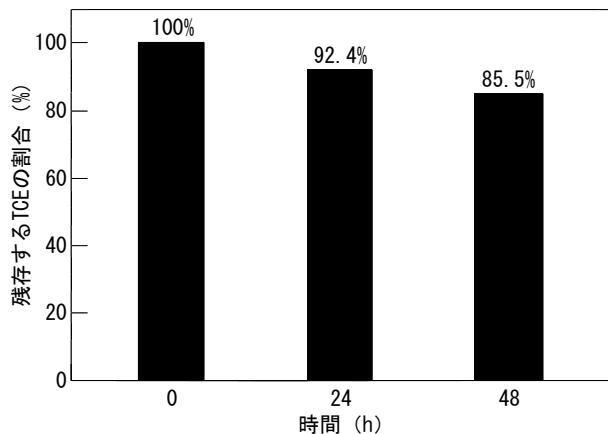


Fig. 4 Fe₂O₃ナノ粒子によるTCEの分解挙動。

4. 結論

WAXDから、Fe₂O₃に帰属できる特徴的な回折ピークが検出され、Fe₂O₃ナノ粒子が調製できたことが確認できた。

SEM観察から、凍結溶出法と凍結乾燥法の2つの手法で作製した複合体のすべてで、目的とした多孔質形態を有していることが確認できた。一定量（0.63 g）の水を添加した場合、凍結溶出法、凍結乾燥法のどちらでも、PLLAのジオキサン溶液の濃度が下がるほど、複合体の細孔径が大きくなる傾向が見られた。しかし、1.00 gのPLLAを12.00 g以上のジオキサンに溶解した溶液からは、十分な強度をもった複合体は得られなかった。Fig. 2のCとFig. 3のCは、PLLA濃度（PLLA: 1.00 g ジオキサン: 12.00 g）が同一で、異なった水の量（Fig. 2: 0.63 g Fig. 3: 2.50 g）を添加して、凍結乾燥法を用いて作製した複合体のSEM写真であるが、どちらも多孔質形態を有しており、細孔径はFig. 2で80～150 μm、Fig. 3で700 μm程度と見積もられた。すなわち、PLLA濃度が同じであれば、水を多く加えるほど細孔径が大きくなることがわかった。その一方で、水を多く加えると細孔が疎になること、また2.50 gより多い量の水を加えるとPLLAの一部が再沈殿てしまい、その溶液濃度が低下するため複合体はスポンジ様形態を保持できなくなった。

TCEに対するFe₂O₃ナノ粒子の分解能を、内部標準物質にベンゼンを用いて実験項記載の方法で評価した。TCE濃度の減少は、室温では24時間で7.6%、48時間で14.5%であった。

5. 今後の展開

作製した多孔質複合体の塩素化合物浄化材としての実用性について、早急に評価する必要がある。

作製法によって、複合体に形成される細孔の形や大きさが変化することから、それらの影響についても検討する必要がある。

Fe_2O_3 の分解活性について、より多くの有機塩素化合物について確認する必要がある。

参考文献

- 1) 平田健正, 他, 土壤・地下水汚染の浄化および修復技術, エヌ・ティー・エス (2008).
- 2) 沖中健二, 沖中朋子, 角屋浩司, 上神雅之, 水環境学会誌, **30**, 33 (2007).
- 3) 日本バイオプラスチック協会編, 「バイオプラスチック材料のすべて」, 日刊工業新聞社 (2008).
- 4) 三枝康男, 環境化学技術研究所平成 22 年度研究報告, pp. 7 (2010).
- 5) 三枝康男, 環境化学技術研究所平成 23 年度研究報告, pp. 6 (2011).
- 6) 三枝康男, 環境化学技術研究所平成 24 年度研究報告, pp. X (2012).
- 7) 三枝康男, 環境化学技術研究所平成 25 年度研究報告, 印刷中.
- 8) M Ajeesh, B. F. Francis, J. Annie, and P. R. H. Varma, *J. Mater. Sci. : Mater. Med.*, **21**, 1427 (2010).
- 9) K. Naka, *Polym. Adv. Technol.*, **19**, 1422 (2008).

化学ループ利用による環境対応型プロセスの研究

研究者名：所属学科 大庭 武泰：応用化学科

1. 研究の目的

地球温暖化の原因物質である CO₂を分離可能なケミカルループ燃焼器の開発を行う。

2. 研究の必要性及び従来の方法

ケミカルループ燃焼法 (CLC) は日本で 1980 年代に提案された技術であり、金属酸化物中の酸素にて燃料を酸化させ、還元された金属を空気中の酸素にて元に戻す。発生する CO₂は水蒸気との混合ガスであるため熱回収後に冷却すれば高濃度高純度にて分離回収できる。近年、欧州等で石炭を燃料とした取り組みが盛んとなり、他の CO₂ 分離回収技術よりも低コストかつ高効率な技術として注目されている。日本においてもようやく再評価され、研究代表者は本技術が提案された研究室にて、ガス燃料に対するベンチ及びパイロットスケール装置の設計運転を行ったため(文献"Application of Fe₂O₃-Al₂O₃ Composite Particles as Solid Looping Material of the Chemical-Loop Combustor"), 受託研究で研究を開始した (2010/10/21 日刊工業新聞 1 面等に掲載)。

その後、将来的に国家プロジェクトとすべく、一般財団法人 石炭エネルギーセンター (JCOAL) での技術検討委員会の下部委員会として、研究代表者を委員長として CLC の実現可能性について調査を行った。引き続き、NEDO の調査研究として、ゼロエミッション石炭火力基盤技術「次世代高効率石炭ガス化技術最適化調査研究」「CO₂ 分離型化学燃焼石炭利用技術に関する検討」を実施している。

3. 期待される効果

地球温暖化の原因物質である CO₂を分離可能なケミカルループ燃焼器の開発ができれば、日本における石炭火力発電への応用に繋がり、将来的には他国への輸出および技術支援を通じて地球温暖化問題に対する国際的な貢献が可能となる。

4. 研究の経過及び結果

4. 1 NEDO プロジェクトへの参画

引き続き、NEDO の調査研究として、ゼロエミッション石炭火力基盤技術「次世代高効率石炭ガス化技術最適化調査研究」「CO₂ 分離型化学燃焼石炭利用技術に関する検討」を実施するにあたり、JCOAL の再委託先として、石炭と酸素キャリアの反応性を実験的に調査することになった。

4. 2 実験の詳細および結果

試験の概要

試験方法

- ・流動層反応器内の雰囲気を切り替え、燃料反応器(FR)および空気反応器(AR)とする
- ・石炭を投入し生成するガスをサンプリングバッグで捕集しGC分析

試験条件の概要

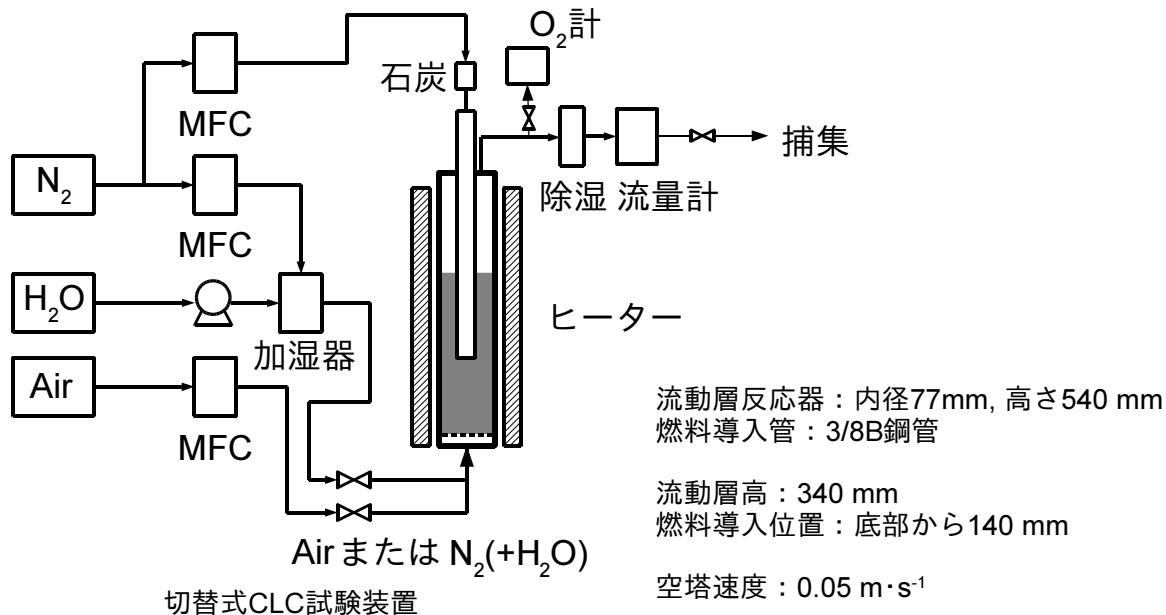
粒子：Al₂O₃粒子（人工）、Fe₂O₃-Al₂O₃焼結粒子（人工）、天然鉄系粒子

石炭：瀝青炭および褐炭

温度：650°C および 800°C

雰囲気：常圧、FR：窒素（20%水蒸気）、AR：空気

分析(GC)：CO, CO₂, CH₄, C₂H₄, C₂H₆, H₂, O₂, N₂



試験手順

空気で流動化→昇温→ N_2 のみで流動化→出口ガス酸素濃度0%確認→水蒸気導入
→燃料導入→ N_2 置換→空気に切替

使用粒子

- 高純度アルミナ粒子 99.99% Al_2O_3 , 粒径100 μm

市販品購入（アルミナビーズ）

- Fe_2O_3 - Al_2O_3 粒子

Fe_2O_3 含有率 25 wt%, 50 wt%

略称	Fe_2O_3	Al_2O_3
アルミナ	0%	100%
Fe25	25%	75%
Fe50	50%	50%

試薬を購入し、混合後噴霧乾燥造粒し焼結（平均粒径約80~100 μm ）

焼結過程を経ることにより固溶体が生成し粒子強度が高まる。

Fe_2O_3 含有率 25 wt%粒子 1200°Cでの反応実績あり

Fe_2O_3 含有率 50 wt%粒子 900°Cでの反応実績あり

- 天然鉱石

イルメナイト $FeTiO_3$

石炭

コールバンク（産業技術総合研究所）より入手

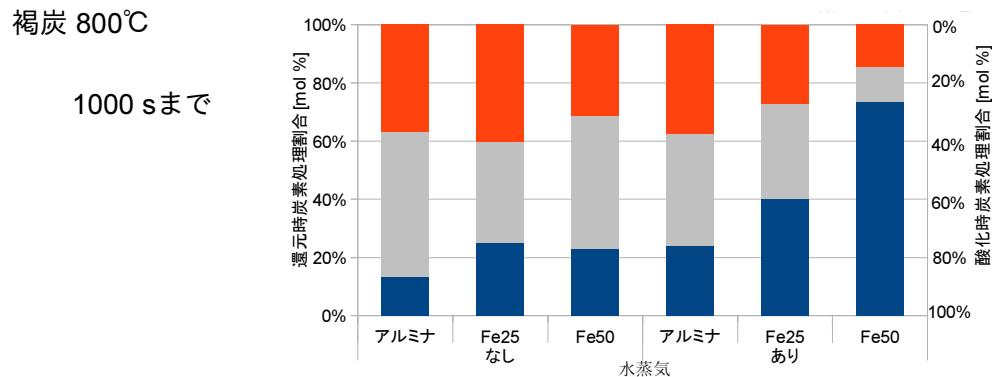
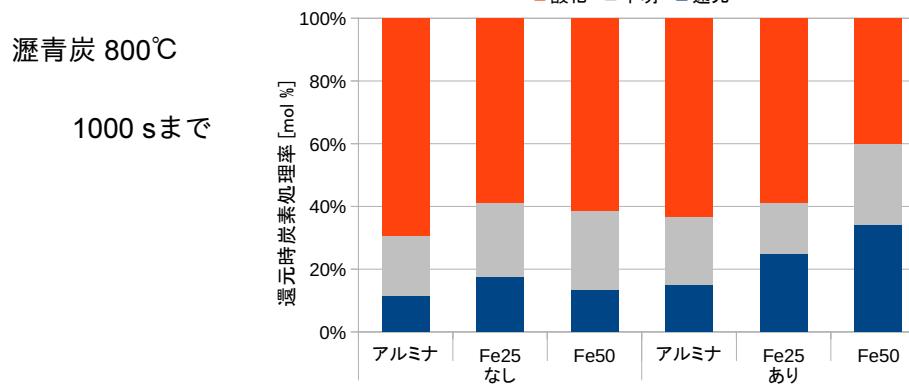
炭種	産地	工業分析			発熱量			元素分析						
		水分 wt%	灰分 wt%	揮発分 wt%	固定炭素 wt%	無水 無鉱物 cal/g	Ash wt%	C wt%	H wt%	N wt%	S wt%	O wt%	全硫黄 wt%	
SS057	瀝青炭C	CHN	2.34	10.93	32.88	53.85	8,129	11.2	74.09	4.78	1.38	0.52	8.03	0.58
SS069	褐炭F1	IDN	16.87	3.95	39.65	39.53	7,047	4.75	71.32	5.26	1.08	0.64	16.95	0.34

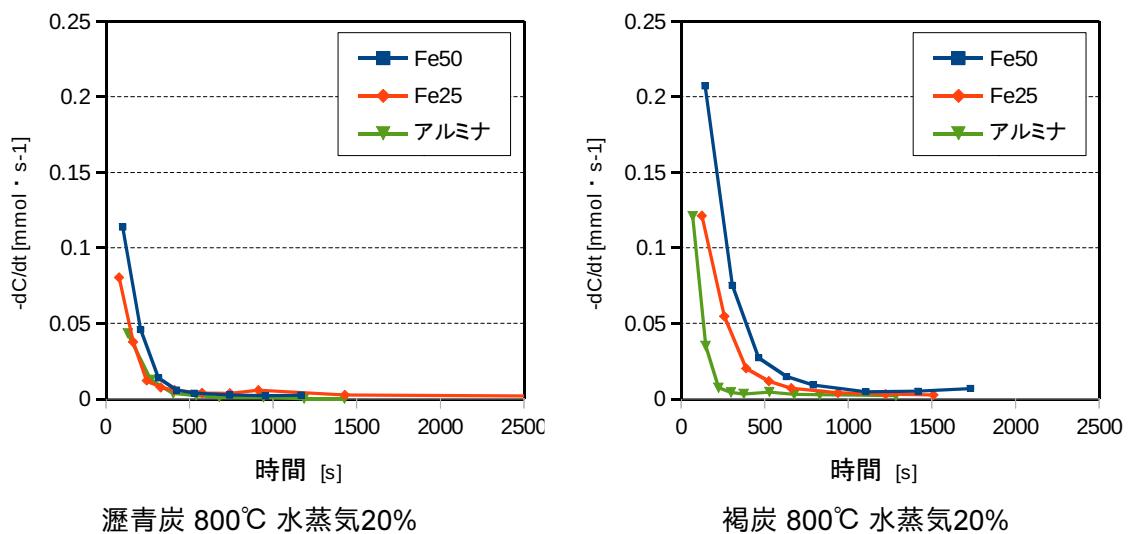
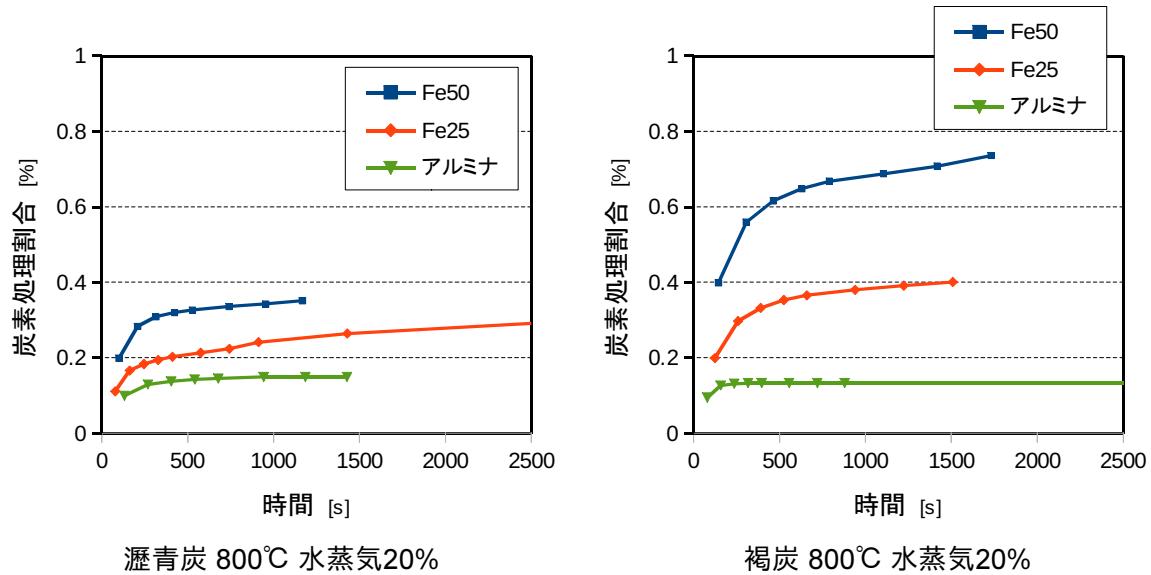
粒子	燃料	温度	雰囲気
アルミナ	瀝青炭	650°C	水蒸気あり
Fe25	褐炭	800°C	水蒸気無し
Fe50	瀝青炭チャー	900°C	
イルメナイト	褐炭チャー		

(石炭のチャー化は窒素雰囲気で流動化させ
昇温速度20 °C·min⁻¹、850°C 10分で行った)

粒子使用量	燃料導入量	水蒸気導入量
アルミナ 3.4 kg	約1 g	20%
Fe25 2.4 kg		
Fe50 2.0 kg		

試験結果の一部





5. 今後の計画

次年度の調査研究が実施されれば、さらにその後に本格的な開発へと繋がり、2030年頃を目途に実用化されることになる。

6. 研究成果の発表

本研究の成果はNEDO報告書に記載されているが、平成25年度のNEDO報告書はまだ発行されていないため、平成24年度の報告書を添付する。

多重溝により表面を改質した酸化チタン単結晶の光触媒活性

研究者名： 応用化学科 伊熊泰郎

1. 研究の目的

酸化チタンの光触媒反応はその半導体特性を利用するものである。したがって、光触媒特性を改善するには半導体特性を改良させる方法がとられている。つまり、バンド構造を制御する方法である。一方、光触媒と反応物の間の電子のやりとりや酸素の脱吸着が行われるのは光触媒の表面である。特に、表面酸素の取れ易さなどは表面方位やその構造に依存すると予想されるので、酸素の脱吸着をスムーズに進行させるためには表面構造を制御する必要がある。しかし、過去の文献を調べると、このような研究はほとんどない。現在のところ、人工的に高光触媒活性を得る方法は確立されていないが、今までの我々の研究で、高活性表面を得る方法が存在する可能性が示唆されている。本研究はその可能性を追求するものである。

2. 研究の必要性及び従来の研究

酸化チタンは代表的な光触媒で、過去に報告された多数の文献ではその光触媒機能は主にバンド構造で説明されてきた。この光触媒反応によっては表面酸素原子や吸着水酸基が関与すると考えられる。その場合、光触媒活性は酸化チタンの面方位や表面状態に依存すると予想され、実際にそのことは証明された¹⁾。その後、光触媒活性が高いルチル型酸化チタン(001)面に多重溝を付与すること、HF 水溶液や、400°C での加熱により処理することで(001)面の光触媒活性の変化をしらべた。その結果、400°C に加熱したものや加熱処理後オリフラに平行な多重溝、あるいは45°の方向に多重溝を導入したものも光触媒活性は低かったが、オリフラに垂直な方向に多重溝を導入すると、光触媒活性が約 50% 回復した。つまり、表面のある特定方向に多重溝を付与すると、光触媒活性が回復することが明らかとなった。この手法は他の面方位の単結晶にも適用できるのではないかと考えた。

HF 処理したルチル型酸化チタン(001)面の CTR を解析した結果、(011) フェセット (= (101) フェセット) が存在することが示された。これに UV 照射すると、表面の酸素原子が移動している可能性が示唆された。しかし、酸化チタン(001)面の表面構造について、高光触媒活性を得るために、どのような表面処理が有効であるかは不明である。

3. 期待される効果

ルチル型酸化チタン単結晶の中で一番光触媒活性が高い(001)面の表面構造を維持するのに必要な条件やこれよりも高活性な面の作製法が明らかになれば、高光触媒活性を長時間維持するための方策や酸化物光触媒の高活性化の道筋が見えてくる。

4. 研究の経過及び結果

4.1. 酸化チタン単結晶の光触媒活性

ルチル型酸化チタン単結晶(101)面、(111)面、(001)面に多重溝を付与し、光触媒活性を調べる

実験を次のように行った。

実験方法

試料として主にルチル型酸化チタン(101)面、(111)面、(001)面 ($10 \times 10 \times 0.5$ mm) (信光社)を用い、一部の試料については HF 水溶液で処理するか、 400°C に加熱処理したもの用いた。試料の一部にはさらに次の 2 種類の方法で一方向性多重溝を導入した。第 1 の方法では、紙やすり(1500 番など)を用いて特定の方向に一回研磨して多重溝を導入した。第 2 の方法では、フォトリソグラフィーの方法を用い、特定の方向に $2\text{ }\mu\text{m}$ 間隔の多重溝を導入した。これらの多重溝を顕微鏡などで評価した後、洗浄し、不飽和脂肪酸(リノール酸など)を約 3.0 mg 塗布し、最大強度波長 366 nm あるいは 312 nm の紫外線を照射した。有機酸は光触媒反応により気体となるので、その質量変化を測定することにより光触媒活性を調べた。

結果と考察

この酸化チタンの光触媒作用によるリノール酸の質量減少が C=C 二重結合での分子の切断と関係があるかを調べるために、同一炭素数であるが、二重結合数が異なるオレイン酸(C=C 二重結合が 1 つ)、リノール酸(C=C 二重結合が 2 つ)、リノレン酸(C=C 二重結合が 3 つ)をルチル型酸化チタン(001)面に塗布して UV 照射したところ、オレイン酸 < リノール酸 < リノレン酸の順に質量減少が大きくなった(図 1)。つまり、間接的ではあるが、この結果は二重結合が切断されている可能性を支持する。また、同じ UV 光でも 366 nm にピークがある UV 光より、312 nm にピークがある UV 光の方が不飽和脂肪酸の分解が速いことも示した(図 2)。

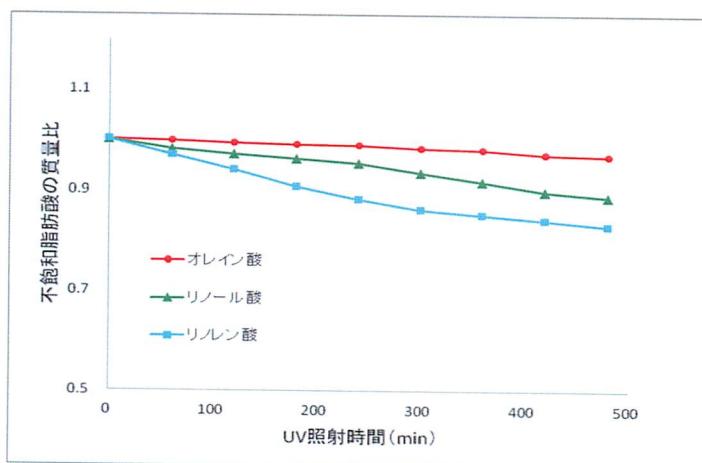


図 1. 光触媒による各種不飽和脂肪酸の分解

研磨面への各種処理と光触媒活性の関係の研究では、単結晶酸化チタン表面に各種の処理を行った後、リノール酸を塗布して UV 照射による光触媒活性をリノール酸の質量減少で評価した。以前の研究で光触媒活性が高かった(001)面を HF 処理したり、 400°C に加熱処理したものや、他の面として(111)面や(101)面をそのまま利用するあるいは、オリフラに対して平行、垂直、あるいは 45° の方向に多重溝を導入(研磨機を用いて)した。その光触媒活性をリノール酸の分解による質量減少で調べた。その結果、全ての場合でリノール酸の質量はほとんど減少しなかった。つまり、

光触媒活性がないし、多重溝によって活性が高まることはなかった。

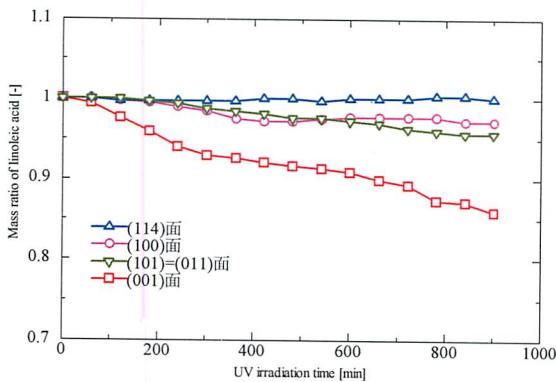


図2 (a) UV照射（波長 366 nm）による酸化チタン上のリノール酸の質量変化

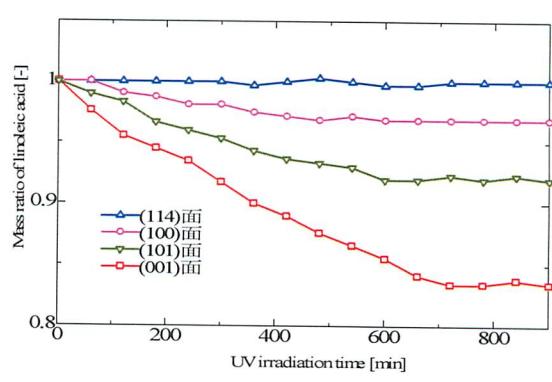


図2 (b) UV（波長 312 nm）照射による酸化チタン上のリノール酸の質量変化

先の研究では多重溝を研磨紙で導入したが、この方法では多重溝の深さや溝の間隔を制御するのが困難である。これらを制御する方法として、リソグラフィーの方法で多重溝を導入してみた。その結果、溝の深さや間隔はきれいに制御できた（図3）。この様にして作製した多重溝付与(001)面の光触媒活性を調べたが、オリフラに垂直な方向（[110]方向）に多重溝を導入した時だけ光触媒活性が回復した（図4）。紙やすりを用いる方法で加熱した(001)面に多重溝を導入した場合も、オリフラに垂直な方向に多重溝を導入すると光触媒活性が回復した。つまり、光触媒活性を高める機構は多重溝の導入方法に依存しないようである。

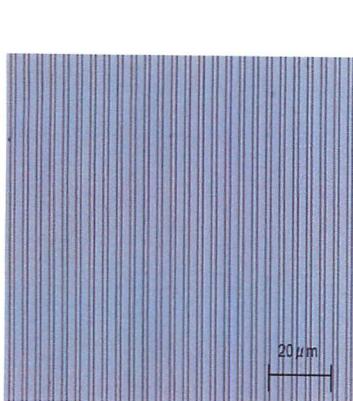


図3. リソグラフィー法で導入した多重溝

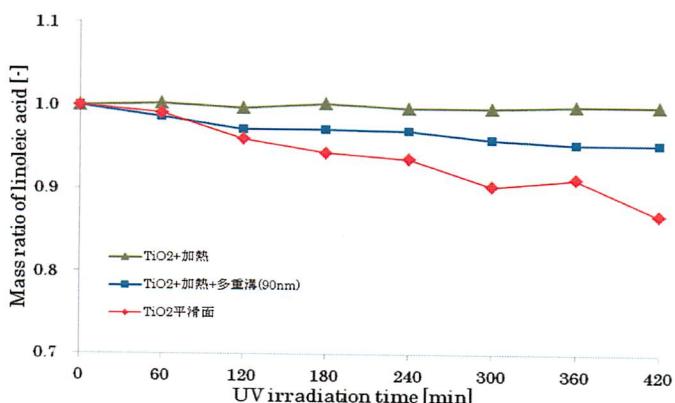


図4. (001)面の光触媒活性と表面処理の関係

光触媒反応は固体の表面で進行し、固体と分解物の接触が重要と考えられる。そこで、これらの各種面の濡れ性を測定したが、as-received (001)面、(101)面や(111)面の間で接触角の差は小さく、(001)面を加熱することによる接触角の減少（濡れ性の増加）の方が大きい。濡れ性が良い方が光触媒活性が高くなると予測できるので、(001)面の加熱による光触媒活性の低下は濡れ性の変化によるものではない。

まとめ

酸化チタン単結晶の光触媒活性の実験では次のことが明らかとなった。

- (1) 酸化チタン光触媒による不飽和脂肪酸の分解は C=C 二重結合が多い脂肪酸ほど分解速度が速く、光触媒反応が二重結合に働きかけていることが示された。
- (2) 光触媒反応に用いる紫外線の波長は、360 nm より、312 nm の方が有効であった。
- (3) 酸化チタン(001)面を加熱処理すると光触媒活性が低下するが、ある特定の方向に多重溝を導入すると、その光触媒活性は回復した。

4.2. 酸化チタン単結晶(001)面の表面構造解析

ルチル型酸化チタン単結晶(001)面の表面構造解析を行った。なお、as-received の(001)面は表面が充分平らでなく、SXRD で CTR が測定できないものであった。SXRD で CTR が測定できたのは HF 処理したものあるいは 400°C に加熱処理したものであった。

解析方法

表面構造の解析では、ルチル型酸化チタン単結晶(001)面($10 \times 10 \times 0.5$ mm)を 5 %の HF で表面処理したものを「HF 処理した(001)面」、400°C で加熱処理したものを「加熱処理した(001)面」とした。SXRD によりこれら試料の測定を行い、データを解析するために Fitting を行った。これは、「SXRD により得られた(001)面の CTR (Crystal Truncation Rod)」と「(001)表面の予測される構造から計算される CTR」を比較する作業である。これにより測定結果と計算結果が一致する「HF 処理した(001)面」の表面構造を求め、さらに加熱処理した面などを調べた。

解析結果と考察

以前の結果¹⁾から、酸化チタンの光触媒活性（酸素が関与する場合）に表面状態（特に酸素の並び方）が大きく関与していることは明らかである。そこで、表面 X 線回折(SXRD)でこれらの表面構造を調べた。研磨したままの(001)表面に電子線を照射したところ、LEED パターンが現れず、SXRD 測定は出来なかった。一方、HF 処理した(001)面や加熱処理した(001)面ではきれいな LEED パターンが得られ、SXRD で測定できた。この SXRD の測定結果(CTR)の解析は複雑で、まだ解析が完了していないが、現段階では次のとおりである。

研磨したままの(001)面では表面原子が秩序化しておらず、SXRD で測定出来ない。しかし、HF 処理すると(001)面の表面原子は秩序化し、その SXRD 結果(CTR)から(101)ファセットが約 2 単位格子の深さまで生じている（図 5）が、それ以上の深さではないことが明らかとなった。一方、400°C に加熱した(001)面は HF 処理した面より少し秩序化は悪いが、SXRD で測定できた。それを解析した結果、やはり(101)ファセットが生じているが、ファセットの途中に段が生じている（図 6）可能性が高い。

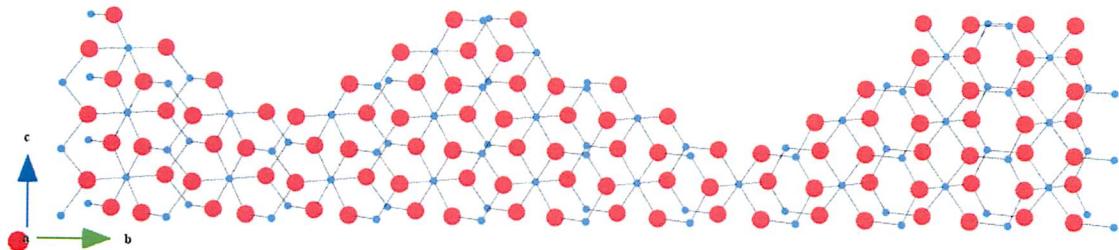


図5. HF処理した酸化チタン(001)面の表面構造（大きい○=酸素、小さい○=チタン）

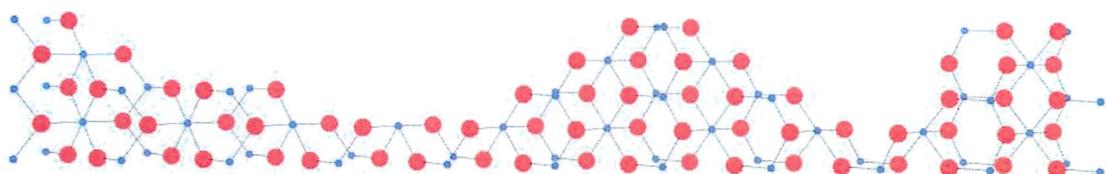


図6. 加熱処理した酸化チタン(001)面の表面構造（大きい○=酸素、小さい○=チタン）

まとめ

ルチル型単結晶酸化チタン(001)面は研磨したままの面で表面エネルギーが高く、光触媒活性がある。この面は SXRD で測定出来なかった。しかし、HF 処理や加熱処理すると、表面は安定な状態へ変化し、SXRD で測定できた。CTR を解析した結果、これらの面は(101) ファセットを作ることが明らかとなった。

5. 今後の計画

酸化チタン単結晶の光触媒活性の研究では、ある特定の方位ではあるが、光触媒活性を回復できる方法があるので、今後、その理由を明らかにするための研究をするべきと考える。表面構造解析の研究では表面構造の解析をさらに深化させ、測定 CTR と計算 CTR がより一致する表面構造を見つけ出す必要がある。

6. 文献

- (1) Y. Ikuma, S. Ogoe, Y. Watanabe, K. Niwa, H. Tajiri and O. Sakata, J. Ceram. Soc. Japan, 121 [2] 254-257 (2013).

7. 研究成果の発表

論文発表

- (1) S. Ogoe, Y. Watanabe, K. Niwa, and Y. Ikuma, "Relation between surface orientation and photocatalytic activity of rutile TiO_2 single crystal," Trans. Mat. Res. Soc. Japan, 38 [4] 687-690 (2013).
- (2) 伊熊泰郎, "いまさら聞けない、こんなこと—第44回、Q73: スピノーダル分解とは何か、耐火物でも起こるのか、" 耐火物, 66 [1] 54-56 (2014).

- (3) S. Anandan, T. N. Rao, R. Gopalan, Y. Ikuma, "Fabrication of Visible-Light-Driven N-Doped Ordered Mesoporous TiO₂ Photocatalysts and Their Photocatalytic Applications," *J. Nanoscience and Nanotechnology*, 14 [4] 3181-3186 (2014).

口頭発表とポスター発表

- (1) Y. Ikuma, S. Ogoe, Y. Watanabe, K. Niwa, S. Anandan, H. Tajiri, O. Sakata, "Photocatalytic activity of rutile TiO₂ single crystal at various surface conditions," *The 19th International Conference on Solid State Ionics (SSI-19)*, Kyoto, Japan (June 4, 2013).
- (2) 小菅陽介、渡邊陽介、丹羽紘一、伊熊泰郎、"酸化チタン光触媒による脂肪酸類の分解、" 第29回日本セラミックス協会関東支部研究発表会（埼玉大学）(2013.9.11).
- (3) 伊藤友貴、宮内裕子、丹羽紘一、伊熊泰郎、"KIT-6から合成したメソポーラス酸化チタンによるメチレンブルー分解、" 第29回日本セラミックス協会関東支部研究発表会（埼玉大学）(2013.9.11).
- (4) 山内英二、大崎聖也、丹羽紘一、伊熊泰郎、"多重溝を付与したルチル型 TiO₂(001)面の光触媒活性、" 第29回日本セラミックス協会関東支部研究発表会（埼玉大学）(2013.9.11).
- (5) 新井翔太、中村咲也香、大崎聖也、丹羽紘一、伊熊泰郎、"ルチル型 TiO₂(100)面などの光触媒活性と表面状態の関係、" 第29回日本セラミックス協会関東支部研究発表会（埼玉大学）(2013.9.11).
- (6) 篠川寛、田村浩一、丹羽紘一、伊熊泰郎、"SBA-15から合成したメソポーラス酸化チタンによる水素発生、" 第29回日本セラミックス協会関東支部研究発表会（埼玉大学）(2013.9.11).
- (7) 黒田大生、大崎聖也、丹羽紘一、伊熊泰郎、"ルチル型酸化チタン(001)面の表面X線回折による構造解析、" 第29回日本セラミックス協会関東支部研究発表会（埼玉大学）(2013.9.11).
- (8) Y. Ikuma, S. Ogoe, S. Nakamura, K. Niwa, S. Anandan, H. Tajiri, and O. Sakata, "Relationship between structure and photocatalytic activity of rutile TiO₂ (001) surface," *International Symposium on Inorganic and Environmental Materials 2013 (ISIEM 2013)*, Rennes, France (2013.10.31).
- (9) 新井翔太、渡邊陽介、中村咲也香、大崎聖也、丹羽紘一、伊熊泰郎、"光触媒活性に及ぼすルチル型 TiO₂の表面修飾の効果、" *23rd Annual Meeting of MRS-Japan 2013, Yokohama* (2013.12.10).
- (10) 黒田大生、大崎聖也、丹羽紘一、伊熊泰郎、田尻寛男、坂田修身、"表面X線回折結果から推定されるルチル型酸化チタン(001)面の構造、" *23rd Annual Meeting of MRS-Japan 2013, Yokohama* (2013.12.10).
- (11) 新井翔太、大崎聖也、丹羽紘一、伊熊泰郎、"ルチル型酸化チタン単結晶への一方向性多重溝付与方法と光触媒活性の関係、" 第8回セラミックフェスタ in 神奈川 (神奈川工科大学) (2013.12.14).
- (12) 小菅陽介、中村咲也香、渡邊陽介、丹羽紘一、伊熊泰郎、"酸化チタン単結晶光触媒活性による脂肪酸類の分解、" 第8回セラミックフェスタ in 神奈川 (神奈川工科大学) (2013.12.14).
- (13) 黒田大生、大崎聖也、丹羽紘一、伊熊泰郎、"加熱処理したルチル型酸化チタン(001)面の表面構造解析、" 第8回セラミックフェスタ in 神奈川 (神奈川工科大学) (2013.12.14).

- (14) 山内英二、大崎聖也、丹羽紘一、伊熊泰郎、”HF処理したルチル型酸化チタン(001)面の表面X線回折結果の解析、” 第8回 セラミックフェスタ in 神奈川（神奈川工科大学）(2013.12.14).
- (15) 篠川寛、宮内裕子、丹羽紘一、伊熊泰郎、”シリコンテンプレート法を用いて合成した酸化チタンの評価、” 第8回 セラミックフェスタ in 神奈川（神奈川工科大学）(2013.12.14).
- (16) 伊熊泰郎、大崎聖也、渡邊陽介、中村咲也香、丹羽紘一、”ルチル型酸化チタン単結晶の光触媒活性に及ぼす表面多重溝の影響、” 日本セラミックス協会2014年年会（慶應義塾大学日吉キャンパス）(2014.3.19).

土壤中の重金属を回収するリユース型バルク状吸着材料および新しい電極の開発

研究者名：応用化学科 竹本 稔

1. 研究の目的

現在、重金属で汚染された土壤を修復するさまざまな技術が開発されている。これらのうち本研究では電気修復法に注目した。この方法は電解液、そしてそれを循環、処理する設備が同時に必要である。土壤修復のために電解液を必要としないシステムに改良するため、汚染物質の吸着特性に優れ、かつ再利用が可能な新しい電極を開発する。

2. 研究の必要性及び従来の研究

重金属で汚染された土壤の修復技術として次のような技術が開発されている。

- (1) 土壤を掘削し、洗浄
- (2) 吸着物質を混合し、吸着させることによって土壤中に固定
- (3) 無害な物質を混合・反応させることによって土壤中に固定
- (4) 土壤洗浄液を電解還元
- (5) 土壤に電極を挿入、通電してジュール熱により溶融し、ガラスとして固定
- (6) 土壤に電極を挿入、通電してイオン化させて回収

重機の搬入が困難な区域にて土壤修復が必要となる場合もあり、土木施工量は限りなく少ないことが望ましい。また土壤中に固定する方法については、溶出の可能性はないとは言っても、汚染の事実を知った近隣住民の不安は簡単に解消できるものではない。したがって上記(6)、すなわち、電気修復法が現時点では理想的な方法であると考えられる。現在開発されている電気修復法は(i)電極、(ii)通電装置、(iii)電解液循環装置、(iv)電解液処理施設、の4つの要素から構成される。(i)と(ii)により土壤からの汚染物質の分離・除去が行われる。汚染物質は電極に付着させず電解液中に蓄積させる。そして(iii)と(iv)より汚染物質の回収を行う。これら設備の設置に十分な面積が確保できない場合もあると思われる。その場合は(i)および(ii)と、(iii)および(iv)を分離することが有効であると考えられ、それには土壤から分離した汚染物質を一旦電極に吸着させる方法がよいと考える。その方法を実現するためには専用の電極を新しく開発する必要がある。

3. 期待される効果

土壤修復という観点からは最低限必要な要素は電極と通電装置であるといえる。例えば

次のようなシステムを構築すれば修復作業に必要な作業面積をかなり縮小することができる。

- ①土壤から汚染物質を分離し、電極に吸着させる
- ②修復作業終了後、別施設にて電極より汚染物質を除去する
- ③汚染物質が除去された電極を別の汚染区域の土壤修復に再利用する

すなわち、現状と比較して汚染区域の地形や建築環境を考慮する必要のない土壤修復システムを構築することができる。

4. 研究の経過及び結果

電気修復法では汚染物質をイオン化して分離・回収する。そのイオン化した汚染物質を吸着させる必要があることから、電気化学的に活性であることが電極に求められる。 $MgTi_2O_5$ のナノ粒子が Li イオン電池の電極材料として利用できる可能性が近年報告された。

図 1 に $MgTi_2O_5$ の結晶構造を示す。中心に Mg^{2+} および Ti^{4+} を含み、頂点が O^{2-} イオンである八面体が連結した構造をとり、比較的大きな空隙を有することが特徴である。この空隙に Li^+ イオンを電気化学的に取り込むこと(インターラーション)ができる、取り込まれた Li^+ イオンは電気化学的に取り出すこと(ディインターラーション)ができる。したがって重金属イオンに対してこれら電気化学的処理を行えば、重金属イオンの回収材料として使用でき、かつ繰り返しの使用が可能となると考えている。

このような重金属イオン回収材料への応用を考え、当年度では Cu^{2+} イオンをインターラーション/ディインターラーションすることができるかどうか、電気化学的測定によって調べることを試みた。まず $MgTi_2O_5$ ナノ粒子を錯体重合法によって作製し、これを用いて作用極を作製した。本研究課題は最終的には水系からの Cu^{2+} イオンの回収を試みるものであるが、前例のない試みであり、印加すべき電圧は不明である。そこで水系よりも高い電圧印加が可能となるアセトニトリル系溶液からの Cu^{2+} イオンの回収を試みた。

4. 1 実験

(1) $MgTi_2O_5$ ナノ粒子の作製

チタンペルオキソクエン酸アンモニウム四水和物($NH_4)_4[Ti_2(C_6H_4O_7)_2(O_2)_2] \cdot 4H_2O$ (“TAS-FINE”、フルウチ化学、Ti 含有量 19.2 wt%)を 2.4926 g 秤量し、50 mL のイオン交

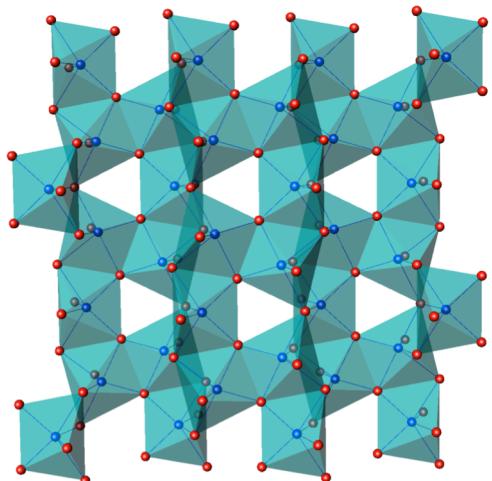


図 1 $MgTi_2O_5$ の結晶構造

換水に溶解させた。さらにクエン酸(和光純薬、純度98.0%)を0.9800 g、酢酸マグネシウム四水和物(関東化学、純度99.9%)を1.0732 gを加え、溶解させた。攪拌しながらホットプレート上で60°C~70°Cの温度で2 h加熱した。その後、エチレングリコール(和光純薬)を0.840 mLを加え、90°Cで1 h加熱した。金属(MgとTi)、クエン酸、そしてエチレングリコールのモル比は3:1:3となる。続いて恒温槽内で、110°Cで一晩加熱し、乾燥させた。さらにマッフル炉で500°C、2 h加熱することにより、目的のMgTi₂O₅を得た。

(2) 作用極の作製

アルミフォイルに、(1)で作製したMgTi₂O₅ナノ粒子を含むペーストを塗布、乾燥させることによって作製した。

MgTi₂O₅を0.42 g、アセチレンブラック(“デンカブラック”、デンカ)を0.12 g秤量し、瑪瑙乳鉢でエタノールを用いて混合し、恒温槽内、60°Cで乾燥させた。混合粉0.3028 gを秤量、瑪瑙乳鉢に移し、これにPVDFのN-メチル-2-ピロリジノン溶液(“KFポリマーL#1120”、クレハ)を0.2804 g加え、さらに粘度調整のためN-メチル-2-ピロリジノン(関東化学)を2 mL追加、混合することによってペーストを作製した。MgTi₂O₅、アセチレンブラック、PVDFの質量比は7:2:1となる。

市販のアルミフォイル(厚さ11 μm)を幅3 cm、長さ10 cmの短冊状に切断した。ガラス板(10 cm x 10 cm)にメンディングテープを7層(単純計算で420 μmのギャップ)、5 cmの間隔を空けて2列貼り、その間にアルミフォイル設置、ガラス棒を用い、ペーストをスキー法で塗布した。塗布エリアが長方形となるよう、ペーストを拭き取ったのち、恒温槽内で、110°Cで乾燥させ、作用極を作製した(図2)。

(3) 電気化学測定

過塙素酸テトラブチルアンモニウム(TBAP、和光純薬)を3.4192 g、酢酸銅(II)(無水)(関東化学、95.0%)を0.0182 g秤量し、アセトニトリル(関東化学、電気化学用、純度99.5%)で溶解し、全量を100 mLとした。これにより、TBAPを0.1 mol L⁻¹、酢酸銅(II)を0.001 mol L⁻¹含む電解液を調整した。

(2)で作製した作用極をプレート電極評価セル(TVM-2、東陽テクニカ)に組み付け、上記の電解液を注ぎ入れ、純度99.99995%のN₂ガスを30分間通じ、溶存酸素を除去した。さらに対極として白金電極(TCE-2、東陽テクニカ)、参照電極としてAg/Ag⁺電極(TRE-5、



図2 作製した作用極の例

東陽テクニカ)を組み付け、電気化学測定セルを構成した。

以上の操作はすべて純度 99.99995 %の N₂ ガスを充填したグローブバック内で行った。

構成したセルをポテンショ/ガルバノスタット (VersaSTAT4、東陽テクニカ)に接続し、サイクリックボルタノメトリーを行った。-2 V～+2 V の範囲で、まず負方向にポテンシャルを掃引し、5 サイクル測定を行った。同一の試料、セッティングで掃引速度を 10 mV s⁻¹、5 mV s⁻¹、50 mV s⁻¹、1 mV s⁻¹ と順次変えて測定を行った。



図 3 電気化学測定セル

(4) キャラクタリゼーション

結晶相の分析は粉末 X 線回折計(RINT2500VHF, Rigaku)を使用して行った。X 線発生条件を管電圧 50 kV、管電流 200 mA に設定した連続スキャン法で測定し、スキャン速度は毎分 4°、スキャンステップは 0.02° に設定した。得られた回折パターンを JCPDS カードデータと照合し、生成した結晶相の同定を行った。電気化学測定前後の試料について、スペチュラを用いて作用極から剥がして回収し、100 面カットされた Si ウェハー上に載せて測定した。測定後の試料についてはエタノールに浸漬して電解液を除去したのちに測定の対象となった部分(直径 1 cm)のみ回収し、測定を行った。

電気化学測定後の試料について走査型電子顕微鏡(島津、SSX-550)に付属のエネルギー分散 X 線分光装置を使用して元素分析を行った。アルミニウム製試料台に貼り付けたカーボンテープ上にアルミフォイルごと貼り付けて分析試料とした。測定前後の電解液についても分析を行った。アルミニウム製試料台に貼り付けたカーボンテープ状に電解液を滴下、乾燥させ、金をスパッタリングして分析試料とした。

4. 2 結果

図 4 にサイクリックボルタノメトリーの結果を示す。測定によってサイクリックボルタモグラムの形状が異なっている。1 回目(a)と 2 回目(b)では-1 V 付近で還元電流が、+0.4 V 付近で酸化電流が急激に増加している。3 回めではこれら電流の急増が見られなくなり、4 回目以降は還元電流の発生が検出されておらず、酸化電流のみ検出されていると考えられる形状となっている。これらボルタモグラムの解析は現在進行中である。

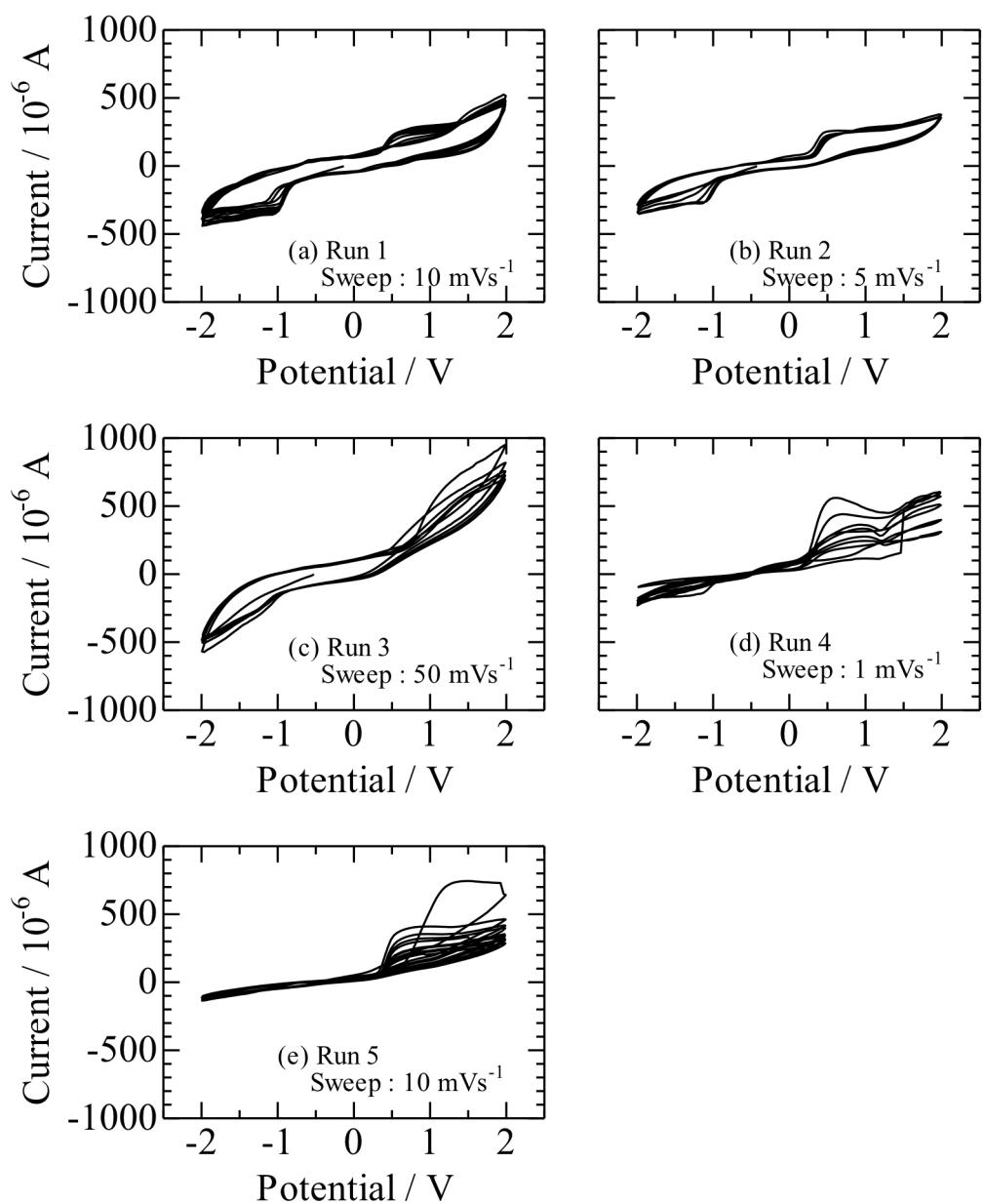


図4 サイクリックボルタントリーの結果



図5 電解液の色調の変化

測定中、徐々に電解液の色調は変化した。そのようすを図5に示す。測定開始時は電解液調整直後と同様、水色であったが、測定を進めるにつれて青味が失われ、一連の測定が終了したのちには完全に青味が失われ、黄色を帯びた電解液となつた。測定中に電解液が何らかの変質を起こし、それにともなつて、サイクリックボルタモグラムの形状が変化したと考えられる。

図6に粉末X線回折測定結果を示す。測定前(a)については MgTi_2O_5 の回折ピークが検出されている。測定後(b)についても MgTi_2O_5 が検出された。ただし、前述のとおり試料の量が希少であるため、ピークの強度はかなり弱い。 $2\theta = 13.5^\circ$ に出現する幅広いピーク(測定前試料でも検出されている)や、 $2\theta = 27.9^\circ$ 、 32.2° 、 46.3° 、 48.7° に出現する鋭いピークの原因は不明である。なお、電解液の乾燥物を同様に測定したが、上記の不明なピークは検出されず、少なくとも電解液に由来するものではないことは確認できている。

図7にエネルギー分散X線分光の測定結果を示す。電気化学測定後の作用極(a)についてはMg、Tiの他、Al、Cl、そしてCuが検出された。Alは下地であるアルミフォイルに由来すると思われる。Clは電解液調整に用いたTBAPに由来すると思われる。これら以外にもピークが観測されているが、これらはコンタミネーションによるものと推測している。ピークの積分強度からZAF法によってモル比を見積もると $\text{Mg} : \text{Ti} : \text{Cu} = 26.0 : 1.0 : 0.1$ である。

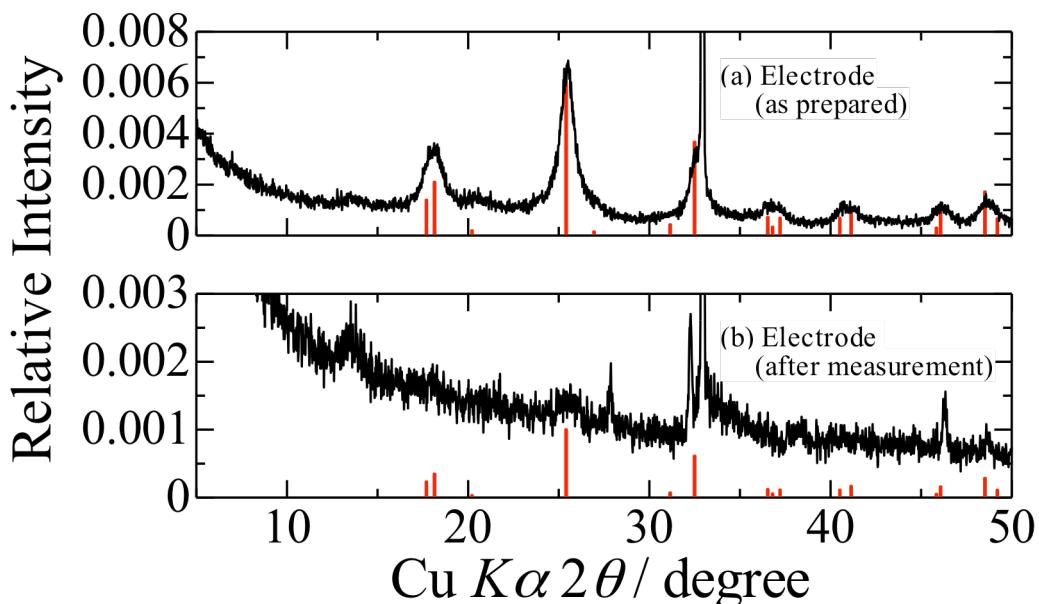


図6 電気化学測定前(a)、および測定後の電極の粉末X線回折測定結果。図中の赤い縦棒は MgTi_2O_5 のJCPDSデータ(#79-08333)である。 $2\theta = 33^\circ$ 付近の鋭いピークは試料ホルダーに由来するものである。

57.6 : 16.0 となる。Mg と Ti の比は MgTi_2O_5 における 1 : 2 に近く、粉末 X 線回折測定から MgTi_2O_5 相が検出されたことと対応している。注目すべきは Cu が検出されていることであり、モル比で Cl の 6.3 倍検出されている。先に記したように電解液中の濃度は TBAP が 0.1 mol L^{-1} 、酢酸銅(II)が 0.001 mol L^{-1} であったから、電気化学測定後は Cu が異常に高い濃度で作用極に存在していることになる。

同図(b)、(c)はそれぞれ電気化学測定前、測定後の電解液についての測定結果である。いずれも TBAP に由来する Cl が検出され、さらに Cu が検出されている。Cl と Cu のモル比は測定前で 94.7 : 5.3、測定後で 97.3 : 2.7 と見積もられ、測定後、電解液中の Cu の濃度が減少していることが分かった。したがって、電気化学測定によって電解液中の Cu は作用極に濃集したと考えられる。しかし、その Cu がどのような形態で作用極に存在するかは現時点では判明していない。

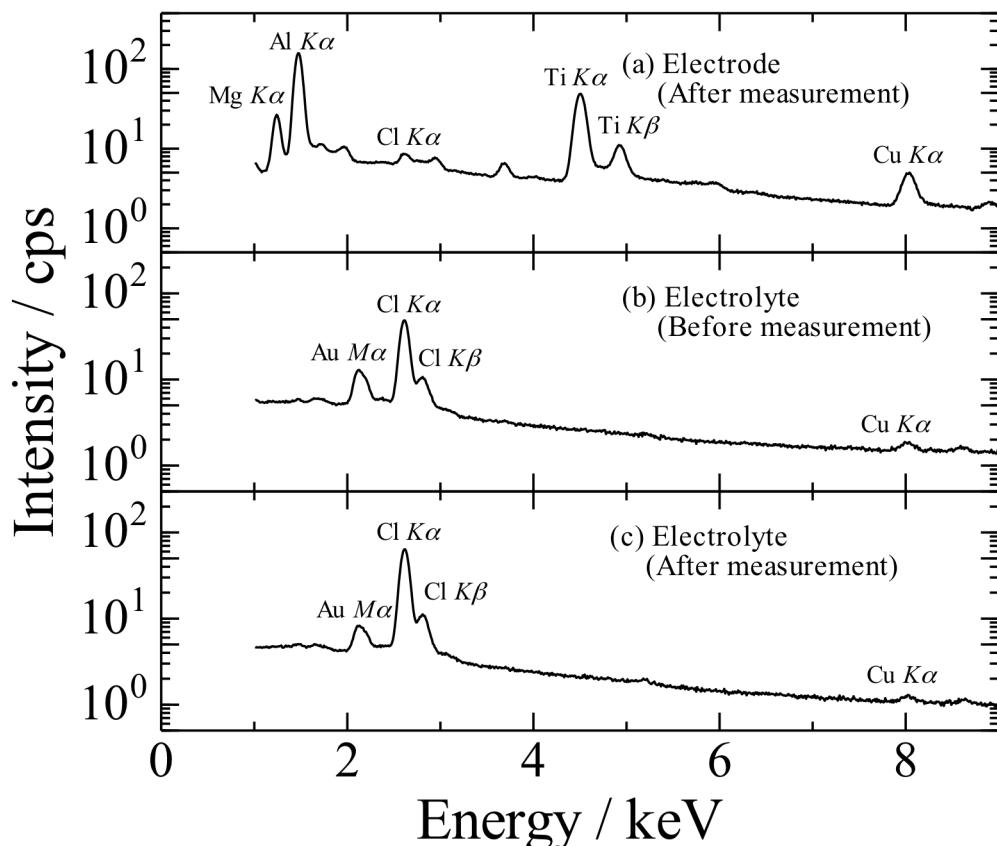


図 7 エネルギー分散分光分析の結果。(a) 測定後の作用極、(b) 測定前の電解液、(c) 測定後の電解液。

5. 今後の計画

当年度は、まず錯体重合法による $MgTi_2O_5$ ナノ粒子を作製し、これを用いて作用極を作製、アセトニトリルを溶媒とする有機系電解液を用いて Cu のインターカレーション/ディンターカレーションを試みた。現時点で電気化学測定の結果の解析が進んでいないため、インターカレーション/ディンターカレーションが起こっているかどうか判明していない。ただし、エネルギー分散 X 線分光によって電気化学測定後の作用極に何らかの形態で Cu が濃集していることが示されたことは注目に値する。

今後の計画としては電気化学測定結果の解析を進めることはもちろん、本実験系における電気化学反応をより深く理解するために、Cu を含まない電解液を用いた測定(プランク測定)を行い、Cu を含む電解液を用いた今回の測定結果と比較することが挙げられる。また、今回の測定では-2 V～+2 V を電圧掃引範囲としたが、さらにこの範囲を拡大して測定することを考えている。

6. 研究成果の発表

当該研究期間において十分な成果が得られなかつたため、現時点で研究成果の発表は行っていない。

神奈川県内の河川水温の推移とその影響について

Long-term variations of river temperature and their effects on invertebrates in Kanagawa

Prefecture

石綿進一（神奈川工科大学/神奈川ウォーター・ネットワーク）

齋藤和久（相模湾海洋生物研究会）

高村岳樹（神奈川工科大学環境科学研究所）

1. はじめに

環境省^①は、「気候変動による水質等への影響解明調査」を公表した。そこでは、この30年間、全国的に河川水温が上昇傾向であること、同時に記録された最高、最低水温も上昇傾向にあり、このうち人口集積地はヒートアイランド効果、人工排熱影響等により水温が上昇しているとした。また、この報告書では、河川生態系への影響については、メカニズムの複雑さや予測の不確実性等から既存の知見の整理にとどめていて、生態系への将来影響予測についてはふれてない。一方、神奈川県内においても、金目川など県内河川の水温が上昇傾向にあることを指摘するとともに、人為的な要因による河川水温の上昇が、水生生物の生息に影響を与える可能性があるとした^{②、③}。本報では、神奈川県内で経年的に実施されている河川水質モニタリング結果から水温の経年変化を報告するとともに、今、私たち周辺の河川でどのようなことが起きているのかを述べてみたい。

2. 方法

河川水質のモニタリングについては、公共用水域における常時監視が水質汚濁防止法の下に行われている^④。このうち筆者らは、神奈川県下の河川27河川(87地点)の水温データ(1974-2011)を用い、各年度における河川水温の平均値、分散(最高水温、最低水温)を調べた。また、それぞれの平均値から経年的な変化を調べる目的で、回帰直線を求めた^⑤。そのうち、平均水温の上昇傾向の強い上位16地点(2°C以上の上昇が確認された地点)について、1976年以降最近まで、各年に記録された最低水温を調べた。さらに、水温変化が生物に与える影響などについて考察した。

3. 結果及び考察

1) 過去40年間の水温の推移

神奈川県の河川モニタリング地点のうち、平均水温の上昇傾向が確認された地点は85%(74/87地点)、下降傾向が認められた地点は14%、(12/87地点)、変化が認められなかった地点は1% (1/87)であった。そのうち、測定開始時期(1974-1980年)から2010年代に

かけて30年間以上のデータの蓄積のある地点について、水温の推移を調べると96%の地点で水温上昇傾向が確認された(各年の平均水温の上昇した地点:73/76)^⑤(図1)。平均水温の上昇傾向が強い地点は、大綱橋、矢上川橋、亀の子橋、末吉橋(いずれも鶴見川)、川名橋(境川)であり、それぞれ、約30年間に4.4°C、4.1°C、3.9°C、3.5°C、3.2°C上昇した(例えば図2-1)。平均水温が測定期間の約30年間で2°C以上の上昇が認められている上位16地点について、1976年以降2011年まで、年間示される最低水温が10°Cを超える地点が確認され、その確認頻度が年々増加する傾向がみられた(図3)。また、最高水温及び最低水温の経年的な変化は、夏期に比べ冬期に水温が上昇する傾向を示した(図2-1、2-2)。

一方、多摩川、鶴見川、境川の3河川を除く他の県下の河川では、95%の地点で水温上昇が2°C未満であった(例えば図2-2)。

環境省の公表^①では、この30年間、全国的にみて河川水温は上昇傾向にあり、北海道、東北を除き8割程度の地点で水温上昇が確認され、さらに3~4割程

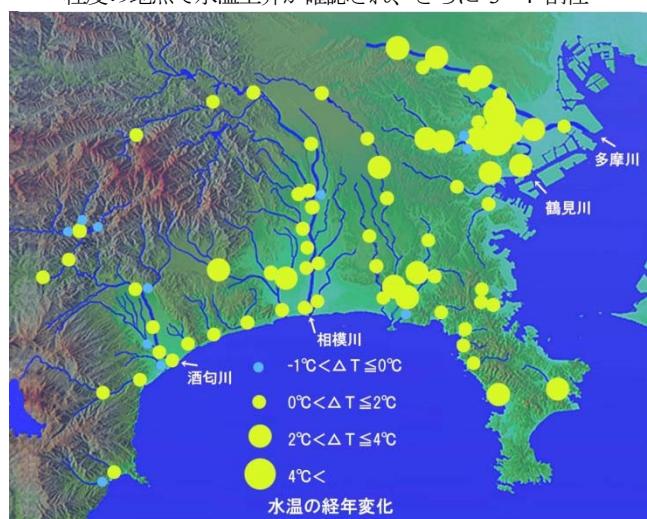


図1 神奈川県下河川各地点の水温の変化

(主に1974-2011年)

度の地点で夏期・冬期いずれかの水温が上昇している。

県内河川の調査では、8割以上の地点で水温上昇が確認され、一年に0.1°C以上上昇している地点も確認されている（大綱橋、矢上川橋）。これらのことから、河川水温の上昇は県内のほぼ全域の河川に及んでおり、なかでも都市部の河川にその傾向が著しいことが分かった。

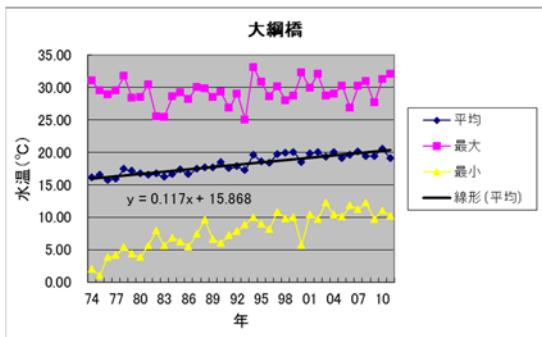


図2-1 大綱橋（鶴見川）

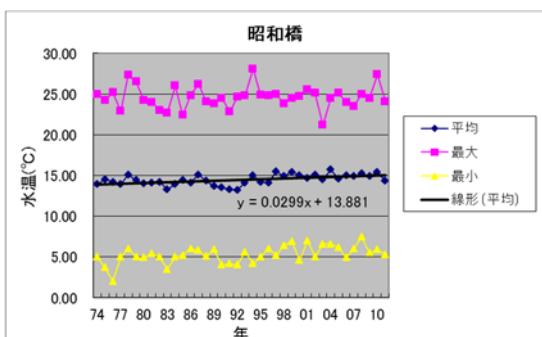


図2-2 昭和橋（相模川）

図2 水温の経年変化

図中の平均、最大及び最小は、年ごとの平均水温、最高水温及び最低水温を示す。石綿他⁵⁾から転記。

2) 河川水温と下水道

多摩川をはじめとする大都市を流れる河川は、水温という共通する特徴的な類型に区分され⁶⁾、鶴見川、境川の中・下流域でも同様な傾向にある。これらの流域には下水処理施設が多く存在し、河川流量の半分あるいはそれ以上が処理水によって占められている^{7)、8)、9)}。今回のデータ解析では、約30年間で2°C以上の上昇が確認された多摩川、鶴見川、境川のすべての地点の上流域には、下水処理施設が存在することから、水温上昇は下水処理施設の排水によるものと推定される。

ここで、下水道排水の水温について述べてみたい。

一年を通した処理排水の水温は、河川水温と比較してその変動幅が少ない。冬期、処理排水が河川に合流した後の水温を上昇させるといった報告^{10)、11)}や、その反対に、一斉調査で明らかになったように（柏尾川の上流）夏季に河川水温を下げるといった現象¹²⁾や同様な指摘もある¹¹⁾。このように河川水温の上昇、なかでも、都市部におけるそれは、下水処理場の排水に負うところが多く、特に、流域下水道は処理対象とする流域の面積が広くその影響は大きい。下水処理場へ流入する下水の水温と下水処理場から放流される処理水の水温の季節的な変化については、中山ほか¹³⁾によると、東京都の13処理場では、下水処理場への流入水の水温と下水処理場から放流水の水温（平均値）の挙動は類似しているとし、この調査事例では、冬は約18°C、夏

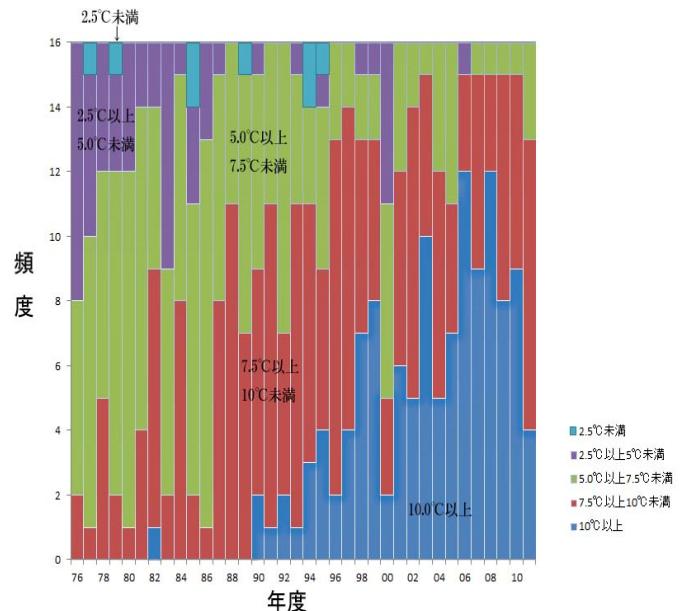


図3 過去約40年間（1970年代-2010年代）

の年間最低温度の推移

水温上昇傾向の強い上位16地点の各温度帯の推移の頻度分布

は約28°Cになるという。その処理場への流入水温と河川への放流水温は、冬にほぼ等しく、夏に放流水温がやや高く、処理場で下水に熱が加えられていることを示唆している。また、一日の流入水温と放流水温は処理施設の滞留時間の間に水が混ざり合うため、ほとんど変化することはないとしている。したがって下水処理場は下水の水温を平滑化し水界へと放流する特徴を持っている。

近年の処理場の設置には、処理水と雨水などを分けて処理する分流式の処理方法をとることが一般的である。合流式である場合は、分流式並みの汚濁負荷とな

るよう、改善が義務付けられている。汚濁の高い初期雨水や廃油ボールの河川への流出を抑制し負荷を抑えようとする対策である。河川などの水質汚濁は、当初、都市河川に集中したことから、下水処理場は都市部及びそれに隣接した河川周辺に設置され、それらの多くの施設は、合流式の下水処理を実施しているのが現状である。現在では、この処理方式が改善され、横浜では7割¹⁴⁾ほどが分流式の処理を採用している。しかし、都市部では、未だ合流式をとっている施設も存在する。

3) 水生動物と水温上昇

Daufresne 他¹⁵⁾によれば、ローヌ川の中流域では、過去20年間で水温が1.5°C上昇し、それにともなって、南方系や好温水性のコイ科魚種や下流に生息している好温水性の無脊椎動物（ナガレアブ科、コモチカワツボ）が好冷水性のコイ科魚種や上流に生息している水生昆虫（ミドリカワゲラ科、オナシカワゲラ科）に代わって優占するようになったとしている。わが国では、冷水性の淡水魚種や水生無脊椎動物のヒガシカワトンボについての調査事例¹⁶⁾がある。前者は、気候変動（水温上昇）に伴い、淡水魚類の分布域の変動（縮小）を予測（本フォーラム要旨集参照）し¹⁷⁾、後者では、ヒガシカワトンボの水温上昇による化性の変化が指摘され、いずれも急激な水温上昇に警鐘を鳴らしている。河川水温上昇に関わる水生動物相への影響について、わが国での調査事例は見当たらないが、神奈川県が実施している底生動物のモニタリング結果を紹介したい^{18)、19)}。それによると、半数に満たない地点で確認されていた外来の無脊椎動物¹⁸⁾が、ほぼ10年後の調査では、70%を超える地点でその生息が確認された¹⁹⁾。また、この調査で新たに侵入が明らかになった種（アメリカツノウズムシ）の存在や、この種を含めこれまで確認されていた外来の無脊椎動物が、すべての調査河川で増加し、分布をさらに拡大していることが明らかにされた。外来の無脊椎動物のわが国への侵入については、複雑な要因があると考えられるが、今回観測された河川水温の上昇に関係している可能性は無視できないものと考える。

ここで、生物の生育と温度について生理的な側面から述べてみたい。生物の生育と温度の関係は、もっとも基本的な生理現象である。このうち、昆虫の発育零点と有効積算温量は、昆虫の世代数や出現期などの予測に欠かせないパラメータである。桐谷^{20)、21)}は、無脊椎動物（昆虫、ダニ、線虫）の発育零点と有効積算温量について総説し、その中の昆虫の高温障害の項で発育零点と最短発育温度（高温域の生存限界に非常に近い温度）について述べている。それによると、昆虫の高温障害を考えるうえで最短発育温度が重要であるとし、低温側の致死的な温度が発育零点よりはるかに低い温度域にあるのに反して、その最短発育温度は生存限界に非常に近い温度であるとした（図4）。一般に、無脊椎動物の高温障害温度域はいずれも30°C前後を

示し、実際の高温障害がみられるのは、多くは28~32°Cの範囲であるとしている。

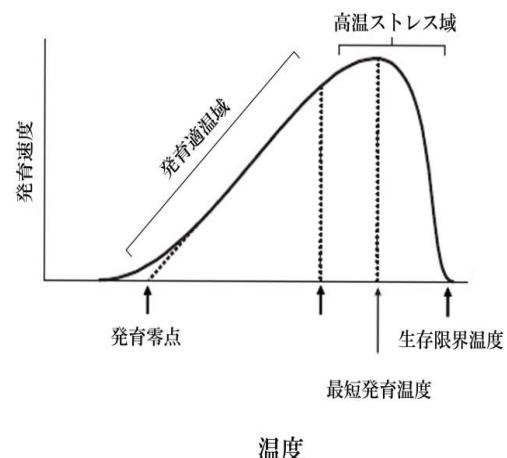


図4 発育速度と温度との関係の閾値の模式図

桐谷²⁰⁾を一部改変し引用

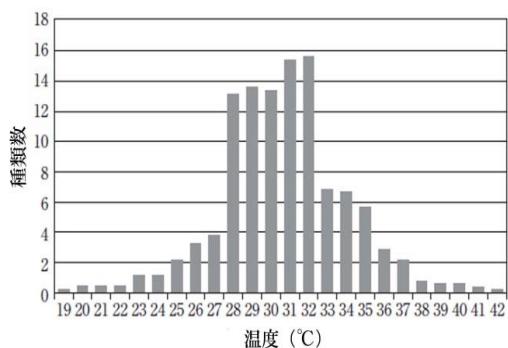


図5 陸上昆虫119種について温度と高温障害の

出現頻度

桐谷²¹⁾を一部改変し引用

一方、低温域については、水生の半翅類やトンボ類、外来のゾウムシは比較的高い発育零点を示すが、その他は10°C前後の値やそれ以下の値を示す水生昆虫が多い（表1）。陸生の昆虫類の場合、大きな目であるコウチュウ、カメムシ、ハチ、チョウ目の119種を取り上げて、その発育零点を調べた結果、4目とも10°Cを中心に7~14°Cの範囲にあるとした^{20)、21)}、（図5）。先にも示したように、1990年以降、最低水温が10°Cを超える計測結果が得られ、その頻度が増加する傾向がみられた。したがって、発育零点が10°Cあるいはその付近に発育零点をもつ生物にとっては、休眠打破に困難を伴うか、あるいは本来曝されるべき一定の低温期

間の不足を意味する。これは、それぞれの生物の生理に大きく作用し、休眠不可や覚醒後の発生の斉一性に

影響することになる。

表1 主な水生昆虫の発育零点

出典は桐谷の総説から転記、他は原著論文を引用

目名	種名	学名	ステージ	発育零点(°C)	出典
カゲロウ目	モンカゲロウ	<i>Ephemera strigata</i>	幼虫(♂)	8.8	Takemon ²²⁾
			幼虫(♀)	9	Takemon ²²⁾
	オオシロカゲロウ	<i>Ephoron shigae</i>	卵	11	渡辺他 ²³⁾
トンボ目	ベッコウトンボ	<i>Libellula angelina</i>	卵	11.6	桐谷 ^{20,21)}
			卵	11.9	桐谷 ^{20,21)}
	ウスバキトンボ	<i>Pantala flavescens</i>	卵	14.1	桐谷 ^{20,21)}
			幼虫	12.6	桐谷 ^{20,21)}
	アキアカネ	<i>Semperium frequens</i>	卵	10	桐谷 ^{20,21)}
カメムシ目	ヒメイトアメンボ	<i>Hydrometra procera</i>	幼虫	14	桐谷 ^{20,21)}
	コオイムシ	<i>Diplonychus japonicus</i>	幼虫	14.3	桐谷 ^{20,21)}
	オオコオイムシ	<i>D. major</i>	幼虫	11	桐谷 ^{20,21)}
	ナベブタムシ	<i>Aphelocheirus vittatus</i>	卵	10.2	石田・吉安 ²⁴⁾
	トゲナベブタムシ	<i>A. nemae</i>	卵	8.2	石田・吉安 ²⁴⁾

目名	種名	学名	ステージ	発育零点(°C)	出典
トリケラボ目	ニンギョウトビケラ	<i>Goera japonica</i>	幼虫	4.2	桐谷 ^{20,21)}
	ウルマシマトビケラ	<i>Hydropsyche ulmeri</i>	卵	7.8	桐谷 ^{20,21)}
			幼虫	9.4	桐谷 ^{20,21)}
ヒグチボウムシ目	オオナガレトビケラ	<i>Himalopsyche japonica</i>	卵	2.5	鶴石他 ²⁵⁾
	ヒグナガカワトビケラ	<i>Stenopsyche memorata</i>	幼虫	4	御勢 ²⁶⁾
			蛹	13	御勢 ²⁶⁾
コウチユウ目	イネミズゾウムシ	<i>Lissorhoptrus oryzophilus</i>	卵	15.5	桐谷 ^{20,21)}
			幼虫	12.1	桐谷 ^{20,21)}
	ゲンジボタル	<i>Luciola cruciata</i>	繭室中の成虫	3.8	桐谷 ^{20,21)}
			羽化のための上陸	8	桐谷 ^{20,21)}
	ヘイケボタル		蛹	11.1	桐谷 ^{20,21)}
	シャーブゲンゴロウモドキ	<i>Dytiscus sharpis validus</i>	卵	7.3	関口・山本 ²⁷⁾
			卵	4.2	桐谷 ^{20,21)}

茅野²⁸⁾は、昆虫が冬という季節を生き残らせる手段を進化の過程で獲得し、これが現在の昆虫の繁栄をもたらした大きな要因であるとした。つまり、休眠が破れるための冬期の一定期間の低温暴露が、個体ごとに不揃いであった成長速度の斉一化、それに続く春から初夏にかけて一期に開始する生命活動の同調化など、それぞれの生活史を円滑に遂行するため、昆虫にとって冬は必ずなくてはならぬ季節なのであるとした。そして、もしも仮に地球上から冬というシーズンをなくしたら、多くの生物にとってどのようなことが起こるか、想像するだけで十分であろう。少なくとも、それは、多くの昆虫にとって、地球上のある地域からの種の絶滅を意味するにちがいないと結んでいる。

4) オオシロカゲロウ(図6、7)の生態と水質

ここでオオシロカゲロウについて、水温とのかかわりで研究された事例があるので紹介したい。この種は日本産カゲロウ類のなかでも大型で、日本では本州、四国、九州の比較的大きな河川の中・下流域に分布する²⁹⁾。埼玉県では特定昆虫 E 基準(絶滅したと思われる種)³⁰⁾としてあつかわれている。これまでに相模川、多摩川にも記録がある。相模川では、最初のオオシロカゲロウの記録は1980年代³¹⁾で、その後、数回、新聞などで報道されていて、近年^{32),33)}になって昭和橋と座架依橋付近で大量に発生していることが話題となつた。この幼虫の記録の最下流域は、汽水域に近い神川橋付近である^{18),19)}。多摩川の最近の記録は日野用水で^{34),35)}、現在でも生息していることを確認している。これについては後述する。

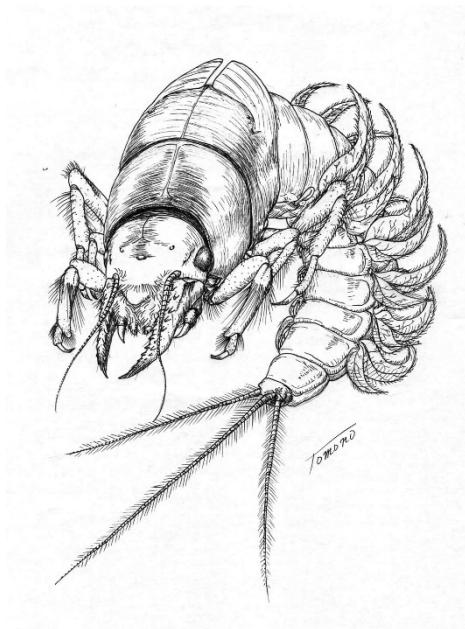


図6 オオシロカゲロウの幼虫



図7 オオシロカゲロウの雄成虫

オオシロカゲロウは9月の初め頃、数日間で大量に一斉羽化することから、マスコミにもしばしば取り上げられる知名度の高いカゲロウである。志賀直哉の短編「豊年虫」は、まさにオオシロカゲロウのことを指していて、光に集まるこのカゲロウが巧みに描写されている。このカゲロウの一時的な大量発生により、とりわけ、橋の水銀灯に飛来し乱舞する成虫・亜成虫（以下成虫とする）が交通妨害となり、さらに道路に積もった死骸や卵によって自動車のスリップ事故が起きるなどの事例がしばしば報道される。このようなことから、河川管理者、漁協関連の人達によく知られた昆虫といえる。繁殖行動が特徴的で、夕方に羽化した成虫は、その日の数時間のうちに交尾・産卵し、死に至る。羽化してわずか数時間、きわめて短な成虫時代をおくる。幼虫は川床に生息し、水質が比較的清澄で大きな河川であれば、どこにでもいる普通種といつてもいいだろう。たとえば、私たちが調べた例では²³⁾、全国の一級河川のうち、オオシロカゲロウが発生した河川の69%がBODの値1mg/l以下で、同じ水質を示す河川は、全1級河川の36%にすぎないことが分かった。また、残りの31%は、BODが2mg/l- 5mg/lの河川で発生し、8mg/l以上の河川では確認されなかった。のことから、このカゲロウが清冽な河川に多いことが分かる。

5) オオシロカゲロウの孵化と水温

9月に産卵されたオオシロカゲロウの卵は、その後冬期の休眠を経て春先に孵化する。これまでの室内実験では、常温におかれたこの卵は、眼点が確認される後期まで発生が進行するが、その後卵発生は停止する。

その後の冬期の低温期を経て、再度加温することにより孵化に達する。このカゲロウの孵化実験では、曝される実験温度が低いほど、またその期間が長いほど、孵化率が上昇するとともに孵化の斉一性が保たれるという^{23), 36), 37)}。例えば、75日間、0-8°Cのインキュベートで80%の孵化率で一斉に孵化したのに反し、同期間、14°Cでは、約20%の孵化率でその孵化の期間が一ヶ月続くとした³⁸⁾。さらに、オオシロカゲロウの分布の南限が大分県の番匠川であるとし、この種の分布をさらに南の水域に拡大できない理由として、この河川より南では冬期水温がさらに高いことにあると推測した。ここで、番匠川の冬期の過去10年間（1984-1993年）の平均水温は約15°Cであり10°Cを下回ることがごく稀であるとし、他の高緯度の河川と比較し冬期水温の著しく高いことを示した。また、近隣の大分川について、オオシロカゲロウの一日に羽化する成虫の経日変化を明らかにし、他地域の経日変化に比較して、大分川のオオシロカゲロウの羽化が一ヶ月に及び長期間続いていることを示し、羽化にかかる水温の重要性を指摘した。そして、秋から春にかけての水温がこの種の分布を決定する主要因と考えた³⁹⁾。したがって、本種に対する温度の影響が、孵化後の羽化時期、強いではそれぞれの分布や生息に大きく係ることが推測される。

6) 多摩川のオオシロカゲロウ

本種の分布する多摩川ではどうであろうか。これまで本種の本流での記録は押島橋付近の限られた水域（押島橋、多摩大橋）⁴⁰⁾、及び日野用水堰と二か領用水堰⁴¹⁾である。これらのうち、前者は1975年の採集

記録でこれが多摩川で最も古く、それ以前の記録はない。後者は、1995年の河川モニタリングの結果であつて、最近の記録はない⁴¹⁾（本流での調査結果では、1964⁴²⁾、1981⁴³⁾、2001⁴¹⁾、2007^{41), 44)}、2012⁴¹⁾の調査では確認されてない）。一方、支川では、秋川の下流域⁴⁰⁾と谷地川⁴⁵⁾の記録があり、前者は1965-1980年、後者は、2000年の記録があるが近年確認されてない。日野用水では、ほぼ毎年確認されていて⁴⁰⁾、多摩川における現時点での確実な生息地である。二か領用水堰を除いたいざれの地点も、下水処理場より上流に位置しており、排水による影響がないところである。

本来、この種の生息域は河川の中・下流域に広く生息し、相模川においても生息域の下限は汽水域近くまで確認されている。利根川や荒川などの河川でも汽水域上部でこの種の生息を確認している。したがって、この種の生息域は特殊な場合を除き、河川の広範な水域を生息の場所としていて、相当下流にまで生息していると考えられる。本流の調査において、本種の過去の記録が少ないと記録がないことで、本種が生息していないと結論を下すことは早計であるのかもしれない。しかし、先に示したように、成虫の生態について、これだけ注目度の高いカゲロウである本種が、多摩川の中流域から下流域にかけて（この場合、日野橋より下流域）これまで報告が全くないということは、生息しているとしてもきわめて少ない密度であるのだろう。

多摩川の水質は、東京への急速な人口と産業の集中に伴い、汚濁物などの混入により水質汚濁が目立ち始め、下水道の整備の立ち遅れ、多量の生活排水の流れ込みの結果、水質は徐々に悪化した^{46), 47)}。1960年頃には多摩川の水質は悪化の一途をたどり、1970年代にはBODが10mg/lを超えることがあったが、その後、工場等の排水規制、流域下水道の整備などによって改善され、1990年代にはBOD5mg/l以下を達成するようになった。二か領用水堰でこの幼虫が記録されたのは、まさにこの頃である。このように、有機汚染などの水質が改善されたとしても、下水道の普及により、河川水温が徐々に上昇し、1990-1995年以降、多摩川本流の日野橋より下流では、冬期（12-1月）の平均水温が10°Cを継続して超えていることが報告されていて、2006-2010年においては同じ地点で12°Cを超えるレベルにまで達している¹¹⁾。

本来、大河川の本流に生息場所をもつこのカゲロウが、いつごろから人工の用水路に生息場所を求めたのかは、現時点では不明である。多摩川の汚濁が進行する以前には本川に生息していて、おそらく、見渡す限り川面を覆い尽くすオオシロカゲロウの大量飛翔といった光景は、他の河川同様、普通のように見られていたのであろう。しかし、汚濁の進行に伴い本流からその姿を消すようになったと考えられる。日野用水の取水堰は、現在設置されている8か所の下水処理場より上流地点に位置していることから、これらの影響はないと考えていいだろう。日野用水は、江戸時代にはす

でに造られていて、農業放水として機能していた。そのころ、本川から移り棲み分布を広げていったと考える。たとえ水質が改善された現時点であっても、冬場の高水温のことを考えると、本川には生息できないか、あるいは日野用水から飛来し産卵しても、卵の越冬、休眠打破など、生理的にみて本種の生息には困難を伴うものと推測される。

4. おわりに

ウグイスの早鳴き、サクラの開花など動植物の示すフェノロジー（生物季節）は、四季の移り変わりを諸器官の感覚で感じるといった古の昔から私たち日本人が愛してきた文化である。しかし、近年の開花時期の早まりは、温暖化や環境問題の話題に及ぶことも少なくなく、社会的関心が高くなりつつあるようだ。気象庁のレポートでも、全国的なサクラの開花の早まりや都市化による気温上昇、いわゆるヒートアイランド現象が示唆されている。また、暖かい地方では暖冬の影響でサクラの休眠打破の時期が遅くなり、現在よりも開花が遅くなったり、満開にならずに散ってしまう年も観測されるようだ。いわゆる、休眠打破が正常に行われにくくなっていることが原因ではないかと考えられている⁴⁸⁾。ここに述べたように、水界においても、同じ現象が現われているのではないだろうか。

私たちが実施した夏季の河川水温の一斉調査で30°Cを超える地点が多く観測され¹²⁾、この数値が、魚類や無脊椎動物など水界の生物に対して高温障害をもたらす温度にきわめて近い。一方、冬季の最低気温が年ごとに上昇し、10°Cを超えることが近年多くなっていることも変温性の河川生物にとってもまたリスクの高いといえる。観測された河川水温の測定温度が、すべてその周辺の水環境の温度とは言い難いことは、今回のフォーラムにおいても指摘されている⁴⁹⁾。しかし、毎年記録される河川水温が徐々に上昇し、夏期及び冬期に計測される水温はともに河川に生息する生物の生育を脅かす温度にまで達していることは十分想像できる。

今回、紹介したオオシロカゲロウは、その特徴的な生態や形態から、水生昆虫のなかでは、生理、生態、分布といった過去からのデータの集積が多いカゲロウといえる。しかし、桐谷²¹⁾の指摘のあるように、水生昆虫のデータは、その必要性から、農業害虫、衛星害虫などに比べてきわめて少ない。直接的な被害が及ぶことのない昆虫に対する研究的な関心が低いことにあらのだろう。水生昆虫類は、環境の指標生物として、もっと注目されるべき分類群であると考える。

これまでに相模川でも502種の無脊椎動物が確認⁵⁰⁾されている。分類学上の研究の遅れから、名前が命名されて（戸籍の）ない生物もたくさん存在するので、おそらく、さらに多くの動物が生息していると考える。これらの生物は、河川の生態系の底辺を支える大変重要な構成要素であることは間違いない。

以前、私たちは、神奈川県が置かれた地理的環境が、

都市と自然が隣接し、しかもいくつかの著明な観光地が存在することから、外来種がいち早く野外に分布拡散しやすい見本市と例えたことがある⁵¹⁾。外来種の野外での影響はもとより、水温上昇の影響を事前に察知することは、いろいろ研究は進みつつあるものの、今の生態学の知識では難しい。この現実のすみやかな発信と影響を少しでも抑えるための努力は、都市部あるいはその周辺に住む者の責任であると考える。

バランスを崩した河川生態系の将来を思うと、どうにか元の状態に戻せないものか、なんとか知恵を絞りたいところである。このフォーラムを機会に、多くの人々に、河川水温の重要性について、改めて考えてもらいたいと思う次第である。

本稿をまとめるにあたり、東京都日野市在住の鶴田大三郎、佐々木眞一（WaQuACNet）の両氏には、オオシロカゲロウに関する情報を提供していただいた。ここに感謝します。

5. 文献

- 1) 環境省. 報道発表資料 「気候変動による水質等の影響解明調査（報告）」(2014). Online. Available from internet:
[http://www.env.go.jp/press/press.php?serial=16500\(downloaded on 2014.6.30\).](http://www.env.go.jp/press/press.php?serial=16500(downloaded on 2014.6.30).)
- 2) 大塚知泰・三島聰子・斎藤和久・石綿進一・安部明美・佐々木園子. 金目川での環境保全のための市民との協働の取組について—生物保全を目的としたG I Sデータベースの構築と活用—第31回環境・公害研究合同発表会要旨集. 神奈川県市環境・公害研究機関協議会 : 1-4. (2008) .
- 3) 神奈川県環境科学センター 環境保全部河川湖沼担当. 金目川の水温上昇を確認⇒アユの遡上減少？—市民グループとの協働の取組へー (2005) . Online. Available from internet:
[http://www.k-erc.pref.kanagawa.jp/center/shinbun/kanamegawa.html \(downloaded on 2014.6.30\).](http://www.k-erc.pref.kanagawa.jp/center/shinbun/kanamegawa.html (downloaded on 2014.6.30).)
- 4) 神奈川県. 平成 22 年度神奈川県公共用水域及び地下水の水質測定計画 (2013) . Online. Available from internet:
[http://www.pref.kanagawa.jp/uploaded/attachment/62472.pdf#search=%E7%A5%9E%E5%A5%88%E5%B7%9D%E7%9C%8C+%E6%B8%AC%E5%AE%9A%E8%A8%88%E7%94%BB \(downloaded on 2014.6.30\).](http://www.pref.kanagawa.jp/uploaded/attachment/62472.pdf#search=%E7%A5%9E%E5%A5%88%E5%B7%9D%E7%9C%8C+%E6%B8%AC%E5%AE%9A%E8%A8%88%E7%94%BB (downloaded on 2014.6.30).)
- 5) 石綿進一・斎藤和久・高村岳樹. 神奈川県内河川の水温の経年変化. (2014) 本研究報告書.
- 6) 望月 貴文・菊池 佐智子・天野 邦彦. 全国の河川における流況・水質の経年変化の実態調査と流域環境との関連性分析、第39回環境システム研究論文発表会講演要旨集 39 : 437-442. (2011) .
- 7) 小市佳延・福嶋悟. 河川における環境基準達成のための要因に関する研究（第2報）—柏尾川水系—. 横浜市環境科学研究所報 (28) : 11-19. (2004) .
- 8) 小市佳延・福嶋 悟・下村光一郎. 河川における環境基準達成のための要因に関する研究（第3報）—鶴見川水系—. 横浜市環境科学研究所報 (29) : 11-19. (2005).
- 9) 国土交通省関東地方整備局事業評価監視委員会. (平成21年度第4回) (資料1 — 3 — ①)、多摩川環境整備事業、平成22年1月29日 (2010). Online. Available from internet:
[http://www.ktr.mlit.go.jp/honkyoku/kikaku/jigyo/kyoka/pdf/h21/04siryo/siryou1-3-1.pdf#search=%E5%9B%BD%E5%9C%9F%E4%BA%A4%E9%80%9A%E7%9C%81%E9%96%A2%E6%9D%9D%E1%E6%95%B4%E5%82%99%E5%B1%80%E4%BA%8B%E6%A5%AD%E8%A9%95%E4%BE%A1%E5%A7%94%E5%93%A1%E4%BC%9A%EF%BC%88%E5%9B%93%9B%6E%88%9021+E5%9B%94%E4%8B%8B%6E%6B%0%4E%9%81%93+E6%8B%2%9B%3%5B%7%9D%6E%6B%0%4E%6B%8A%9+E4%8B%8A%6%98%87 \(downloaded on 2014.6.30\).](http://www.ktr.mlit.go.jp/honkyoku/kikaku/jigyo/kyoka/pdf/h21/04siryo/siryou1-3-1.pdf#search=%E5%9B%BD%E5%9C%9F%E4%BA%A4%E9%80%9A%E7%9C%81%E9%96%A2%E6%9D%9D%E1%E6%95%B4%E5%82%99%E5%B1%80%E4%BA%8B%E6%A5%AD%E8%A9%95%E4%BE%A1%E5%A7%94%E5%93%A1%E4%BC%9A%EF%BC%88%E5%9B%93%9B%6E%88%9021+E5%9B%94%E4%8B%8B%6E%6B%0%4E%9%81%93+E6%8B%2%9B%3%5B%7%9D%6E%6B%0%4E%6B%8A%9+E4%8B%8A%6%98%87 (downloaded on 2014.6.30).)
- 10) 和波 一夫・安藤 晴夫・石井 真理奈. 下水処理場放流水の河川水温への影響—多摩川上流域の冬季の現況—東京都環境科学研究所年報 : 116-120. (2010).
- 11) 木内 豪. 多摩川の水温変化の実態と形成要因に関する研究. 公益財団法人とうきゅう環境財団 (研究助成・学術研究 42 (305) : 1-26. (2013).
- 12) 神奈川県内河川水温一斉調査会. 神奈川県内河川における夏季の水温一斉調査結果-最高水温とアユの生息- (2014). 本研究報告書
- 13) 中山有・神田学・木内豪. 下水処理場での水温観測に基づく都市下水道の水・熱輸送に関する研究、水文・水資源学会誌 1(20): 25-33. (2007).
- 14) 横浜市環境創造局下水道計画調整部下水道事業調整課. 分流式と合流式(2011). Online. Available from internet:
[http://www.city.yokohama.lg.jp/kankyo/gesui/bungouryuu \(downloaded on 2014.6.30\).](http://www.city.yokohama.lg.jp/kankyo/gesui/bungouryuu (downloaded on 2014.6.30).)
- 15) M. Daufresne, M. C. Roger, H. Capra and N. Lamouroux. Long-term changes within the invertebrate and fish communities of the Upper Rhône River: effects of climatic factors Global Change Biology Volume 10, Issue 1: 124-140. (2004).
- 16) 田口正男. 南浅川流域のヒガシカワトンボ生活史にみられる気候温暖化の影響、とうきゅう環境財団 (2004). Online. Available from internet:
[http://www.tokyuenv.or.jp/wp/wp-content/uploads/2011/02/2e30c34f1b68819783b6aa2d75fcf1ba1.pdf \(downloaded on 2014.6.30\).](http://www.tokyuenv.or.jp/wp/wp-content/uploads/2011/02/2e30c34f1b68819783b6aa2d75fcf1ba1.pdf (downloaded on 2014.6.30).)
- 17) 勝呂尚之. 神奈川県の淡水魚と河川環境. (2014). 本研究報告書
- 18) 神奈川県環境科学センター. 神奈川県内河川の底生動物. 神奈川県 299pp. (2005).
- 19) 神奈川県環境科学センター. 神奈川県内河川の底生動物—I. 神奈川県 315pp. (2014).
- 20) 桐谷圭治. 日本産昆虫、ダニ、線虫の発育零点と

- 有効積算温度. 農業環境技術研究所資料 21 : 1-72. (1997).
- 21) 桐 谷 圭 治. 日本産昆虫、ダニの発育零点と有効積算温度定数: 第2版. 農業環境技術研究所資料 31 : 1-74. (2012).
- 22) Takemon, Y. Timing and synchronicity of the emergence of *Ephemera strigata*. In "Mayflies and Stoneflies. (ed. by Campbell, I. C.), pp.61-70, Kluwer Academic Publishers. (1990).
- 23) 渡辺直・中村和夫・八田耕吉・久枝和生・石綿進一・星一彰. カゲロウの大量発生機構に関する研究. 日産科学振興財団研究報告 16 : 151-162. (1993).
- 24) 石田直人・吉安 裕. 近畿地方におけるナベヅタムシ属 2種(半翅目: ナベヅタムシ科)の生活環ならびにそれらの発育と生息環境. Jpn. J. Ent. (N. S.), 7 (2) : 55-68. (2004).
- 25) 鶴石 達・中村寛志・吉田利男. オオナガレトビケラ *Himalopsyche japonica* (Morton) の越冬蛹が翌春の羽化に要する発育零点および有効積算温量の推定. New entomol. 51(2,3): 29-33. (2002).
- 26) 御勢,久右衛門. ヒゲナガカワトビケラの生活史と令期分析. 陸水学雑誌 31 : 96-106. (1970).
- 27) 関口伸一・山本雅道. ヘイケボタル(*Luciola lateralis*)の休眠と有効積算温度. 信州大学環境科学年報 (36) : 109-113. (2014).
- 28) 茅野春雄 (1978) 昆虫の越冬-生物の多様性と合目的性-. 北海道大学低温科学研究所業績第1881号 低温科学生物篇 35 : 75-84.
- 29) 石綿進一. シロイロカゲロウ属の分類・分布・生活史. 昆虫と自然 39 (6) : 13-17. 2004).
- 30) 財団法人日本野生生物研究センター. 第2回自然環境保全基礎調査 動物分布調査報告書(昆虫類) (1980). Online. Available from internet: [http://www.biodic.go.jp/reports/2-13/2-13.pdf#search=%E3%82%AA%E3%82%AA%E3%82%B7%E3%83%AD%E3%82%AB%E3%82%82%82%E3%83%AD%E3%82%A6+%E6%97%A5%E9%87%8E%E7%94%A8%E6%80%84'\(downloaded on 2014.6.30\).](http://www.biodic.go.jp/reports/2-13/2-13.pdf#search=%E3%82%AA%E3%82%AA%E3%82%B7%E3%83%AD%E3%82%AB%E3%82%82%82%E3%83%AD%E3%82%A6+%E6%97%A5%E9%87%8E%E7%94%A8%E6%80%84'(downloaded on 2014.6.30).)
- 31) 野崎隆夫. 相模川に生息するアミメカゲロウの生態. 神奈川自然誌資料 4: 37-41. (1983).
- 32) 道路一面が真っ白、正体は「カゲロウ」 (2009) Online. Available from internet: [http://bulu.hujiang.com/diary/903763/\(downloaded on 2014.6.30\).](http://bulu.hujiang.com/diary/903763/(downloaded on 2014.6.30).)
- 33) オオシロカゲロウ (2010). Online. Available from internet: [http://tobikera.cocolog-nifty.com/blog/2010/09/post-e463.html\(downloaded on 2014.6.30\).](http://tobikera.cocolog-nifty.com/blog/2010/09/post-e463.html(downloaded on 2014.6.30).)
- 34) S. Ishiwata. A study of the genus *Ephoron* from Japan (Ephemeroptera, Polymitarcyidae). The Canadian Entomologist 128:551-572. (1996).
- 35) 関根 一希、鶴田 大三郎、東城 幸治. 多摩川水系・日野用水におけるオオシロカゲロウ(カゲロウ目・シロイロカゲロウ科)の生活史. 陸水学雑誌 68 (2) : 253-260. (2007).
- 36) 中村和夫. アミメカゲロウの卵の発生条件. インセクト (昆虫愛好会) 36 : 83-86. (1985).
- 37) 中村和夫・宇都宮大学生物研究. アミメカゲロウの卵の孵化条件. インセクト (昆虫愛好会) 38 : 77-81. (1987).
- 38) Watanabe C. Naoshi and S. Takao. Effect of a low temperature period on the egg hatching of the Japanese burrowing mayfly, *Ephoron shigae*. P.439-445. J. Alba-Tercedor, A. Sanchez Ortega (Eds.), Overview and Strategies of Ephemeroptera and Plecoptera. Sandhill Crane Press. (1991).
- 39) Watanabe C. Naoshi and Shin-ichi Ishiwata. Geographic distribution of the mayfly, *Ehoron shigae* in Japan, with evidence of geographic parthenogenesis (Insecta: Ephemeroptera: Polymitarcyidae). Jpn. J. Limnol. 58 : 15-25. (1997).
- 40) 松本浩一. 多摩川水系の大型底生無脊椎動物相-1959~1981年間の採集記録ならびに主要種の採集地図. とうきゅう環境財団. 326pp. (1980).
- 41) 国土交通省、河川水辺の国勢調査河川環境データベース、多摩川、底生動物 Online. Available from internet: [http://mizukoku.nilim.go.jp/ksnkankyo/03/index.files/download.jsp?bunya=2&bunsyu=1&rd= 多摩川 &nendo=1995&rflg=1&jimcode=1360830000060\(downloaded on 2014.6.30\).](http://mizukoku.nilim.go.jp/ksnkankyo/03/index.files/download.jsp?bunya=2&bunsyu=1&rd= 多摩川 &nendo=1995&rflg=1&jimcode=1360830000060(downloaded on 2014.6.30).)
- 42) 駒田恭子・藤野桂子・原南美子・長谷川裕美・星野敦子・稻生節子・井元しのぶ・岩崎通子・柏原弘子. 底棲動物からみた多摩川の汚染. 日本水処理生物学会誌 1 (2) : 15-19. (1964).
- 43) 平山 南見子・松尾 清孝・山田 茂・福嶋 悟. 第多摩川及び鶴見川水系の付着藻類植生と底生動物相による水質の調査研究(1979~1980年) 日本水処理生物学会誌 17 (2) : 16-25. (1981).
- 44) 国土交通省 関東地方整備局 京浜河川事務所. 多摩川. 河川水辺の国勢調査 (2007). Online. Available from internet: [http://www.ktr.mlit.go.jp/ktr_content/content/000057840.pdf\(downloaded on 2014.6.30\).](http://www.ktr.mlit.go.jp/ktr_content/content/000057840.pdf(downloaded on 2014.6.30).)
- 45) 日野市生物調査調査報告書平成1年度-平成24年度.
- 46) 国土交通省 関東地方整備局 京浜河川事務所. 多摩川で学ぶ、遊ぶ、参加する 多摩川流域リバーミュージアム (TRM) 多摩川流域全体の概要 Online. Available from internet: [http://www.ktr.mlit.go.jp/keihin/keihin00481.html\(download ed on 2014.6.30\).](http://www.ktr.mlit.go.jp/keihin/keihin00481.html(download ed on 2014.6.30).)
- 47) 和波 一夫. 多摩川の水質改善平成22年度公開研究発表会 要旨集 1-3. Online. Available from internet: http://www.tokyokankyo.jp/kankyoken_contents/research-meeting/h22-01/2204-tama_river.pdf#search=%E5%A4%9A%E6%91%A9%E5%B7%9D%E3%81%AE%E6%B0%8B%E8%83%AA%E6%94%B9%E5%96%84%E5%B9%

- B3%E6%88%9022%E5%B9%B4%E5%BA%A6%E5%85%AC%E9%96%8B%E7%A0%94%E7%A9%B6%E7%99%BA%E8%A1%A8%E4%BC%9A+%E8%A6%81%E6%97%A8%E9%9B%86(downloaded on 2014.6.30).
- 48) 九州大学対流圏科学研究分野. サクラの開花と地球温暖化 Online. Available from internet: http://weather.geo.kyushu-u.ac.jp/about_topics/sakura.html(downloaded on 2014.6.30).
- 49) 西田哲. 河川環境と水循環. (2014). 本研究報告書
- 50) 石綿進一. 水生昆虫を中心とした水生動物. 相模川流域誌本編(上). 相模川流域誌編纂委員会. 国土交通省関東地方整備局京浜河川事務所: 141-144. (2010).
- 51) 小池文人・石綿進一・金田正人・斎藤和久・高桑正敏・浜口哲一・葉山久世. 都市と自然が出会うところで野生化する外来生物. 佐土原聰、小池文人、嘉田良平、佐藤裕一(編集)、里山創生～神奈川・横浜の挑戦～: 84-101. 創森社 東京. 255pp. (2010).

神奈川県内河川における夏季の水温一斉調査結果

-最高水温とアユの生息-

神奈川県内河川水温一斉調査会

1. はじめに

最近、川がきれいになったとよく聞く。以前の河川水は有機汚濁が進行しており、それらの川ではヘドロ化した川底が多く、その石の表面にはミズワタが発生し、清水性の生物がすみにくいた川だった。魚などの死亡事故なども多発した。しかし、現在では、水質が改善され、清澄になるとともに、天然のアユの遡上など、既存の生物の回復がみられるようになってきた。ただし、中・下流域では、依然として、水生動物の良好な生息場所を提供しているとは言いたい。そこでは、水量が少なく水深がわずか数センチにも満たない川や水の枯渇した水域がある。夏季の河川水温の上昇など、そこに生息する生物の生存を脅かす問題が散在する。水温は河川生物の生存を左右する大変重要な因子で、魚類をはじめとし、エビ・カニ類、水生昆虫類など変温性の水生動物に対する影響は強い。一般に、生物の活性は体温上昇に伴い高まり生育が促進されるが、さらに高温に曝されると生育阻害や死を招く。なかでも、冷水性魚種の生息に影響を及ぼすことが指摘され、水温上昇がそれらの動物の分布域を規定するといった報告もある¹⁾。

水温を含めた河川水質のモニタリングについては、公共用水域における常時監視が法の下に実施されている²⁾。このモニタリングは、1回/月の調査で、4回/日(6時、12時、18時、24時)の頻度で実施されている。実際の採水時期については、水質が安定している日を選ぶものとされており、県下の27河川87地点について定点測定が義務付けられている。従って、平水時が想定されており、しかも時期や地点が限られているため、必ずしも高水温時や県下の広範な水域を捉えようとするものではない。

本調査は、夏季における高水温が記録される時期の県下一斉の調査とし、人為的環境改变の著しい河川の中・下流域を中心に地点を選定した。調査は、各河川周辺に在住する人々を中心に、学生、NPO法人、環境保全団体など多くの市民を主体とした。小倉³⁾、小倉ほか^{4、5)}、丹野ほか⁶⁾は、市民調査の意義として、市民自らが周辺水域の水質を明らかにすることにより、水環境に対する理解、興味、関心の高まりが期待され、参加者の水環境保全活動への参加を促進することができるとしている。また、市民参加型調査は、調査地点を多く設定できることから、水環境のモニタリングと

しての有用性を指摘している。さらに、一斉調査が参加者間での水環境保全のための連携意識を醸成するとしている。河川水温の調査が、上記同様の有用性を備えるとともに、計測方法の簡便性や分析精度の再現性からみても、さらにメリットがあるものと考える。

本報告は、神奈川県内河川の水温の一斉調査の結果を報告し、盛夏における河川水温の実態を把握するとともに、この測定結果と清水域の象徴とされるアユの生息に関する適正水温との関係についてまとめた。

2. 方法

調査日は、2013年8月11日(日曜日)とした。測定時刻は、河川水の高温度が記録される13~17時の時間帯に実施した。調査は、県下の314地点(24河川)とし、水温の計測は神奈川県内河川水温一斉調査会(参加人員:100人、大学、NPO、環境保全団体、市民、学生など17団体)で実施した(表1)。

3. 結果及び考察

水温調査の結果より(表2)、最高水温は、鶴見川の大綱橋で36.5°C、次いで、柏尾川の地区センター前が34.1°Cであった。記録された地点を水温別に分けると、30°C以上: 81地点(25.7%)、20°C以上30°C未満: 215地点(68.5%)、20°C以下: 13地点(4.1%)、その他(水枯渇他)5地点であった。20°C以下の地点は河川の上流部や湧水地に限定されていた。また、一部に枯渇した河川も存在し、魚類などの水生動物の移動などを不可能にしている地点も確認された。

国土交通省 関東地方整備局 京浜河川事務所⁷⁾は、水環境における川の最も望ましい姿として、いきものの生息・繁殖が本川、支川を含めた流域全体で可能であることとし、鶴見川水系において「多様な水生生物の生息・繁殖が可能な水質環境の将来像」を設定した。ここで、アユについては、中・下流域の一部で生息が確認されているものの、その繁殖が未確認であるため将来目標としている。一方、横浜市環境科学研究所の調査^{8、9、10)}では、これまで市内で確認されていなかったアユが、1993以降、鶴見川、境川、帷子川、大岡川の各水系で生息が認められ、一部には産卵など生殖行動なども確認されているとした。

水産生物適水温図¹¹⁾によると、アユの飼育適水温は10°C以上28°C未満であり、その最適水域は20°C以上

25°C未満とされている。これから、25°C以上28°C未満を「飼育可能であるが最適ではない温域」、28°C以上は「飼育不可」とし以下にまとめた。この水温区分に基づき、各調査地点を分配すると、全調査地点314地点中、28°C以上:140地点、25°C以上28°C未満:94地点、25°C未満:75地点、水枯渴:4地点、その他1地点となる(図1)。これにより、25°C以上の地点が、全体の74.5%を占めた。

アユの遡上は、都市部の河川のみならず神奈川県内のほとんど河川で確認されており¹²⁾、その魚影は河川環境の改善に繋がる光景として注目されてきている。しかし、河川水温から見る限りではアユの適正な水温環境とは言いにくい地点が多く存在し、アユの生活史が十分に完結できるのか危惧される。

4. まとめ

生物の分布には地域性があり、どこにでも同じ種が分布しているわけではない。特に、南北に細長い日本列島には、地域によっては特徴のあるいわゆる「地域のお宝」ともいえる独特の生物が生息することがある。これらの生物のうち、移動性の少ない淡水性の動物にとっては、水温の急な上昇は深刻な問題である。なかでも、冷水性の動物については、それぞれの分布が狭まり、絶滅に繋がる可能性がある。ここでは、アユについて述べたが、さらに上流に生息するヤマメなど陸封された冷水性の魚種はより深刻である。河川の生態系を支える水生昆虫を代表とする無脊椎動物についても同様であろう。生態的、生理的な情報が少なく、また、分類学上の研究の遅れから、命名されてない生物もたくさん存在し、名前が知られることなく絶滅することも十分に考えられる。一方、暖水性の動物については、より高緯度に分布を広げる可能性や、南方系の外来生物の侵入を招きかねない。特に、冬期における水温上昇はそれらの分布拡大に繋がることになる。また、海と川を行き来するアユなどの水生動物にとっても、夏場の高水温時はもとより、水温の上昇は、産卵、遡上などそれらの四季を通した生態に影響を与えることになる。

このように、河川水温の上昇は、生態系のバランスを崩し、生物多様性の減少に拍車をかけることになる。それらを保全するため、地域レベルでの現状を解析し、実態を把握することが急務と考える。また、一方では、市民の目によるモニタリングも重要で、身近な環境の変化をつぶさに捉えるために、今回のような調査も定期的に実施する必要があろう。都市部では、本来の河川水に較べ、処理排水の占める割合が増えてきており、このことが、河川水温を徐々に上昇させることに繋がっている。われわれ家庭において利用する水も増加し、その一方で、消費された水が下水道を通して処理され、それらが河川に流れ込むことになる。私たちの生活ス

タイルについても改めて考えてみることや、各地域における治水・利水など水利用についても、考え直す必要があろう。

5. 文献

- 1) 北野文明・中野繁・前川幸司・小野有五. 河川型オショロコマの流程分布にたいする水温の影響および地球温暖化による生息空間の縮小予測. 野生生物保護 1: 1-11. (1995).
- 2) 神奈川県 (2013) 公共用水域及び地下水の水質測定計画 . Online. Available from internet: <http://www.pref.kanagawa.jp/uploaded/attachment/550896.pdf#search=%27%E5%85%AC%E5%85%B1%E7%94%A8%E6%B0%B4%E5%9F%9F+E6%B2%B3%E5%B7%9D%E6%B8%AC%E5%AE%9A%E8%A8%88%E7%94%BB+%E7%A5%9E%E5%A5%88%E5%B7%9D%E7%9C%8C%27> (downloaded on 2014.6.30).
- 3) 小倉紀雄. 水質測定における簡易分析法の役割と広がり. 公害と対策 26 : 626-632. (1990).
- 4) 小倉紀雄・他. 市民環境科学の実践—身近な川の一斉調査 10年から学ぶこと—. 水環境学会誌 24(2):86-89. (2001).
- 5) 小倉紀雄・他. 第一回身近な水環境の全国一斉調査—概要とその意義—. 資源環境対策 41(6) : 67-72. (2005).
- 6) 丹野忠弘・他. 第1回身近な水環境の全国一斉調査の調査方法とその結果の検討. 水環境学会誌 29(5) : 275-280. (2006).
- 7) 国土交通省関東地方整備局京浜河川事務所、水生生物の生息・繁殖環境の創出に向けた目標水質の目安. Online. Available from internet: <http://www.ktr.mlit.go.jp/keihin/keihin00024.html> (downloaded on 2014.6.30).
- 8) 桶口文夫・福嶋悟・下村光一郎・洲澤譲. 横浜の川におけるアユの分布状況—2007年度調査と繁殖予備調査—横浜市環境科学研究所報 33 : 21-30. (2009).
- 9) 桶口文夫・阿久津卓・渕川直子・村岡麻衣子. 大岡川におけるアユの産卵場選択に関する研究. 横浜市環境科学研究所報 第36 : 22-29. (2012).
- 10) 桶口文夫・阿久津卓・渕川直子・村岡麻衣子・川田攻・七里浩志. 帷子川におけるアユの分布と産卵場に関する研究横浜市環境科学研究所報 37 : 19-28. (2013).
- 11) 日本水産資源保護協会水産生物適水温図 (水産資料). 63 pp. (1980)
- 12) 神奈川県環境科学センター神奈川県内河川の魚類. 137pp. (2014).

表1 神奈川県内河川水温一斉調査会の調査団体及び調査者名

所属団体名	氏名	所属団体名	氏名	所属団体名	氏名
さがみはら水生動物調査会	小田島薰	四十八瀬川自然村 酒匂川水系のメダカと生息地を守る会	佐々木重満	Dream eggs ゆめのま	相川健志
	小田島篤		氏田章治		稻田伊史
	小田島樹		岩田卓二		柳川維
	相澤直		磯田幸男		佐藤貞夫
	守屋博文		高橋一公		仁木義治
	小林義博		高橋由季		杉山吾郎
	大瀧由美子		高橋和希		大嶋亜弓
	大瀧崇幸		中山和也		北林文夫
	岩田裕輔		陣野一郎		木嶋義光
はだの幼児教育研究会	岩田素子		外郎佐喜子		和田教義
	持田由美	神奈川ウォーター・ネットワーク	山崎泰		旭誠司
	小松千秋		住倉英孝	秦野市くずはの家	手塚真理
	三川原由佳		勝呂尚之	鎌倉川びらきの会	久保廣晃
	青木美香		石綿進一		熊倉洋介
	近藤裕子	里山コミュニティファーム 神奈川工科大学	曾我功		山本和子
	山口由美子		潮戸義巳		伊豆川哲也
	鈴野香		橋本亜紀子		稻村公希
	安池春敏		高村岳樹		近藤忠
	岩本勲		田村将人		川島範子
金目川水系流域ネットワーク	高津茂		佐藤太平	河川モニタリング調査員	山岡健郎
	佐々木和義		兼子千晶	三浦メダカの会	西垣美代子
	佐藤貴子		小野耕介		石綿朋野
	佐藤道夫		荻野真宏		猪股智子
	小林公潤		真下久範		佐々木眞一
	森正義		西川晃生		天白牧夫
	杉山治男		徳武学		橋本弘
	西岡哲		渡邊善章		櫻井皓
	露木正巳		桜井大樹		谷芳生
	大瀧准	東京農業大学	大井章豊		齋藤和久
	猪俣俊和	湘南里川づくりみんなの会	近藤博史		横山尚秀
	藤村隆司		斎藤 誠		奥田理美
	道村康博		山口俊彦		湯口さゆり
	府川清		土井正武		司村宣洋
	柳川三郎				

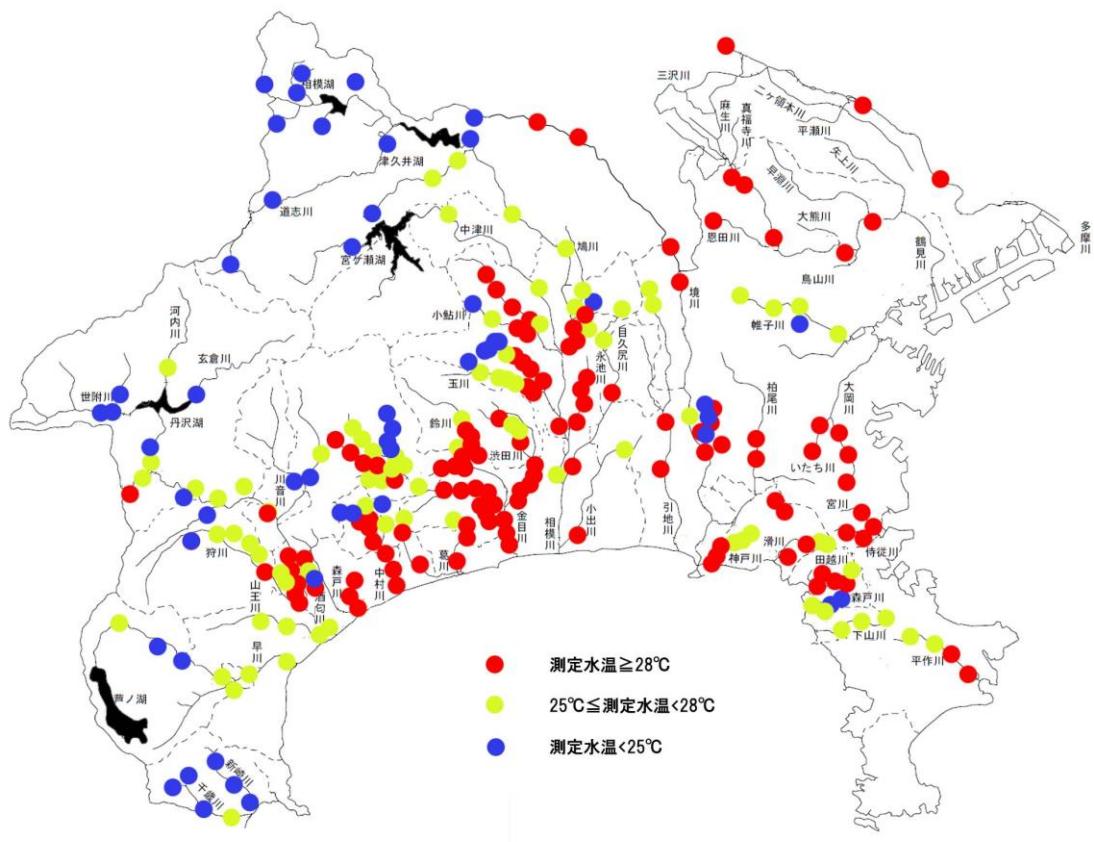


図1 アユの水温適正の区分と県下河川の最高水温の分布

表2 調査地点の水温測定結果

河川名	支川名	水温(°C)	測定時刻	調査地点	市町村	調査地点の詳細	氏名	所属	備考(周辺環境他)
多摩川	多摩川	31.5	13:20	二子新地	川崎市		石綿明野・奥田理美	なし	
	多摩川	30.5	14:27	ガス橋	川崎市		石綿明野・奥田理美	なし	
	多摩川	29.2	14:45	日野橋	東京都		佐々木眞一	なし	
	多摩川	28.0	14:05	永田橋	東京都		佐々木眞一	なし	
鶴見川	恩田川	29.8	13:20	堀の内橋	横浜市	橋下流100m(左岸)・気温34.5°C	勝呂尚之	神奈川ウォーター・ネットワーク	
	谷本川	32.2	13:00	千代橋	横浜市	橋上流50m(右岸)・気温37.0°C	勝呂尚之	神奈川ウォーター・ネットワーク	
	谷本川	31.8	14:00	寺家橋	川崎市	橋下流50m(右岸)・気温35.0°C	勝呂尚之	神奈川ウォーター・ネットワーク	
	谷本川	31.4	14:30	精進場橋	川崎市	橋上流20m(左岸)・気温32.5°C	勝呂尚之	神奈川ウォーター・ネットワーク	
	鶴見川	36.5	13:36	大綱橋	横浜市		青木美香	はだの幼児教育研究会	
	鶴見川	31.5	14:14	亀の子橋	横浜市		青木美香	はだの幼児教育研究会	
帷子川	帷子川	29.8	14:41	川田橋	横浜市		石綿進一・司村宜祥	神奈川ウォーター・ネットワーク	
	帷子川	29.6	13:19	浜串橋	横浜市		石綿進一・司村宜祥	神奈川ウォーター・ネットワーク	
	帷子川	27.9	13:10	大貫橋	横浜市		石綿進一・司村宜祥	神奈川ウォーター・ネットワーク	
	帷子川	27.8	13:25	島越橋	横浜市		石綿進一・司村宜祥	神奈川ウォーター・ネットワーク	
	帷子川	23.5	13:46	陣が下公園	横浜市		石綿進一・司村宜祥	神奈川ウォーター・ネットワーク	
大岡川	笛下川	33.2	13:55	松本橋	横浜市	大岡川合流前	齋藤和久	なし	
	笛下川	31.9	14:05	武者ヶ谷橋	横浜市		齋藤和久	なし	
	笛下川	28.1	14:30	氷取沢	横浜市	氷取沢神社上流	齋藤和久	なし	
	大岡川	33.1	13:25	日野橋	横浜市		齋藤和久	なし	
	大岡川	32.9	13:45	港南橋	横浜市		齋藤和久	なし	
宮川	宮川	32.2	15:35	泥亀八景小橋	横浜市		横山尚秀	なし	

	宮川	28.2	15:50	坂本 宮下橋	横浜市		横山尚秀	なし	
侍従川	侍従川	28.9	13:55	大道橋	横浜市		横山尚秀	なし	
	侍従川	28.0	13:40	大道中前 地蔵前橋	横浜市		横山尚秀	なし	
平作川	平作川	33.1	13:00-16: 00	まさき橋	横須賀 市		西垣美代子	三浦メダカの会	
	平作川	31.1	13:00-16: 00	湘南橋	横須賀 市	5m下流 汽水	西垣美代子	三浦メダカの会	
	平作川	27.6	13:00-16: 00	真崎橋	横須賀 市		天白牧夫	なし	
	平作川	26.1	13:00-16: 00	池上神社入 口	横須賀 市		天白牧夫	なし	
下川	下山川	27.3	13:00-16: 00	上山橋	葉山町		天白牧夫	なし	
	下山川	27.3	13:00-16: 00	白石橋	葉山町		天白牧夫	なし	
	下山川	25.0	13:00-16: 00	不動橋	葉山町		天白牧夫	なし	
森戸川	森戸川	26.2	13:00-16: 00	風早橋	葉山町		天白牧夫	なし	
	森戸川	25.5	13:00-16: 00	中町橋	葉山町		天白牧夫	なし	
	森戸川	24.5	13:00-16: 00	松久保川	葉山町		天白牧夫	なし	
	森戸川	23.9	13:00-16: 00	大山橋	葉山町		天白牧夫	なし	
田越川	久木川	29.9	13:00	丸川橋下	逗子市	丸川橋上より測定	大嶋亜弓	くずはの家えのきの 会	コンクリート護岸、周 辺宅地
	田越川	33.2	13:10	逗子橋	逗子市	逗子橋上より測定	大嶋亜弓	くずはの家えのきの 会	コンクリート護岸、周 辺宅地
	田越川	33.2	13:25	中原橋	逗子市	中原橋上より測定	大嶋亜弓	くずはの家えのきの 会	コンクリート護岸、周 辺樹木等多、ガマ等群 生
	田越川	28.8	13:55	六反目橋	逗子市	六反目橋上より測定	大嶋亜弓	くずはの家えのきの 会	コンクリート護岸、周 辺樹木等多
	田越川	26.5	13:40	舞台橋（旧 ポンプ場）	逗子市	舞台橋上より測定	大嶋亜弓	くずはの家えのきの 会	石垣護岸、周辺低木等 多く川を被覆
滑川	滑川	30.5	13:00-16: 00	延命寺橋	鎌倉市		久保廣晃	鎌倉川びらきの会	
	滑川	30.0	14:05	明石橋	鎌倉市	明石橋から上流30mの小橋の下	熊倉洋介	鎌倉川びらきの会	
	滑川	26.8	14:20	大刀洗川	鎌倉市	十二所神社バス停の横の小橋の下	熊倉洋介	鎌倉川びらきの会	
	滑川	26.8	14:40	朝比奈三郎 滝	鎌倉市	朝比奈切り通し入り口の柵の上流 5m、大刀洗川の源流から約100m 下	熊倉洋介	鎌倉川びらきの会	

神戸川	神戸川	30.2	15:45	R134号線 腰越橋下	鎌倉市	汽水	猪股 満智子	なし	
	神戸川	29.2	15:25	日坂橋合流 点	鎌倉市		猪股 満智子	なし	
	神戸川	28.2	14:20	西鎌倉駅 前・拾枚橋 合流点	鎌倉市		猪股 満智子	なし	
	神戸川	26.4	14:35	生協裏合流 点・初沢橋 (暗渠)	鎌倉市		猪股 満智子	なし	
	神戸川	25.7	16:05	雷亭側	鎌倉市		猪股 満智子	なし	
	神戸川	25.4	15:05	警察犬訓練 場前広町緑 地入口	鎌倉市	住宅地内暗渠手前合流点	猪股 満智子	なし	
境川	宇田川	31.3	15:30	垂橋	横浜市	橋上流側すぐ (右岸)	旭誠司・手塚真 理	くずはの家えのきの 会	コンクリート護岸、水 深10cm、悪臭少
	境川	31.0	13:00	鶴間橋	大和市	橋の直下 (右岸)	旭誠司・手塚真 理	くずはの家えのきの 会	コンクリート護岸、水 量少、水深10cm
	境川	30.5	14:34	寿橋	相模原 市	N35° 36' 3.42", E139° 21' 1.94"	大澤由美子・大 澤崇幸	さがみはら水生動物 調査会	
	境川	29.2	15:45	保野橋	横浜市	橋の直下	旭誠司・手塚真 理	くずはの家えのきの 会	コンクリート護岸、水 深30cm
	境川	29.1	11:35	根岸橋下 100m	相模原 市	N35° 34' 27.10", E139° 24' 34.62"	小田島薰・小田 島篤	さがみはら水生動物 調査会	
	境川	28.9	14:00	遊水地橋魚 道下	横浜市	神奈川県立境川遊水地公園付近	相川健志	NPO法人 Dream eggs ゆめたま	
	境川	27.6	14:05	高瀬橋	藤沢市	橋の下流10m (左岸) 、空気式 膨脹堰の直下	旭誠司 手塚真理	くずはの家えのきの 会	コンクリート護岸、悪 臭7
	境川	17.5	15:16	本沢 本沢 ダム入口バ ス停前	相模原 市	N35° 36' 36.20", E139° 17' 4.92"	大澤由美子・大 澤崇幸	さがみはら水生動物 調査会	
	境川	19.2	15:00	境橋	相模原 市	N35° 37' 56.86", E139° 7' 24.99"	小田島樹・相澤 直・守屋博文	さがみはら水生動物 調査会	
	公開せ せらぎ	16.9	13:00	水源	横浜市	天王森泉公園内	相川健志	NPO法人 Dream eggs ゆめたま	
	砂押川	30.8	13:15	砂押橋	鎌倉市		横山尚秀	なし	
	砂押川	26.7	13:00	白山神社 前	鎌倉市		横山尚秀	なし	
	柏尾川	34.1	15:15	地区センタ ー	横浜市		石綿進一・司村 宜祥	神奈川ウォーター・ ネットワーク	
	柏尾川	29.9	15:49	久保橋	横浜市	橋上流500m (左岸)	石綿進一・司村 宜祥	神奈川ウォーター・ ネットワーク	本地点の水温低下は 週末処理場の排水の 影響と考える

	和泉川	32.3	14:07	境川合流点付近魚道下	横浜市		相川健志	NPO法人 Dream eggs ゆめたま	
	和泉川	32.1	14:45	和泉橋	横浜市	和泉橋上流側10m(右岸)	旭誠司・手塚真理	くずはの家えのきの会	コンクリート護岸、悪臭7
	和泉川	31.7	13:35	鍋屋橋下取水桟左岸	横浜市		相川健志	NPO法人 Dream eggs ゆめたま	
	和泉川	19.9	13:20	池流出	横浜市		相川健志	NPO法人 Dream eggs ゆめたま	
	和泉川	18.7	13:10	池流入	横浜市		相川健志	NPO法人 Dream eggs ゆめたま	
引地川	引地川	29.2	14:10	中村橋	綾瀬市	橋上中央より	土井正武	湘南里川づくりみんなの会	コンクリート護岸
	引地川	28.1	14:35	石川橋・親水公園	藤沢市	橋上中央より	土井正武	湘南里川づくりみんなの会	
	引地川	27.2	13:02	ゆかり橋	大和市	橋上中央より	土井正武	湘南里川づくりみんなの会	コンクリート護岸、源流部付近
	引地川	26.8	13:21	東ヶ里ふれあい橋	大和市	橋上中央より	土井正武	湘南里川づくりみんなの会	コンクリート護岸、河床は水草多
	蓼川	一	計測不能	蓼川東名横	綾瀬市	川面上をつる植物が覆い計測不能	土井正武	湘南里川づくりみんなの会	
相模川	姥川	30.0	13:16	中の沢橋	相模原市	N35° 32' 16.66", E139° 22' 37.20"	大澤由美子・大澤崇幸	さがみはら水生動物調査会	
	永池川	29.8	14:40	下河内橋	海老名市	下河内橋上より	斎藤 誠	湘南里川づくりみんなの会	
	永池川	29.3	13:40	流橋	海老名市	流橋にて	斎藤 誠	湘南里川づくりみんなの会	
	永池川	29.2	14:00	世継橋	海老名市	世継橋上より	斎藤 誠	湘南里川づくりみんなの会	
	永池川	29.2	14:10	倉見橋	寒川町	倉見橋上より	斎藤 誠	湘南里川づくりみんなの会	
	荻野川	30.7	13:30	三河尻橋	厚木市	N35° 27' 54.402" E139° 20' 57.397"	住倉英孝	神奈川ウォーター・ネットワーク	
	荻野川	30.6	13:10	権現堂橋	厚木市	N35° 29' 03.307" E139° 19' 22.769"	住倉英孝	神奈川ウォーター・ネットワーク	
	荻野川	30.1	12:26	鷺坂橋	厚木市		高村岳樹	神奈川工科大学	
	荻野川	28.4	14:51	十二天橋	厚木市	下流100m	橋本亜紀子・田村将人	神奈川工科大学	
	荻野川	26.8	12:43	荻野	厚木市		高村岳樹	神奈川工科大学	
恩曾川	恩曾川	29.0	13:11	ハン橋下流空気膨張式堰上流	厚木市	老人保健施設「ぬるみず」南西方 向約100m。堰の上流20m(左岸)	和田教義	くずはの家えのきの会	コンクリート護岸、堰下流は水なし
	恩曾川	28.8	13:10	新八木間橋	厚木市	橋下	渡邊謙章	神奈川工科大学	

	恩曾川	28.6	14:40	高城橋	厚木市		西川晃生	神奈川工科大学	
	恩曾川	28.5	13:30	新八木間橋	厚木市	上流 10m	渡邊謙章	神奈川工科大学	
	恩曾川	25.8	13:46	二の橋	厚木市	上流 50m ます屋横	小野耕介・荻野 真宏	神奈川工科大学	
	恩曾川	24.3	13:44	宝増寺	厚木市	150m 下流	佐藤太平・桜井 大樹	神奈川工科大学	
	恩曾川	22.5	14:05	宝増寺	厚木市	100m 上流	佐藤太平・桜井 大樹	神奈川工科大学	
	恩曾川	21.2	14:25	二の橋	厚木市	上流 70 弁才天付近	小野耕介・荻野 真宏	神奈川工科大学	
	恩曾川	21.1	13:18	宝増寺	厚木市	60m 上流	佐藤太平・桜井 大樹	神奈川工科大学	
	恩曾川	21.0	13:10	宝増寺	厚木市	50m 上流	佐藤太平・桜井 大樹	神奈川工科大学	
	玉川	31.5	14:25	新玉川橋	厚木市		木嶋義光	くずはの家えのきの 会	
	玉川	30.4	14:00	新宿橋	厚木市		佐藤太平・兼子 千晶	神奈川工科大学	
	玉川	27.6	13:20	籠堰橋上流 の堰下	厚木市	堰下から下流へ約 30m の (右岸)	木嶋義光	くずはの家えのきの 会	堰から流水なし、堰右 岸から流水有り、下流 5m で取水
	玉川	27.3	15:45	中屋橋	厚木市		大井章豊	東京農大	
	玉川	25.8	14:20	籠堰橋	厚木市		佐藤太平・兼子 千晶	神奈川工科大学	
	玉川	25.0	17:00	玉川支流 (支川名不明)	厚木市	谷戸を通る農道の橋の下流側	大井章豊	東京農大	
	串川	27.3	15:30	河原橋	相模原市	N35° 34' 57.43", E139° 17' 54.23"	小林義博	さがみはら水生動物 調査会	
	串川	26.6	12:50	稻生 向橋 下 500m	相模原市	N35° 33' 58.38", E139° 16' 25.41"	小田島薰・小田 島篤	さがみはら水生動物 調査会	
	串川	24.0	16:25	道場 宮崎 商店前	相模原市	N35° 32' 25.46", E139° 12' 56.09"	小田島薰・小田 島篤	さがみはら水生動物 調査会	
	山の神 沢	24.2	14:10	新太平橋	厚木市		大井章豊	東京農大	
	市道川	26.1	13:46	上古沢橋	厚木市	介護老人施設「さくら」西 50m, 道路下が 20m 位暗渠状になった橋 下流 10m (右岸)	和田教義	くずはの家えのきの 会	コンクリート護岸
	篠原川	22.3	13:48	新大橋	相模原市	N35° 35' 34.10", E139° 10' 17.30"	小田島樹・相澤 直・守屋博文	さがみはら水生動物 調査会	
	秋山川	23.0	14:35	前川橋	相模原市	N35° 34' 59.49", E139° 7' 35.90"	小田島樹・相澤 直・守屋博文	さがみはら水生動物 調査会	
	小鯉川	30.3	14:18	千頭橋	厚木市	下流 80m	橋本亞紀子・田 村将人	神奈川工科大学	

小鮎川	28.5	14:41	下小鮎橋	厚木市	下小鮎橋下流2m、(左岸)	和田教義	くずはの家えのきの会	護岸、水深20cm、
小鮎川	27.9	14:05	久保橋上流の堰下	厚木市	久保橋下流2m、(右岸)	和田教義	くずはの家えのきの会	護岸、水深10cm、
小鮎川	27.8	12:45	久保橋	厚木市	下流5m	真下久範	神奈川工科大学	
小鮎川	21.0	13:15	水野尻沢橋	厚木市	下流10m	真下久範	神奈川工科大学	
小出川	31.8	13:45	新鶴崎橋	茅ヶ崎市	橋下流直下(中央やや(左岸)より)	近藤博史	湘南里川づくりみんなの会	コンクリート護岸
小出川	27.7	13:10	大黒橋	藤沢市	大黒橋下流1m(左岸)	近藤博史	湘南里川づくりみんなの会	コンクリート護岸、水路様、水深20-30cm
上谷戸沢	26.8	13:05	坂下橋	厚木市		木嶋義光	くずはの家えのきの会	コンクリート護岸
上谷戸沢	25.8	13:30	坂下橋下	厚木市		大井章豊	東京農業大学	
真弓川	28.8	14:30	深堀橋	厚木市	N35° 29' 45.484" E139° 18' 28.927"	住倉英孝	神奈川ウォーター・ネットワーク	
神ノ川	18.5	14:21	日陰沢橋 長者舎山莊横	相模原市	N35° 30' 20.54", E139° 5' 48.30"	小田島薰・小田島篤	さがみはら水生動物調査会	
水沢川	20.0	15:48	水沢橋	相模原市	N35° 31' 53.49", E139° 11' 41.90"	小田島薰・小田島篤	さがみはら水生動物調査会	
西沢	18.2	13:24	水沢所橋	相模原市	N35° 33' 19.42", E139° 10' 46.60"	小田島薰・小田島篤	さがみはら水生動物調査会	
相模川	29.3	14:20	戸沢橋	海老名市	戸沢橋(右岸)	斎藤 誠	湘南里川づくりみんなの会	
相模川	26.0	14:45	昭和橋	相模原市	N35° 31' 15.38", E139° 22' 1.87"	小林義博	さがみはら水生動物調査会	
相模川	25.5	14:35	神川橋	平塚市	橋下流(田舎直下(左岸)川辺から3m	近藤博史	湘南里川づくりみんなの会	水温変動多(25.5-29.3)
相模川	25.2	15:00	高田橋	相模原市	N35° 32' 28.07", E139° 19' 44.40"	小林義博	さがみはら水生動物調査会	
相模川	23.6	15:10	小倉橋	相模原市	N35° 35' 12.15", E139° 17' 55.59"	小林義博	さがみはら水生動物調査会	
沢井川	22.9	15:27	上沢井橋	相模原市	N35° 38' 2.53", E139° 8' 28.51"	小田島樹・相澤直・守屋博文	さがみはら水生動物調査会	
沢井川	22.0	15:16	自然公園汐夕前	相模原市	N35° 39' 6.93", E139° 8' 56.06"	小田島樹・相澤直・守屋博文	さがみはら水生動物調査会	
中津川	26.3	13:02	中三田スポーツ広場	厚木市	野球場とサッカーフィールド	橋本亜紀子・田村将人	神奈川工科大学	
中津川	25.0	12:05	馬渡橋上流50m	愛川町	N35° 32' 22.75", E139° 16' 43.32"	小田島樹・相澤直・守屋博文	さがみはら水生動物調査会	
中津川	22.1	16:05	国際マス釣り場	相模原市	N35° 31' 9.04", E139° 11' 49.58"	小田島薰・小田島篤	さがみはら水生動物調査会	
底沢	21.3	16:02	美女谷橋	相模原市	N35° 37' 57.65", E139° 12' 12.61"	小田島樹・相澤直・守屋博文	さがみはら水生動物調査会	

	道志川	24.0	14:57	緑の休暇村	相模原市	N35° 32' 56.07", E139° 8' 10.27"	小田島薰・小田島篤	さがみはら水生動物調査会	
	道志川	22.9	12:42	弁天橋上流 50m	相模原市	N35° 34' 59.62", E139° 13' 28.35"	小田島樹・相澤直・守屋博文	さがみはら水生動物調査会	
	道保川	24.8	14:00	東沢合流点	相模原市	N35° 32' 21.83", E139° 22' 49.36"	小林義博	さがみはら水生動物調査会	
	日向川	25.5	13:40	日向川橋	厚木市		木嶋義光	くずはの家えのきの会	
	八瀬川	28.1	14:30	三段の滝	相模原市	N35° 31' 3.19", E139° 22' 46.60"	小林義博	さがみはら水生動物調査会	
	八瀬川	27.3	13:35	塩田こぶし橋	相模原市	N35° 32' 22.32", E139° 21' 13.86"	小林義博	さがみはら水生動物調査会	
	鳩川	30.0	13:05	新一の沢橋	相模原市	N35° 32' 5.30", E139° 22' 33.32"	大澤由美子・大澤崇幸	さがみはら水生動物調査会	
	鳩川	28.6	13:00	馬船橋	海老名市		石綿進一・司村宜洋	神奈川ウォーター・ネットワーク	
	鳩川	27.0	13:46	今橋	相模原市	N35° 32' 48.90", E139° 21' 51.50"	大澤由美子・大澤崇幸	さがみはら水生動物調査会	
	目九尻川	31.0	15:10	河原橋	寒川町	橋下(右岸)	谷芳生	なし	コンクリート護岸、水量多
	目九尻川	28.5	14:25	中野橋	綾瀬市	橋下、(右岸) (吉岡地区センター入口反対側)	谷芳生	なし	水田地帯
	目九尻川	26.9	13:45	伊勢下村橋	海老名市	橋上流10m、(右岸)	谷芳生	なし	間知ブロック2面積、上流勇水流入
	目九尻川	25.1	13:20	上栗原橋	座間市	橋下流10m、(右岸)	谷芳生	なし	コンクリート護岸で水路、住宅地
	用野川	27.5	14:00	一ノ橋	厚木市	N35° 30' 41.103" E139° 17' 28.211"	住倉英孝	神奈川ウォーター・ネットワーク	
金目川	歌川	28.0	15:25	八丈橋	伊勢原市	八丈橋から約15m上流の堰堤下流(右岸)	大井章豊	東京農大	
	河内川	32.1	13:00-15:00	万年橋	平塚市		佐藤道夫	金目川水系流域ネットワーク	
	河内川	31.5	13:00-15:00	くらの前橋	平塚市		佐藤道夫	金目川水系流域ネットワーク	
	河内川	30.5	13:00-15:00	鎌倉橋	平塚市		佐藤道夫	金目川水系流域ネットワーク	
	花水川	31.5	13:00-15:00	下花水橋	平塚市		府川清	金目川水系流域ネットワーク	
	花水川	31.3	13:00-15:00	花水橋	平塚市		府川清	金目川水系流域ネットワーク	
	花水川	31.1	13:00-15:00	高麗大橋	平塚市		府川清	金目川水系流域ネットワーク	
	花水川	31.1	13:00-15:00	花水川橋	平塚市		府川清	金目川水系流域ネットワーク	
	花水川	30.9	13:00-15:00	河内川河口	平塚市		府川清	金目川水系流域ネットワーク	

葛葉川	27.0	13:00-15:00	向山橋	秦野市		佐々木和義	金目川水系流域ネットワーク	
葛葉川	25.0	13:00-15:00	四山橋	秦野市		佐々木和義	金目川水系流域ネットワーク	
葛葉川	25.0	13:00-15:00	葛葉橋	秦野市		佐々木和義	金目川水系流域ネットワーク	
葛葉川	23.2	13:30	ほたるの里付近本流	秦野市	くずはの家(またるの里付近)渡歩石下流40m(左岸)	佐藤貞夫	くずはの家えのきの会	上流10mで伏流、両岸雑木等の土手
葛葉川	23.0	13:10	葛葉大橋下	秦野市	葛葉大橋下流100m(左岸)	佐藤貞夫	くずはの家えのきの会	大橋上流10mで伏流、両岸雑木等の土手
葛葉川	22.5	13:45	新九沢橋下	秦野市	新九沢橋上流30m。	仁木義治	くずはの家えのきの会	水深15cm、左岸アズマネザサの藪、右岸砂礫
葛葉川	22.2	13:00-15:00	九沢橋	秦野市		佐々木和義	金目川水系流域ネットワーク	
葛葉川	19.3	15:00	けやきの道渡歩石	秦野市	けやきの道渡歩石上流5m	仁木義治	くずはの家えのきの会	水深10cm、左岸アズマネザサの藪、右岸砂礫
葛葉川	19.0	15:45	ストリームタウン排水口下	秦野市	排水溝出口下3m。	仁木義治	くずはの家えのきの会	
葛葉川	18.2	13:40	ほたるの里湧水出口	秦野市	くずはの家(またるの里)下流40m(湧水流)	佐藤貞夫	くずはの家えのきの会	ホタルの里湧水より60m下流
金目川	34.0	13:00-15:00	吾妻橋	平塚市		森正義	金目川水系流域ネットワーク	
金目川	33.7	13:00-15:00	平塚大橋	平塚市		府川清	金目川水系流域ネットワーク	流量少ない
金目川	32.5	13:00-15:00	新霞橋	平塚市	湧水のたまりで測定	森正義	金目川水系流域ネットワーク	
金目川	32.0	13:00-15:00	通学橋	平塚市		森正義	金目川水系流域ネットワーク	
金目川	31.0	13:00-15:00	水神橋	平塚市	湧水のたまりで測定	森正義	金目川水系流域ネットワーク	
金目川	30.3	13:00-15:00	観音橋	平塚市		猪俣俊和	金目川水系流域ネットワーク	
金目川	28.3	13:00-15:00	土屋橋	平塚市		猪俣俊和	金目川水系流域ネットワーク	
金目川	26.9	13:00-15:00	蓬莱橋	秦野市		猪俣俊和	金目川水系流域ネットワーク	
金目川	26.8	13:00-15:00	南平橋	秦野市		猪俣俊和	金目川水系流域ネットワーク	
金目川	26.7	13:00-15:00	大安橋	秦野市		猪俣俊和	金目川水系流域ネットワーク	
金目川	25.0	13:00-15:00	入船橋	秦野市		杉山治男	金目川水系流域ネットワーク	
金目川	25.0	13:00-15:00	十代橋	秦野市		杉山治男	金目川水系流域ネットワーク	

	金目川	25.0	13:00-15:00	天王下橋	秦野市		杉山治男	金目川水系流域ネットワーク	
	金目川	25.0	13:00-15:00	弘法橋	秦野市		杉山治男	金目川水系流域ネットワーク	
	金目川	24.0	13:00-15:00	金目川橋	秦野市		安池春敏	金目川水系流域ネットワーク	
	金目川	22.5	13:00-15:00	才戸橋	秦野市		安池春敏	金目川水系流域ネットワーク	
	金目川	21.0	13:00-15:00	養毛橋	秦野市		安池春敏	金目川水系流域ネットワーク	
	座禅川	28.0	13:00-15:00	座禅橋	平塚市		藤村隆司	金目川水系流域ネットワーク	
	座禅川	27.0	13:00-15:00	寺分大橋	平塚市		藤村隆司	金目川水系流域ネットワーク	
	座禅川	25.0	13:00-15:00	芳盛寺橋	平塚市		藤村隆司	金目川水系流域ネットワーク	
	室川	25.0	13:00-15:00	白笹橋	秦野市		高津茂	金目川水系流域ネットワーク	
	室川	21.5	13:00-15:00	今泉螢橋	秦野市		高津茂	金目川水系流域ネットワーク	
	室川	20.5	13:00-15:00	中尾橋	秦野市		高津茂	金目川水系流域ネットワーク	
	渋田川	31.8	13:00-15:00	玉川橋	平塚市		西岡哲	金目川水系流域ネットワーク	
	渋田川	31.4	13:00-15:00	美里橋	平塚市		岩本勲	金目川水系流域ネットワーク	
	渋田川	31.2	13:00-15:00	土安橋	平塚市		岩本勲	金目川水系流域ネットワーク	
	渋田川	31.2	13:00-15:00	渋田大橋	平塚市		岩本勲	金目川水系流域ネットワーク	
	渋田川	31.2	13:00-15:00	新大綱橋	平塚市		西岡哲	金目川水系流域ネットワーク	
	渋田川	31.2	13:00-15:00	立堀橋	平塚市		西岡哲	金目川水系流域ネットワーク	
	渋田川	31.1	13:00-15:00	中原橋	平塚市		西岡哲	金目川水系流域ネットワーク	
	渋田川	29.5	13:00-15:00	太田橋	平塚市		小林公匂	金目川水系流域ネットワーク	
	渋田川	28.5	13:00-15:00	上谷橋	平塚市		小林公匂	金目川水系流域ネットワーク	
	渋田川	28.0	13:00-15:00	川上橋	平塚市		小林公匂	金目川水系流域ネットワーク	
	渋田川	26.8	13:05	東名高速渋田川橋下り線橋下	伊勢原市		大井章豊	東京農大	
	渋田川	26.5	13:00-15:00	道糞橋	平塚市		小林公匂	金目川水系流域ネットワーク	

	渋田川	23.0	13:00-15:00	石橋	平塚市		小林公潤	金目川水系流域ネットワーク	
	水無川	計測不可	13:00-15:00	平和橋	秦野市		柳川三郎	金目川水系流域ネットワーク	水量なし
	水無川	計測不可	13:00-15:00	堀土大橋	秦野市		柳川三郎	金目川水系流域ネットワーク	水量なし
	水無川	計測不可	13:00-15:00	まほろば橋	秦野市		柳川三郎	金目川水系流域ネットワーク	水量なし
	水無川	28.1	13:00-15:00	戸川公園	秦野市		柳川三郎	金目川水系流域ネットワーク	
	水無川	27.5	13:00-15:00	室川橋	秦野市		柳川三郎	金目川水系流域ネットワーク	水量少ない
	善波川	33.2	13:00-15:00	矢芦井橋	伊勢原市		露木正巳	金目川水系流域ネットワーク	三面護岸
	善波川	32.8	13:00-15:00	出口橋	伊勢原市		露木正巳	金目川水系流域ネットワーク	三面護岸
	善波川	29.2	13:00-15:00	桜橋	伊勢原市		露木正巳	金目川水系流域ネットワーク	三面護岸
	大根川	31.8	13:00-15:00	眞田橋	秦野市		大澤進	金目川水系流域ネットワーク	
	大根川	31.6	13:00-15:00	大畠橋	秦野市		大澤進	金目川水系流域ネットワーク	
	大根川	31.4	13:00-15:00	中央橋	秦野市		大澤進	金目川水系流域ネットワーク	
	大根川	31.0	13:00-15:00	ひので橋	秦野市		大澤進	金目川水系流域ネットワーク	
	板戸川	28.7	13:00-15:00	板戸川橋	伊勢原市		道村康博	金目川水系流域ネットワーク	コンクリート用水路
	板戸川	27.1	13:00-15:00	木津根橋	伊勢原市		道村康博	金目川水系流域ネットワーク	
	鈴川	32.3	13:00-15:00	新白髭橋	平塚市		佐藤貴子	金目川水系流域ネットワーク	
	鈴川	32.0	13:00-15:00	岡崎大橋	平塚市		佐藤貴子	金目川水系流域ネットワーク	
	鈴川	31.9	13:00-15:00	東橋	平塚市		佐藤貴子	金目川水系流域ネットワーク	
	鈴川	31.1	13:00-15:00	東橋	平塚市		道村康博	金目川水系流域ネットワーク	
	鈴川	28.7	15:50	やなぎ橋	伊勢原市	鈴川クリーセンタ横、橋下流直下	近藤尊史	湘南里川づくりみんの会	上流700mに伊勢原下水処理場の排水口、
	鈴川	27.0	13:00-15:00	叔母様橋	伊勢原市		道村康博	金目川水系流域ネットワーク	
葛川	葛川	34.0	13:45	上中橋	中井町	橋の上から取水	山口俊彦	湘南里川づくりみんの会	コンクリート護岸、水深50cm、水草多い、日陰なし
	葛川	30.6	14:15	大心寺橋	二宮町	寺の正面駐車場への橋の下	山口俊彦	湘南里川づくりみんの会	コンクリート護岸、水深50cm

	葛川	25.5	13:10	中津橋	中井町		曾我功・瀬戸毅巳	里山コミュニティアーム	
	宮下川	28.0	13:10	吉沢の池下	平塚市	池からの水路10m地点	山口俊彦	湘南里川づくりみんなの会	コンクリート護岸
	宮下川	25.5	12:53	霧降の滝	平塚市	滝近くの流水	山口俊彦	湘南里川づくりみんなの会	
	不動川	31.7	14:33	本郷橋	大磯町	橋の上から取水	山口俊彦	湘南里川づくりみんなの会	コンクリート護岸、水深50cm、水量多
	不動川	31.2	13:22	宮下橋	平塚市	宮下川と不動川合流地点	山口俊彦	湘南里川づくりみんなの会	コンクリート護岸、水深50cm、水草多い
中村川	岩倉川	29.8	13:57	松本橋	中井町		岩田裕輔・岩田素子	はだの幼稚教育研究会	
	岩倉川	27.9	14:10	松倉橋	中井町		岩田裕輔・岩田素子	はだの幼稚教育研究会	
	中村川	30.0	13:40	押切橋	中井町		鈴野香・山口由美子	はだの幼稚教育研究会	
	中村川	29.5	13:17	坂呂橋	中井町		小松千秋・二川原由佳	はだの幼稚教育研究会	
	中村川	29.1	14:40	旭橋	中井町		鈴野香・山口由美子	はだの幼稚教育研究会	
	中村川	29.0	13:33	万年橋	中井町		小松千秋・二川原由佳	はだの幼稚教育研究会	
	中村川	28.8	13:42	遠藤橋	中井町		持田由美	はだの幼稚教育研究会	
	中村川	28.0	13:44	富士見橋	中井町		小松千秋・二川原由佳	はだの幼稚教育研究会	
	中村川	23.8	13:23	鴨沢大橋	中井町		大塚政美・近藤裕子	はだの幼稚教育研究会	
	中村川	22.2	13:55	高尾橋	中井町		大塚政美・近藤裕子	はだの幼稚教育研究会	
森戸川	藤沢川	28.0	15:00	清岩寺付近	中井町		鈴野香・山口由美子	はだの幼稚教育研究会	
	藤沢川	24.0	13:25	東大塚橋	中井町		曾我功・瀬戸毅巳	里山コミュニティアーム	
	劍沢川	30.0	14:00	剣沢橋	小田原市	橋の上から採水	稲田伊史・柳川維	くずはの家えのきの会	コンクリート護岸、水深10cm
酒匂川	森戸川	30.3	14:35	親木橋	小田原市	橋の上から採水	稲田伊史・柳川維	くずはの家えのきの会	コンクリート護岸、水量多
	森戸川	30.0	14:10	森戸大橋	小田原市	新幹線下の橋のたもとから採水	稲田伊史・柳川維	くずはの家えのきの会	コンクリート護岸、水量少
	鮎沢川	27.0	16:00	鮎沢川 河内川合流点付近	山北町		山崎泰	神奈川ウォーター・ネットワーク	
	河内川	25.6	16:25	河内川 鮎沢川合流点付近	山北町		山崎泰	神奈川ウォーター・ネットワーク	
	鬼柳堰	23.8	13:35	直角に曲がった地点	大井町		橋本弘	ボランティア	

鬼柳桑 原農業 用水路	30.0	13:35	つながり水 路	小田原 市		岩田卓二・磯田 幸男	酒匂川水系のメダカ と生息地を守る	
鬼柳桑 原農業 用水路	28.2	13:30	出水口（水 田ビオトー ブ）	小田原 市		岩田卓二・磯田 幸男	酒匂川水系のメダカ と生息地を守る	
鬼柳桑 原農業 用水路	27.8	13:30	ビオトープ 池側	小田原 市		岩田卓二・磯田 幸男	酒匂川水系のメダカ と生息地を守る	
鬼柳桑 原農業 用水路	27.5	13:30	木工団地東	小田原 市		山岡健郎	河川モニタリング調 査員	
鬼柳桑 原農業 用水路	26.5	13:00	鬼柳市営住 宅進入路の 橋下	小田原 市		山岡健郎	河川モニタリング調 査員	
金瀬川	28.2	13:45	金瀬川水門 下流側	小田原 市		岩田卓二・磯田 幸男	酒匂川水系のメダカ と生息地を守る	
四十八 瀬川	26.4	14:06	甘柿橋	秦野市	旧甘柿橋直上堰堤の上の流れ	佐々木重満	四十八瀬川自然村	
四十八 瀬川	24.6	13:32	河内橋	秦野市		佐々木重満	四十八瀬川自然村	
四十八 瀬川	24.5	13:45	湯ノ沢橋	秦野市		佐々木重満	四十八瀬川自然村	
尺里川	26.4	13:44	山北高校脇	開成町	橋下魚道内	氏田章治	四十八瀬川自然村	
狩川	26.9	13:15	上河原橋	南足柄 市		高橋一公・由 季・和希	酒匂川水系のメダカ と生息地を守る	
狩川	23.5	13:45	関下橋	南足柄 市		高橋一公・由 季・和希	酒匂川水系のメダカ と生息地を守る	
酒匂	23.0	16:35	東名高速酒 匂大橋下	山北町		山崎泰	神奈川ウォーター・ ネットワーク	
酒匂川	32.0	15:48	狩川橋	小田原 市	アユ浮上	山本和子	ブリの森づくりプロ ジェクト	
酒匂川	31.0	13:21	十文字橋	開成町	橋下（左岸）	氏田章治	四十八瀬川自然村	
酒匂川	30.0	14:05	富士道橋	小田原 市		櫻井皓	ボランティア	
酒匂川	30.0	13:00-16: 00	飯井	南足柄 市		山本和子	ブリの森づくりプロ ジェクト	
酒匂川	29.0	13:00-16: 00	報徳橋（鬼 柳用水）	小田原 市	雷雨、13日は28.4℃	川島範子	ブリの森づくりプロ ジェクト	
酒匂川	29.0	13:00-16: 00	関下橋	南足柄 市	アユ浮上	川島範子	ブリの森づくりプロ ジェクト	
酒匂川	28.1	13:19	報徳橋	小田原 市		橋本弘	ボランティア	
酒匂川	28.0	15:10	鮎沢橋	山北町		川島範子	ブリの森づくりプロ ジェクト	
酒匂川	28.0	13:00-16: 00	仙了橋	南足柄 市		山本和子	ブリの森づくりプロ ジェクト	

	酒匂川	27.1	15:16	南鴨宮ＪＲ 鉄橋下	小田原市		櫻井皓	ボランティア	
	酒匂川	26.5	15:00	十文字橋	松田町	雷雨、13日は31.0℃	川島範子	ブリの森づくりプロジェクト	
	酒匂川	26.0	13:30	浅瀬	山北町		川島範子	ブリの森づくりプロジェクト	
	酒匂川	26.0	13:00	中川温泉	山北町		川島範子	ブリの森づくりプロジェクト	
	酒匂川	26.0	13:00-16: 00	樋口橋	山北町		川島範子	ブリの森づくりプロジェクト	
	酒匂川	25.9	14:11	岩流鶴川	山北町	橋下(右岸)	氏田章治	四十八瀬川自然村	
	酒匂川	24.6	13:00-16: 00	上河原橋	南足柄市		川島範子	ブリの森づくりプロジェクト	
	酒匂川	24.0	14:30	神繩	山北町		川島範子	ブリの森づくりプロジェクト	
	酒匂川	23.7	17:30	岩流鶴橋下	山北町		山崎泰	神奈川オーター・ネットワーク	
	酒匂川	23.7	17:45	酒匂川 文 命用水放流 門前	南足柄市		山崎泰	神奈川オーター・ネットワーク	
	酒匂川	23.0	17:10	二軒屋付近	山北町		山崎泰	神奈川オーター・ネットワーク	
	酒匂川	21.5	14:10	玄倉	山北町		川島範子	ブリの森づくりプロジェクト	
	世附川	24.0	14:25	大又沢合流 点付近	山北町	世附川本流	山崎泰	神奈川オーター・ネットワーク	
	世附川	24.0	14:45	丹沢湖バッ クウォータ ー	山北町		山崎泰	神奈川オーター・ネットワーク	
	世附川	23.9	14:20	合流点付近	山北町	大又沢、世附川本流合流付近	山崎泰	神奈川オーター・ネットワーク	
	仙人川	26.5	13:30	仙人橋	小田原市		中山和也・陣野 一郎・外郎佐喜 子	酒匂川水系の環境を 考える会	
	仙人川	25.5	14:45	下河原庭橋	小田原市		中山和也・陣野 一郎・外郎佐喜 子	酒匂川水系の環境を 考える会	
	川音川	水な し	13:00	文久橋	松田町		氏田章治	四十八瀬川自然村	
	大又沢	23.4	13:25	法行沢出 合上流側	山北町	大又ダム下流	山崎泰	神奈川オーター・ ネットワーク	
	大又沢	22.0	13:00	大又ダムバ ックウォー ター	山北町		山崎泰	神奈川オーター・ ネットワーク	
	土手根 第1排 水路	27.0	13:12	小田原アリ ーナサイド	小田原市		中山和也・陣野 一郎・外郎佐喜 子	酒匂川水系の環境を 考える会	

	洞川	25.5	14:00	新中丸橋	小田原市	新中丸橋より1つ下流橋	中山和也・陣野一郎・外郎佐喜子	酒匂川水系の環境を考える会	
	洞川	19.0	14:20	富士フィルム神奈川工場	南足柄市		中山和也・陣野一郎・外郎佐喜子	酒匂川水系の環境を考える会	
	内川	24.2	14:43	北小田原病院前	山北町	病院前橋上30m	氏田章治	四十八瀬川自然村	
	文命用水放流水	22.7	17:45	文命用水放流水	南足柄市		山崎泰	神奈川ウォーター・ネットワーク	
	峰発電所放流水	22.2	16:05		山北町		山崎泰	神奈川ウォーター・ネットワーク	
	法行沢	19.6	13:33	法行沢林道橋下	山北町		山崎泰	神奈川ウォーター・ネットワーク	
	要定川	25.8	13:50	上柏山橋	南足柄市		中山和也・陣野一郎・外郎佐喜子	酒匂川水系の環境を考える会	
	要定川	25.3	14:30	南足柄市文化会館裏	南足柄市		中山和也・陣野一郎・外郎佐喜子	酒匂川水系の環境を考える会	
	嵐発電所放流水	21.8	16:50	嵐発電所放流水	山北町	三保ダムの水	山崎泰	神奈川ウォーター・ネットワーク	
山王川	山王川	26.5	13:00-16:00	下河原橋	小田原市		近藤忠	ブリの森づくりプロジェクト	
	山王川	26.5	13:00-16:00	星山橋	小田原市		近藤忠	ブリの森づくりプロジェクト	
	山王川	26.3	13:00-16:00	山王橋	小田原市		伊豆川哲也	ブリの森づくりプロジェクト	
早川	早川	27.0	13:00-16:00	仙石原	箱根町		稲村公希	ブリの森づくりプロジェクト	
	早川	26.0	13:00-16:00	弥栄橋	箱根町		稲村公希	ブリの森づくりプロジェクト	
	早川	26.0	13:00-16:00	三枚橋	箱根町		稲村公希	ブリの森づくりプロジェクト	
	早川	26.0	13:00-16:00	早川橋	小田原市		稲村公希	ブリの森づくりプロジェクト	
	早川	25.0	13:00-16:00	旭橋	箱根町		稲村公希	ブリの森づくりプロジェクト	
	早川	24.0	13:00-16:00	大畑橋	箱根町		稲村公希	ブリの森づくりプロジェクト	
	早川	22.0	13:00-16:00	紅葉閣下	箱根町		稲村公希	ブリの森づくりプロジェクト	
新崎川	新崎川	23.5	13:40	宮渡橋	湯河原町	新幹線橋梁下(左岸) (N35° 09' 28.0", E139° 06' 32.5")	杉山吾郎	くずはの家えのきの会	
	新崎川	23.5	14:10	吉浜橋	湯河原町	橋の下(右岸) (N35° 08' 48.6", E139° 06' 57.4")	杉山吾郎	くずはの家えのきの会	

	新崎川	21.3	13:10	幕山(大石平)	湯河原町	橋上流10m(右岸) (N35° 09' 57.8", E139° 05' 22.4")	杉山吾郎	くずはの家えのきの会	
千歳川	蛇熊沢	19.0	15:20	蛇熊(あけじ)橋	湯河原町	橋下(右岸) 3m下 (N35° 09' 40.8", E139° 03' 12.1")	北林文夫	くずはの家えのきの会	
	千歳川	27.0	14:30	中河原橋	湯河原町	橋上、JR東海道線橋脚下(右岸) (N35° 08' 26.1", E139° 05' 45.0")	北林文夫	くずはの家えのきの会	
	千歳川	24.7	15:50	落合橋	湯河原町	橋上(右岸) (N35° 08' 42.8", E139° 04' 30.9")	北林文夫	くずはの家えのきの会	
	藤村川	21.0	15:40	紅葉橋	湯河原町	橋上(右岸) (N35° 09' 51.5", E139° 03' 36.6")	北林文夫	くずはの家えのきの会	

神奈川県の淡水魚と河川環境

勝呂尚之

NPO 法人 神奈川ウォーター・ネットワーク

Freshwater fish and river environment in Kanagawa prefecture

Naoyuki SUGURO

1はじめに

神奈川県の内水面水域は、東の多摩川から西は千歳川まで、多くの河川がほぼ北から南へと流れ、東京湾と相模湾へ注いでいる。その源流は丹沢山塊に代表される急峻な溪流域と多摩丘陵に代表される谷戸で、中流および下流も変化に富んだ環境であり、さまざまな魚類が生息していた。

しかし、最近は、都市化とともに水質汚濁、河川流量の減少、河川改修、土砂問題、外来種の移植など、多くの問題が発生し、生息する魚類にとっては、非常に厳しい状況である。そのため、生息域が減少して絶滅に瀕している魚類が増え、既に県下の自然水域から姿を消してしまった魚種もいる。県のレッドデータブックでは、淡水・汽水魚類について、絶滅種 2 種、野生絶滅種 2 種、絶滅危惧 I A 類 7 種（亜種を含む）、絶滅危惧 I B 類 5 種、絶滅危惧 II 類 2 種、準絶滅危惧 8 種、注目種 3 種、情報不足 10 種がリストアップされている¹⁾。



図 1a 丹沢の源流域に生息するイワナ



図 1b 溪流魚の代表種・ヤマメ

このように、県内の河川に生息する魚類は、様々な環境変化の影響を受けている。本報では、これらの淡水魚に対する水温環境をはじめとする環境因子について概括する。

2 高水温による淡水魚類への影響

近年、地球規模の気候変動が世界各地で大きな問題となっており、日本においても夏季の温度上昇やゲリラ豪雨の多発など、過去にはなかったような気候変動が生じている。中でも地球温暖化に伴う、河川水温の上昇は、人為的な要因も加わり、淡水魚の生活を脅かす重大な問題である。特に、溪流や谷戸の源流に生息する冷水性の魚類は、水温の上昇には敏感である。例えば、溪流の代表魚であるイワナ(図 1a)の適水温は、10~15°Cであり、24°C以上では摂餌が停止し、26°Cで死亡する²⁾。ヤマメ(図 1b)は、夏季

の最高気温が概ね 20°C以下の河川に生息し、最適水温は 10~15°Cである³⁾。また、山のキャンプ場で子供に人気のあるカジカ（図 1c）では、生息可能水温は 0~24°Cである⁴⁾。



図 1c 生息地が減少しているカジカ

環境省のホームページ⁵⁾によると、現在のイワナ分布域は、本州では東北地方から中部地方までの山間部に広く生息好適地が存在し、中国地方や紀伊半島の高標高の渓流域にも適地が存在している。しかし、仮に水温が 3°C上昇すると、中部山地以西の西日本の好適地はほぼ無くなり、東日本においても生息適地は高標高地のみに限られてしまう⁵⁾。これらの河川上流域に生息する魚類にとっては、生息地の温度上昇は、まさに死活問題なのである。



図 1d 釣り魚として人気の高いアユ

また、河川中流域に生息する産業種のアユ（図 1d）でも、生息可能水温は 5~30°Cであるが、適水温は 15~25°Cであるため⁶⁾、近年の都市河川における夏の水温を勘案すると、かなり厳しい状況である。

3 水温が上昇すると繁殖にもダメージ

河川水温の上昇は、淡水魚の生存を直接脅かすだけでなく、繁殖へも悪影響を及ぼし、次世代へもダメージを与える危険性がある。イワナやヤマメのようなサケ科魚類は、秋に水温が低下すると産卵し、正常な卵の発生やふ化にはある程度の低水温が不可欠である。例えば、イワナでは、ふ化までの卵の適水温は 9~11°Cで、15°Cを超えるとふ化率や発眼率が極端に低下する⁷⁾。これらの魚類では夏の高水温期だけでなく、産卵期と卵の発生時期である秋から冬の水温が、適水温より上昇すると、次世代にダメージが生じるのである。

また、一部の魚類では水温が性決定に影響する事例も数多く報告されている。南米の代表的な産業種であるペヘレイでは、卵の発生時期において水温が 17°C以上ではすべてが雄となるが、高水温になるに連れて、雌の割合が増え、29°Cではすべてが雌になる⁸⁾。海産魚のヒラメでも、卵発生時期の水温が、性決定に影響を与えることが知られている^{9,10)}。これらの試験結果を考慮すると、高水温が魚類の性比を変化させ、繁殖に何らかの悪影響を与える危険性が指摘される。

4 水温上昇の原因

全国各地における平均気温の上昇を見れば、地球温暖化は、未来の懸念ではなく、現在の重大な環境問題の一つとなっていることは明白な事実であり、緊急の対応が求められる¹¹⁾。そのため、地球温暖化が水温上昇の大きな要因であることは、間違いないが、その他にも、人為的な影響によって、河川周辺の自然環境が変化し、水温の上昇を助長している。

まず、河川の流量に目を向けると、都市河川では、水源林の破壊による水源涵養機能の低下、あるいは上水、発電、農業用水などの河川水の高度利用に伴い、通常の河川流量は減少している。水量が減少すれば、外気温の影響を受けやすくなり、通常よりも夏季には水温が上昇しやすく、冬季には低下しやすい状態になる。

また、近年、下水道の整備により、多摩川や鶴見川などの代表的な都市河川では、水質が著しく改善し、アユやテナガエビなど、一時期、姿を消していた生物も戻りつつある。しかしながら、河川へ放流される下水処理水は自然の河川水とは、水質が大きく異なり、水温が高くなることが

知られている。そのため、処理水の影響を受ける都市河川の中下流域では、水温の上昇が顕著である¹²⁾。前述のとおり、在来の水生生物への悪影響が懸念されるが、さらに冬季の水温上昇は、マスコミでもよく話題にされる熱帯性外来種の定着を容易にする。近年、本県においてもナイルテラピアやグッピーなどの熱帯性外来魚の報告事例が増えているので¹³⁻¹⁴⁾、在来種は、高水温の直接的な影響だけでなく、外来種の増加という間接的なダメージも受けている。

5 丹沢の渓流と水温の上昇

丹沢山塊は神奈川県の水源として、また登山やキャンプ等の憩いの場として重要なエリアである。しかし、近年、その自然環境は大きく変化し、生態系の崩壊が進行しており、淡水魚の生息する渓流域においても、多くの問題が生じている。そこで、県では、丹沢地域の自然状況の把握とその対策について検討するため、丹沢大山総合調査を実施してきた。渓流域では、魚をはじめとする水生生物の視点から問題点を抽出し、対策を提言することに重点を置いて、魚類や底生動物の調査を行ってきた¹⁵⁾。その諸課題の中には、河川の水温上昇と関係するものが少なくない。

まず、ブナの立ち枯れや放置された人工林の増加、シカによる食害などで、丹沢の水源環境が悪化していることが最も深刻な問題である。前述のとおり、水源林がダメになれば、河川の流量は不安定となる。枯水時や夏季における河川水量の低下は、渓流魚にとっては致命的である。また、魚にとっては、直接、河川と接する河畔林も重要である。渓畔林が川を覆っている河川では、バッタや甲虫等、多くの陸生の無脊椎動物をヤマメが主食として利用しており、重要な餌の供給場所となっている¹⁷⁾。しかも、渓畔林は夏の直射日光を遮り、水温の上昇を防ぐ重要な働きがある。

さらに、人工構造物、特に取水堰（取水ダム）の問題が挙げられる。あまり知られていないが、丹沢山塊では、山深い源流域にも、上水用や発電用の取水堰が多く存在している。これらの主要な取水堰で、魚類調査を行ったところ、ダム下流では水量が極端に減少するため、ヤマメやカジカの生息密度が低下し、繁殖や成長、肥満度に悪影響が生じていた¹⁶⁾。河川上流域における取水は、渓流魚が苦手な夏の高水温を上昇させ、分布域を縮小させる危険性がある。

取水堰の問題はそれだけに留まらない。実は取水の有無

に関わらず、魚たちにとって堰堤の構造そのものがやっかいな代物である。丹沢では急峻な河川が多いため、土砂が下流へ流れるのを防ぐ砂防堰堤や、山の崩壊を防止する治山堰堤が数多く存在している。これらの堰堤は、大きな段差を生じさせてるので、魚類の移動を阻害し、生息域を分断してしまう。魚類は水温の変化には非常に敏感で、わずかな温度差も感知できる。夏の暑い時期には、高水温が苦手な渓流魚は、より低い水温を求めて移動する。しかし、数多くの堰堤があるので、広範囲を移動できない。その水域の水温が生存限界値より上昇すれば、生きてはいけないのである。

さらに、砂防堰堤や治山堰堤の直上は、土砂の堆積により浅い単調な流れになるので、暑い日には水温が上昇しやすい。最悪の場合には、水が伏流して川の流れそのものがなくなり、魚が住めなくなってしまう（図2）。



図2 川が伏流し水がない堰堤の上流側

最近の調査から判明した渓流域の環境の悪化は、地球温暖化の進行により、さらに加速する危険性がある。現状を改善するためには、水源林の保全・再生、河川取水方法の検討など、さまざまな対策が必要である。現在、丹沢再生計画にも基づく、自然再生事業が行われているが、渓流魚にとっては、夏の高水温時と繁殖期における流量の確保、河川の連続性の復元、周辺の渓畔林の保全・復元などの対策が緊急に求められる。

6 淡水魚の生態系を保全・復元するために

現在、神奈川県の淡水魚の多くは、ごく一部の種を除くと、ほとんどの種が分布域を縮小させ、憂慮すべき事態に直面している。しかしながら、最近は新国家戦略が見直さ

れ、県でも環境基本計画が設置された。河川法や農業基本法などにも生物への配慮が義務付けられた。絶滅種あるいは絶滅危惧種の対策についても、国や地方公共団体、NPOなどが保全・復元を図るケースが増え、実績も上がっている。さらに、多くの県民の皆さんと、河川環境の悪化や淡水魚の絶滅を憂い、未来を考える時代になったことは、大きな希望である。少し前までは、近所の小川の小さな魚のことなど誰も気にもとめなかつたし、その存在すら知られていなかつたからだ。

このような状況の中で開始された水温調査は、近所の川の水温を測定するだけと言う簡易な作業であり、また、調査頻度も年1回という断片的なデータではあるが、今後も、毎年継続することで、神奈川県の河川環境の変化を把握する貴重な資料となることは間違いない。しかも、市民団体や市民が自主的に参加することで、正確な情報を共有でき、強い問題意識を持ちながら、行政とともに現状や対策について考える機会を持つことができる。その結果、淡水魚を含めた内水面生態系の保全・復元へ向かって、新たな市民レベルの展開が期待でき、今後も、さらに多くの市民の皆さんの关心と協力が得られるものと確信している。

参考文献

- 1) 勝呂尚之・瀬能 宏. 汽水・淡水魚類. 神奈川県レッドデータ生物調査報告書 脊椎動物編 (高桑正敏・勝山輝男・木場英久編), 神奈川県立生命の星・地球博物館, pp.275-288, (2006).
- 2) 山本 聰. イワナ. 水産増養殖システム 淡水魚 (隆島忠夫・村井 衛編), 恒星社厚生閣: 1-5, (2005) .
- 3) 河西一彦ヤマメ. 水産増養殖システム 淡水魚 (隆島忠夫・村井 衛編), 恒星社厚生閣: 69-75, (2005) .
- 4) 河本幸治: カジカ. 水産増養殖システム 淡水魚 (隆島忠夫・村井 衛編), 恒星社厚生閣: 245-249, (2005) .
- 5) 環境省ホームページ. 地球温暖化による生態系・種への影響が懸念される地域(イワナの生息適地の変化予測), http://www.biodic.go.jp/biodiversity/activity/policy/map/map16/index_02.html.
- 6) 吉澤和俱. アユ. 水産増養殖システム 淡水魚 (隆島忠夫・村井 衛編), 恒星社厚生閣: 83-101, (2005) .
- 7) 斎藤 薫・熊崎隆夫・立川 互. イワナの増殖に関する研究一IV, 岐阜県水産試験場研究報告, 21: 67-70, (1975).
- 8) Strussmann C. A., Saito T., and Takashima F., Heat-induced germ cell deficiency in the teleosts *Odontesthes bonariensis* and *Patagonia hatchri*, *Comp. Biochem. Physiol.*, 119A: 637-644, (1998) .
- 9) Kitano T., Takamune K., Kobayashi T., Nagahama Y., and Abe S. I.. Suppression of P450 aromatase gene expression in sex-reversed males produced by rearing genetically females larvae at a high water temperature during a period of sex differentiation in the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*, *J. Mol. Endocrinol.*, 23: 167-176. (1999).
- 10) 山本栄一. ヒラメの全雌およびクローン魚作出技術開発に関する研究, 日本水産学会誌, 64: 638-641. (1999) .
- 11) 温暖化影響総合予測プロジェクトチーム. "温暖化影響総合予測プロジェクト報告書" 地球温暖化 日本への影響-最新の科学的知見-, (2008) .
- 12) 木内 豪. 多摩川の水温変化の実態と形成要因に関する研究, 公益財団法人とうきゅう環境財団, 26pp. (2013) .
- 13) 萩宮 敦・安藤 隆. 相模川と中津川の魚類相 (1993-2005年), 神奈川県水産技術センター研究報告, 3: 1-24. (2008) .
- 14) 奈川県環境科学センター. 神奈川県内河川の魚類, 137pp. (2014) .
- 15) 勝呂尚之・金子裕明・糸井史朗・石綿進一・斎藤和久. 魚類調査総括, 丹沢大山総合調査学術報告書, pp275-279. (2007) .
- 16) 勝呂尚之・金子裕明・碓井昭司・斎藤和久・石綿進一. 取水堰が渓流魚に与える影響, 丹沢大山総合調査学術報告書, pp293-303. (2007) .
- 17) 勝呂尚之・石綿進一・斎藤和久. 東西モニタリング・エリアの魚類相, 丹沢大山総合調査学術報告書, 280-292. (2007) .

河川環境と水循環

西岡 哲

株式会社地圈環境テクノロジー

1. まえがき

金目川は丹沢山系を源とし、水無川、葛葉川とともに平塚市の西部を流れ、渋田川や鈴川を合流して花水川と名を変え相模湾にそそぐ神奈川県西部を流れる川である。河川を流れる水は、大雨でこそ濁流となって多量の水が流出し、洪水となって時には甚大な被害を及ぼすこともあるが、渴水時でも水無川の一部区間などを除き枯れることがない。金目川はどのような水循環の構造により成り立っているのか？金目川の生態系は、金目川の水循環と深くかかわって成立しているのではないか？地表に降り注いだ雨は、地下にしみこみ川に湧き出し、やがて海に到達する。したがって、また海の生態系にも金目川の水循環が影響しているのではないか？

本研究ノートでは、水循環に関する既往の研究事例を紹介し、水循環と生物多様性の結びつきに関して考える情報を提供する。

2. 水循環の機構

自然環境は、①土壤・岩石圏という基盤、②陸水が創り出すダイナミックな流動サイクル（降水、蒸発散、地表流れ、地下水流れ）を母胎として、③自然の動植物が創り出す生態系、④人間活動が創り出した人工環境、により形成されている。

水循環シミュレーション技術は、地表水・地下水連成解析技法（以下 GETFLOWS と記す）として登坂（2006）¹⁾により開発され、地上、地下の流れの速さが極端に異なる水の動きを統合して解析できるところまで来ている。

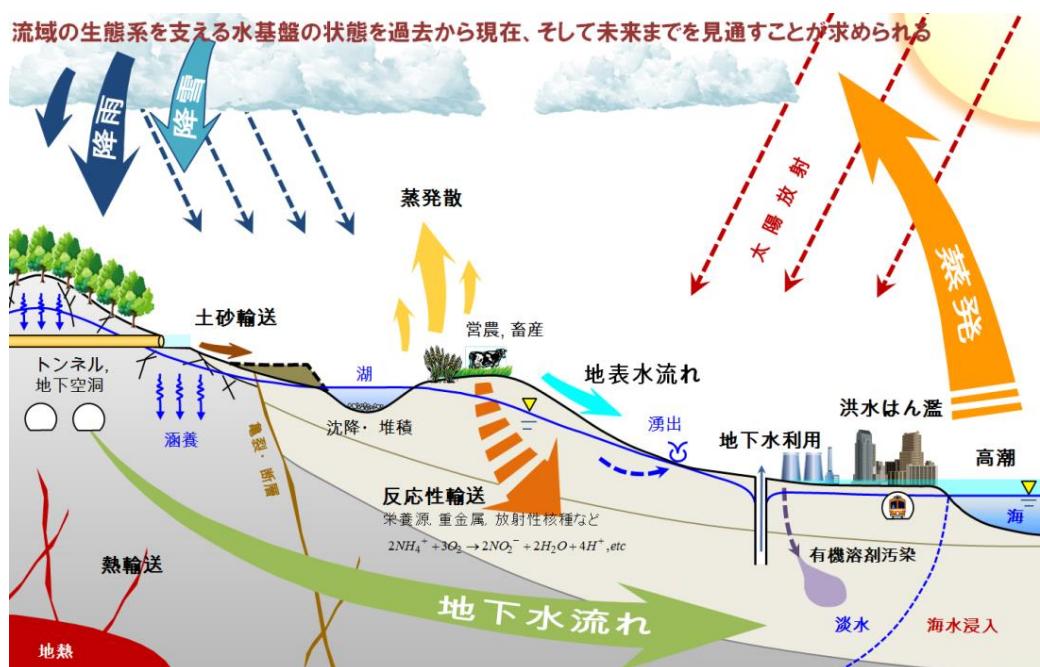


図1 水・物質循環の概念図

GETFLOWS は、これまで個々の数理モデルによって定式化されてきた地上、地下の水の動きを、数値精度を維持したまま数学的に統一化させた点に最大の特徴をもち、これによって地上に降り注いだ雨水の行方を時間的、空間的のスケールの大小を問わずに追跡できる。すなわち、陸面における地表水と地下水の交換をその場所の降雨、地形起伏、土地利用、地質等の違いによって決まるレスポンスとして解析し、雨水がしみ込みやすい場所、地下水が湧き出しやすい場所、その強さを捉えることが可能となった。

流域の水環境問題に取り組んでいくためには、目に見えない水循環に対して水循環を可視化し多くの方が情報を共有できる基盤を構築していくことが求められる。河川環境を構成する生態系は、ダイナミックに変化する水循環との関係を同時に見ていくことが重要であると考える。図1にコンピュータ上で作り上げるモデルの概念図を示す。これは自然の姿をできる限りありのままに模倣し、人間のイメージを超えた複雑系のまだ良くわからない状態を浮かび上がらせようとするものである。

これまで水循環という複雑な現象は、人間の直感的な理解を超えていたため、フィールド調査や観測という手法で得られた断片的な情報から、解釈するのが一般的であった。環境影響評価を客観的・定量的に行うためには、フィールド観測

の情報と、①から④までを全て取り込んだ流域の水・物質循環シミュレーションとを比較し、自然環境の中で起きている現象の本質に迫るプロセスが重要である。このようにして得られた情報は、現状の環境影響評価や将来予測さらには防災、環境教育や政策意思決定などに活用できる。

3. 神奈川拡大流域圏の水循環シミュレーション

自然本来の水循環挙動および関連するフィールド情報を組織化するために、横浜国立大学佐土原研究室では神奈川拡大流域圏および金目川流域を対象とした自然水循環モデリングを実施し、広域の流域に対して地表の情報から地下の情報まで持った3次元の流域モデルで、河川流量、地下水位、植生、土地利用等のさまざまなデータを空間と時間における属性データとして過去から現在までの情報を集約してきている。

神奈川拡大流域圏モデル²⁾は、東西方向は神奈川県横浜市から静岡県富士市に至る約100km、南北方向には相模湾、駿河湾の近海域から山梨県甲府市南に至る約60kmで、相模川流域、丹沢山地、金目川流域など周辺流域を含む総面積約5,700km²を対象地域としたものである。

図2の流線は、地上に降った雨が、地盤中を浸透し地下水となって、再び地上へ湧出する間の3次元流动経路を2

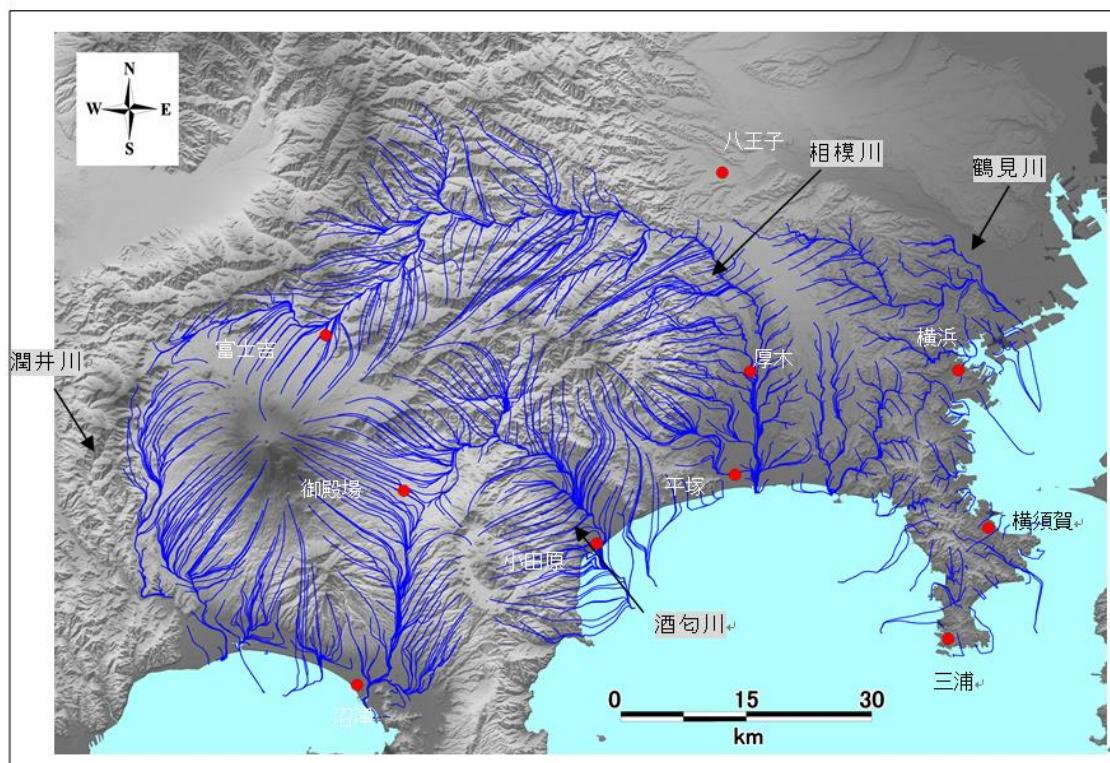


図2 神奈川拡大流域圏の地表・地下水流动経路

次元平面内に投影表示したものである。長い滞留時間をかけて地下深層へ浸透する経路、短い滞留時間で浅層中を移動する経路等が含まれている。

相模川を支える地下水の流動傾向は、西側と東側で流動経路長の特徴が異なり、大局的に西側は長く、東側は短い傾向が読み取れる。流動経路の長い西側の地下水流动は、そのほとんどが富士山麓、丹沢山地に端を発しており、神奈川県域の特徴的な水資源俯存傾向を視覚的に理解することができる。

地下水の流れは、地形起伏と調和的であるところと、地形から判断さ

れる流域外に流出している流線もある。低地へ流下する過程では、水脈が束ねられ、相模川、酒匂川、鶴見川等の主な河川を支えている様子が見て取れる。相模湾、駿河湾の一部では海域に至る流線がある。これは陸上部からの地下水が海底で湧き出していることを示し、森と海が水循環によるつながっていることを示している。

相模平野の風景を見ると、灌漑などのきめの細かな水利用による水田を中心とした農業と金目川水系の水とのかかわりの中で形成されている。川は水が流れているところだけで成り立っているのではなく、森や田畠と密接にかかわっている。

図3は秦野盆地の水循環シミュレーションの結果から、地表面下の地下水フラックスが上向きとなるエリアを湧出域として表示したものである。濃淡はその水量の多少を示し、濃色部は湧水量が多く、淡色部は少ない。図中に併記した地点名称は、名水百選として知られる主な秦野盆地湧水群である。これらの湧水群と計算上の地下水湧出域は良く対応しており、現地の流況をほぼ再現しているように思われる。ただし、まいまいの泉、震生湖の2地点は、計算上の湧出域となっていない。地域を良く知る方々からの話や公開情報によると、まいまいの泉は、地下水監視用の自噴井で地下20mの被圧水が湧き出したものであり、また震生湖は大正12年の関東大震災時に渋沢丘陵の一部が

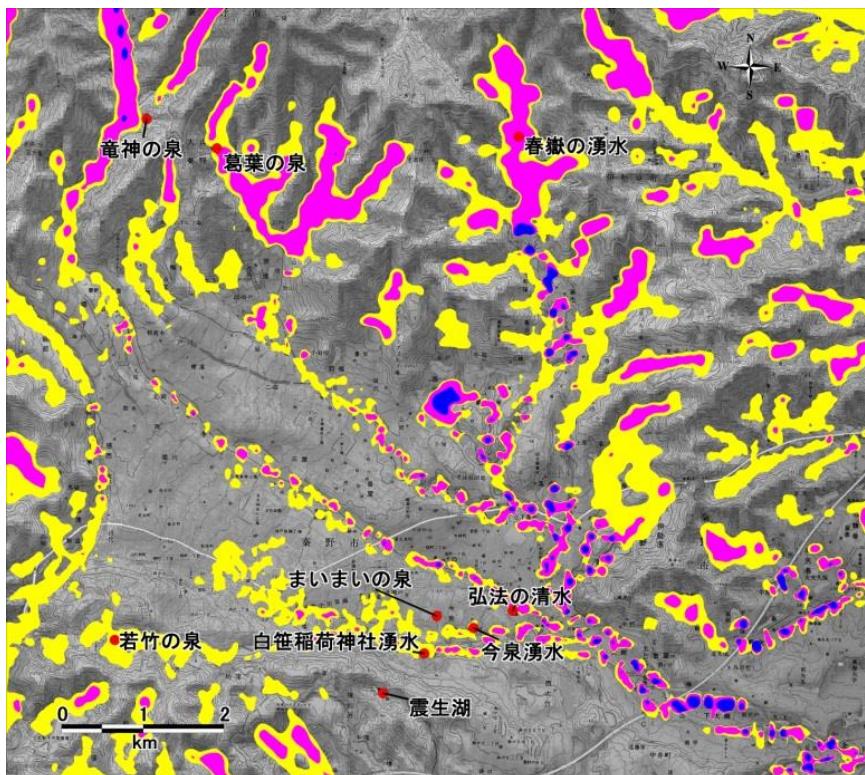


図3 秦野盆地の湧水分布

崩れ、谷川を埋めて形成された地震湖である。つまり、いずれもの地点も自然状態であればそもそも地下水が湧き出すような場所ではないことがわかった。

4. 水循環と水温

地表面から地下水までのベイドズゾーンと呼ばれる水と空気やガスが共存する通気領域は、土壤間隙中の水蒸気や熱輸送を含む様々な物質の相互干渉をうけ、複雑な環境を形成している。ベイドズゾーンは地上環境と地下飽和帯をつなぐ接続領域であり、水・空気置換流れ、毛管現象、孔隙内の気液相変化に加え、根圏での水分消費や微生物による分解、酸化還元反応などの多様な物理化学的プロセスを伴う生態系を支える重要な場としてとらえることができるものと考えられる。数値シミュレーションにより地表と地下の熱・物質輸送過程を定量化できれば、水・物質循環と生物多様性の関係を明らかにしていくうえで重要な成果になるものと思われる。

森ら³⁾は、ベイドズゾーンにおける熱・物質移動現象に着目し、陸面を通過する熱量や水蒸気等のフラックス変動を解析する数理モデルを開発し、様々な状態設定を想定した数値実験を行い、陸面フラックスとの相互関係について考察している。

水循環と温度を連成したシミュレーション結果の例を図5にしめす。

図5の上図は堅岩により構成された標準的な日本の山地を模した山体断面でのポテンシャル分布と流線の解析結果の例を示したものである。山地で涵養された降水が地下深部を通り河川に流出している様子が見て取れる。下図は温度分布を示したものである。地下水が湧出する河川部の水温は、地下深部に涵養された地下水が湧出するため水温が高くなる傾向があることが示されている。

5. 結語

人類は便利で快適な生活空間を獲得するために、自然を改変し利用してきた。特に産業革命以降エネルギーと機械力を手にすることにより大規模な自然改変がなされてきた。農業開発により食料を得、都市化することにより、人間活動を活性化させ、人、情報、文化、物流、エネルギーなど資源を都市化に集中させる機能が発達してきた。一方自然環境を支え生態系を支えているのは水循環である。大規模な人間活動は、水循環の構造を変えてしまう危険性があり、水循環の立場から自然環境との共生のための社会基盤のありかたという観点から自然を見守っていく必要がある。

水循環シミュレーションと生物の多様性の関係について掘り下げる研究が望まれる。

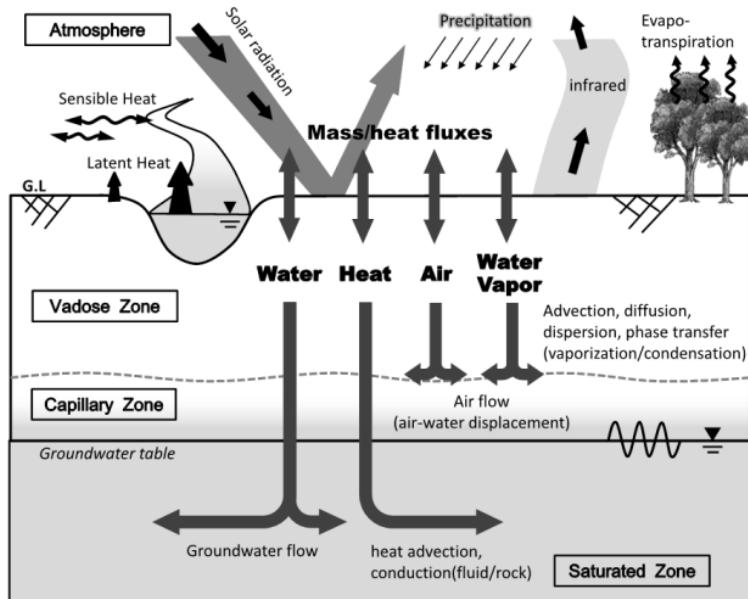


図4 ベイドズゾーンにおける熱・物質輸送過程の概念

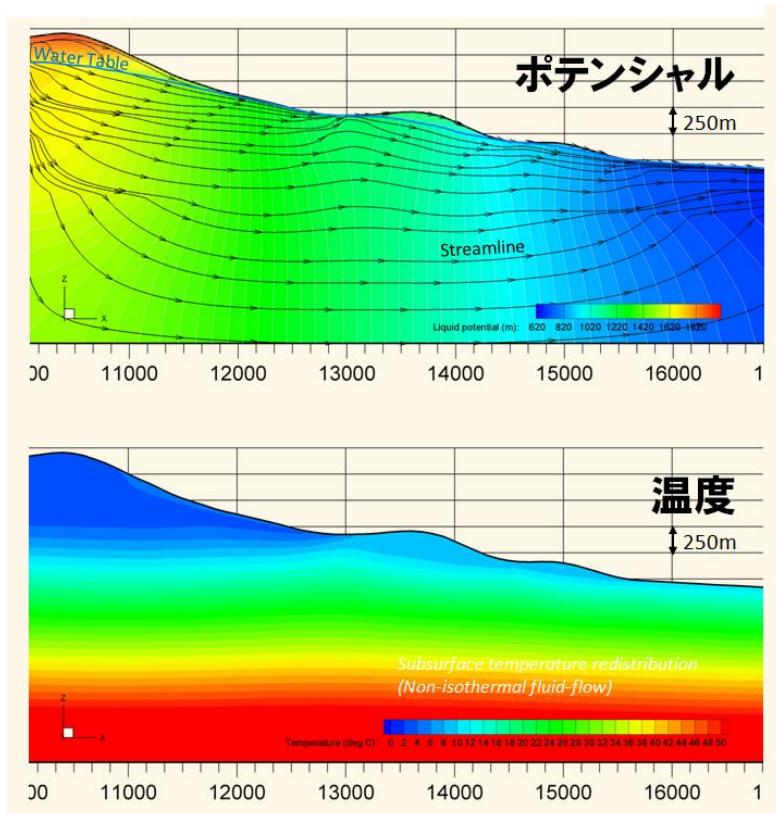


図5 地下水ポテンシャルと温度分布

参考資料

- 1) 登坂博行：地圈水循環の数理. 東京大学出版会(2006).
- 2) 森康司ほか：神奈川拡大流域圏における自然水循環挙動の復元可能性の検討. 日本地下水学会秋季大会(2008).
- 3) 森康司ほか：ベイドズゾーンにおける熱・物質循環過程と陸面フラックスの相互関係に関する数値的検討. 日本地下水学会春季大会(2014).

神奈川県内の河川水温の経年変化

石綿進一（神奈川工科大学/神奈川ウォーター・ネットワーク）

斎藤和久（相模湾海洋生物研究所）

高村岳樹（神奈川工科大学環境科学研究所）

河川水質のモニタリングは、水質汚濁防止法の規定に基づき、「公共用水域及び地下水の水質測定計画」として、河川などの公共用水域の水質の測定について、項目、地点などを定め実施されている。このモニタリングは、1回/月(2-4回/日)の調査で1974年以降、毎年実施されており、神奈川県下の河川では27河川(87地点)について定点測定が義務付けられている(図1)。ここでは、各調査地点における水温データ¹⁾について、各年度における河川水温の平均値、分散(最高水温、最低水温)及び平均値の回帰直線(表1)を求め、地点ごとに図示した(図2)。

文献

- 1) 神奈川県(2013) 平成22年度神奈川県公共用水域及び地下水の水質測定計画 Online. Available from internet:
<http://www.pref.kanagawa.jp/uploaded/attachment/62472.pdf#search=%E7%A5%9E%E5%A5%88%E5%B7%9D%E7%9C%8C+E6%B8%AC%E5%AE%9A%E8%A8%88%E7%94%BB>(downloaded on 2014.6.30).



図1 神奈川県下の河川及び地点(定点)番号

図中の番号は表1及び図2の地点番号に対応。図は神奈川県¹⁾より引用

表1 河川水温の平均値の回帰式

河川名	支川名	地点番号及び地点名	回帰式	河川名	支川名	地点番号及び地点名	回帰式
多摩川		1 多摩川原橋	$y=0.0831x+15.895$	引地川		45 福田橋	$y=-0.0107x+16.814$
		2 多摩水道橋	$y=0.062x+16.136$			46 下土棚大橋	$y=0.0392x+16.761$
		3 二子橋	$y=0.0555x+16.16$			47 石川橋	$y=0.0283x+16.945$
		4 田園調布取水堰	$y=0.0536x+16.27$			48 富士見橋	$y=0.0239x+17.102$
	5 六郷橋	5 六郷橋	$y=0.0559x+16.5$		相模川	49 小倉橋	$y=0.0309x+13.355$
		6 大師橋	$y=0.0475x+16.731$			50 昭和橋	$y=0.0299x+13.881$
	三沢川	7 一の橋	$y=0.0135x+16.153$			51 相模大橋	$y=0.0291x+14.672$
	二ヶ領本川	8 堤前橋	$y=0.0591x+16.598$			52 寒川取水堰	$y=0.0198x+15.166$
	平瀬川	9 平瀬橋(人道橋)	$y=0.0222x+16.267$			53 馬入橋	$y=0.0178x+16.877$
鶴見川		10 千代橋	$y=0.0749x+15.662$	金目川	道志川	54 両国橋	$y=0.0169x+11.686$
		11 亀の子橋	$y=0.1051x+15.878$		道志川	55 弁天橋	$y=0.0187x+13.412$
		12 大綱橋	$y=0.117x+15.868$		鳩川	56 馬船橋	$y=-0.0205x+16.874$
		13 末吉橋	$y=0.0935x+16.29$		中津川	57 第1鮎津橋	$y=0.0406x+14.242$
		14 臨港鶴見川橋	$y=0.0706x+16.82$		小鮎川	58 第2鮎津橋	$y=0.0275x+14.871$
	恩田川	15 都橋	$y=0.0888x+16.158$		玉川	59 相川水位観測所	$y=0.0342x+15.231$
	大熊川	16 大竹橋	$y=-0.0135x+17.222$		永池川	60 新竹沢橋	$y=0.0232x+15.391$
	鳥山川	17 又口橋	$y=-0.0001x+15.935$		目久尻川	61 河原橋	$y=0.0011x+16.884$
	早瀬川	18 峯大橋	$y=0.0156x+16.295$		小出川	62 宮の下橋	$y=0.0125x+16.832$
	矢上川	19 矢上川橋	$y=0.11x+16.188$		63 小田急鉄橋	$y=0.0568x+15.182$	
	麻生川	20 耕地橋	$y=0.1357x+19.986$		64 花水橋	$y=0.0402x+15.968$	
	真福寺川	21 水車橋前	$y=16.243$		鈴川	65 下之宮橋	$y=0.0692x+15.486$
	入江川	22 入江橋	$y=0.0703x+16.361$		渋田川	66 立堀橋	$y=0.0456x+15.622$
帷子川		23 水道橋	$y=0.0035x+16.439$		葛川	67 吉田橋	$y=0.0459x+15.666$
大岡川		24 清水橋	$y=0.0287x+16.219$		中村川	68 押切橋	$y=0.0098x+15.991$
宮川		25 瀬戸橋	$y=0.0165x+16.973$	森戸川	森戸川	69 万石橋	$y=-0.1321x+17.186$
侍従川		26 平潟橋	$y=0.0211x+16.55$		(小田原)	70 親木橋	$y=0.0077x+16.944$
鷹取川		27 追浜橋	$y=0.0303x+16.543$			71 県境	$y=0.0118x+14.609$
平作川		28 夫婦橋	$y=0.0609x+16.673$			72 峰下橋	$y=0.0146x+13.841$
松越川		29 竹川合流後	$y=0.0688x+16.033$			73 十文字橋	$y=0.0153x+14.341$
下山川		30 下山橋	$y=0.0212x+16.02$	酒匂川		74 報徳橋	$y=0.0167x+14.972$
森戸川		31 森戸橋	$y=0.0168x+16.41$			75 飯泉取水堰(上)	$y=0.0108x+15.837$
田越川		32 渚橋	$y=0.0116x+17.672$			76 酒匂橋	$y=0.0252x+16$
滑川		33 滑川橋	$y=0.0082x+16.608$		玄倉川	77 玄倉水位観測所	$y=-0.0335x+14.791$
神戸川		34 神戸橋	$y=-0.0117x+16.962$		河内川	78 湖流入前	$y=-0.0324x+15.406$
境川		35 常矢橋	$y=0.0307x+15.809$		落合発電所放流水	79 落合発電所	$y=0.0476x+12.55$
		36 鶴間橋	$y=0.0023x+17.002$		世附川	80 湖流入前	$y=-0.0545x+14.224$
		37 新道大橋	$y=0.0718x+16.892$		川音川	81 文久橋	$y=-0.0071x+15.067$
		38 高鎌橋	$y=0.0496x+16.851$		狩川	82 狩川橋	$y=-0.0073x+17.017$
		39 大道橋	$y=0.0772x+16.519$	山王川	山王川	83 山王橋	$y=-0.0121x+17.363$
	40 境川橋	40 境川橋	$y=0.0747x+16.582$		早川	84 会館橋	$y=0.011x+15.285$
		41 吉倉橋	$y=0.0149x+16.757$			85 早川橋	$y=0.0177x+15.351$
	42 鷹匠橋	42 鷹匠橋	$y=0.0798x+17.343$	新崎川	新崎川	86 吉浜橋	$y=0.017x+14.856$
		43 川名橋	$y=0.0856x+16.655$		千歳川	87 千歳橋	$y=-0.0065x+16.119$
	いたち川	44 いたち川橋	$y=0.0668x+18.202$				

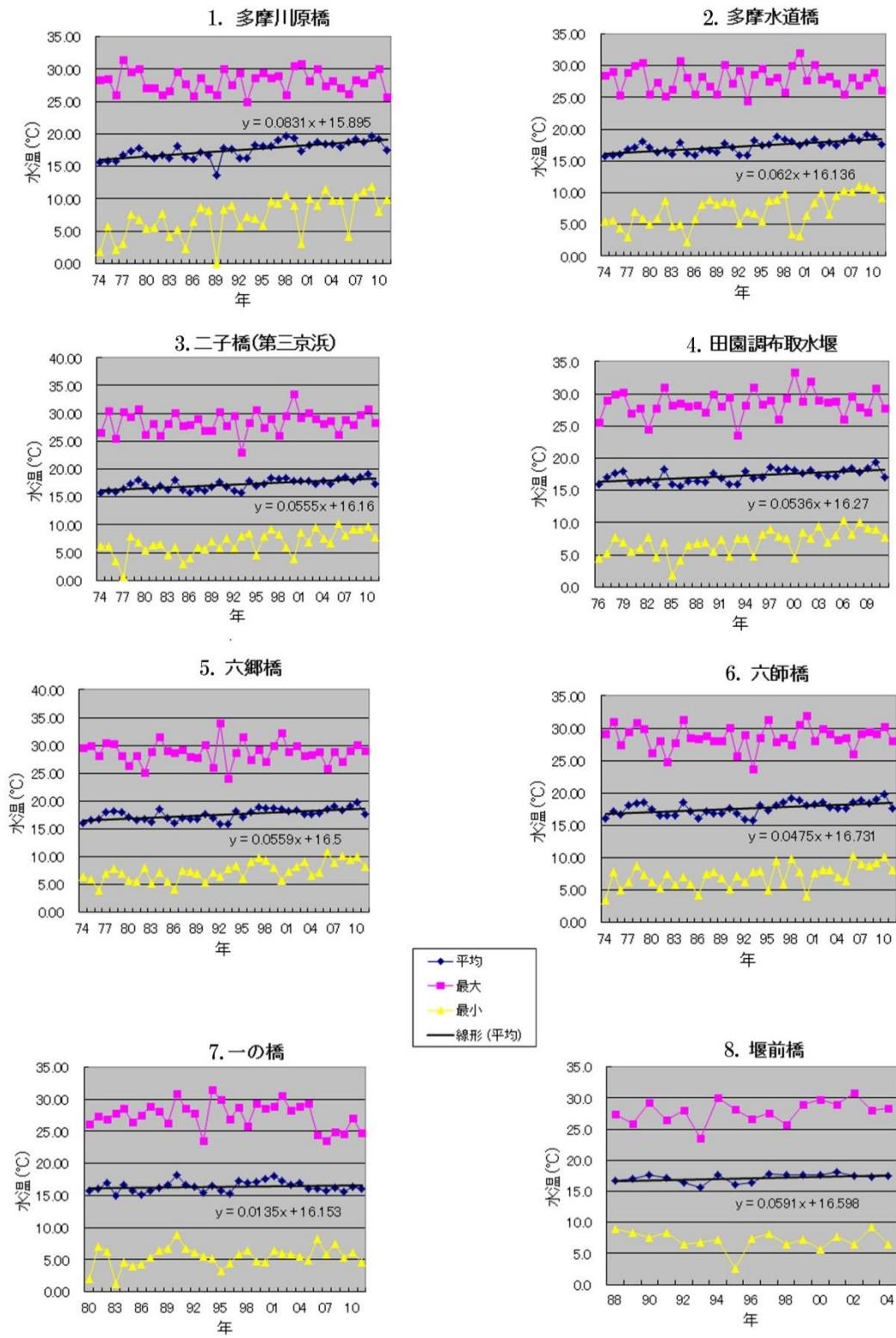


図2-1 河川水温の経年変化（多摩川）
上：最高、中：平均（線は回帰直線、式は回帰式）、下：最低

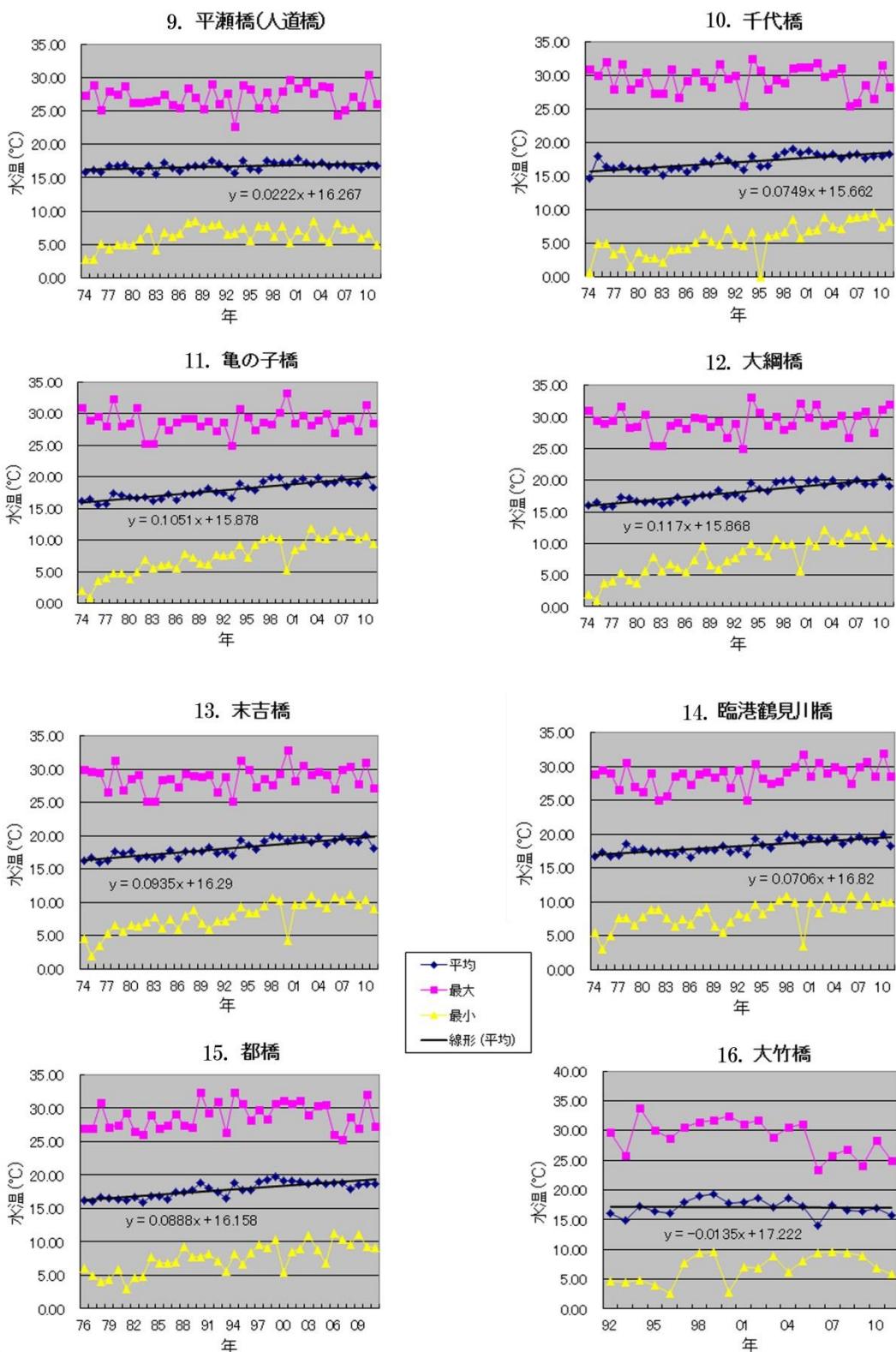


図2-2 河川水温の経年変化 (多摩川・鶴見川)
上：最高、中：平均（線は回帰直線、式は回帰式）、下：最低

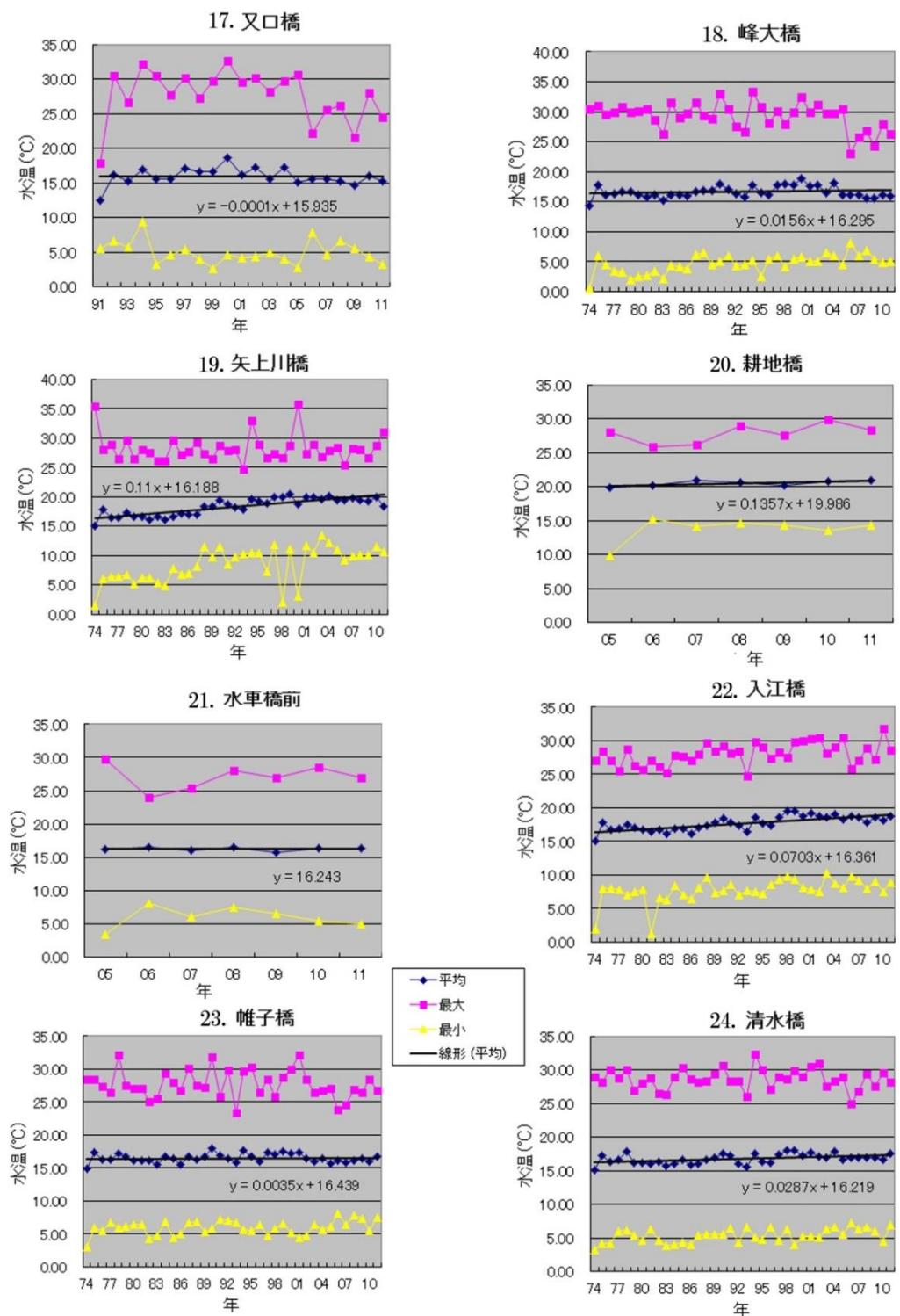


図 2-3 河川水温の経年変化 (鶴見川・帷子川・大岡川)

上：最高、中：平均（線は回帰直線、式は回帰式）、下：最低

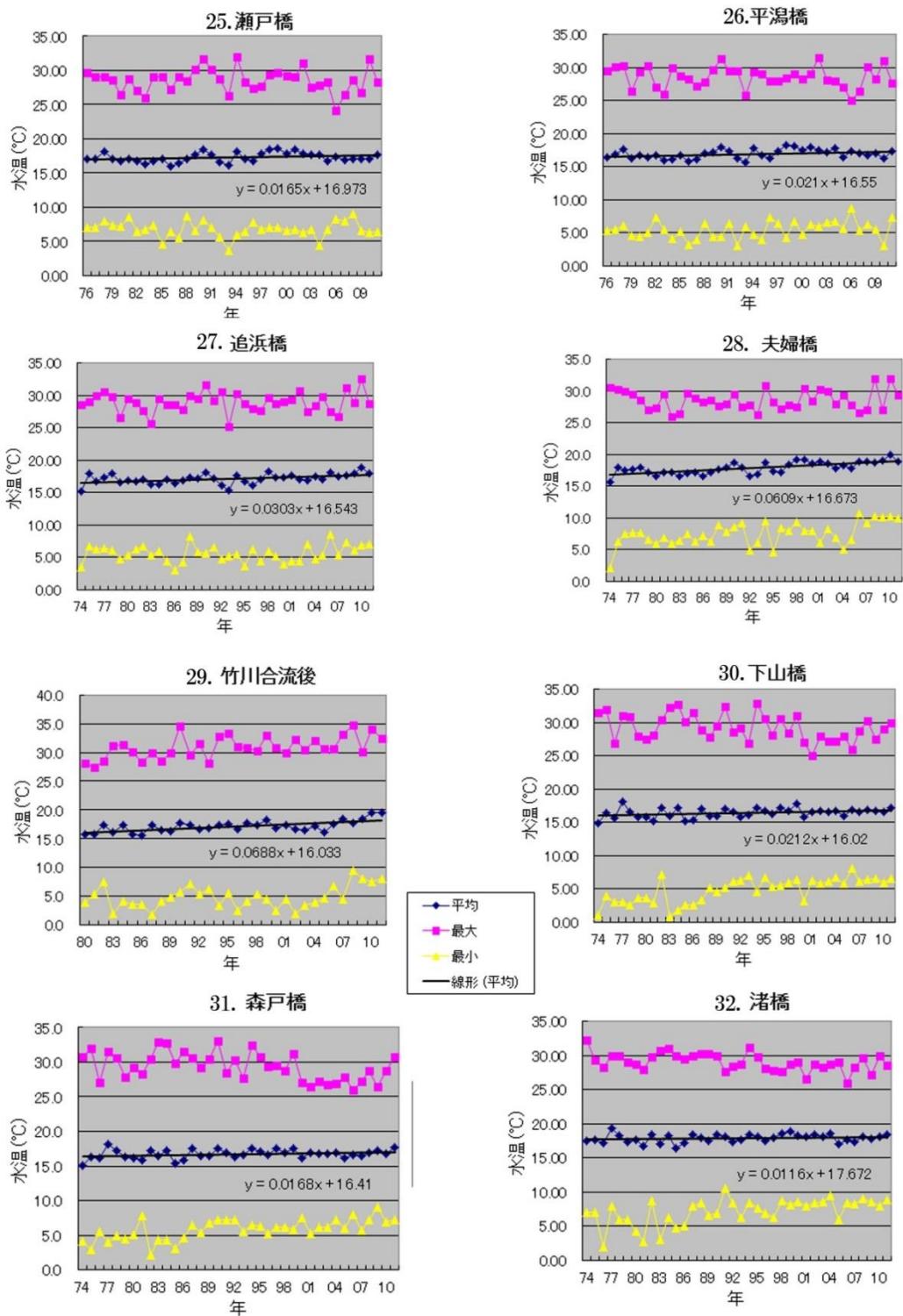


図2-4 河川水温の経年変化
(宮川・侍従川・鷹取川・平作川・松越川・下山川・森戸川・田越川)
上：最高、中：平均（線は回帰直線、式は回帰式）、下：最低

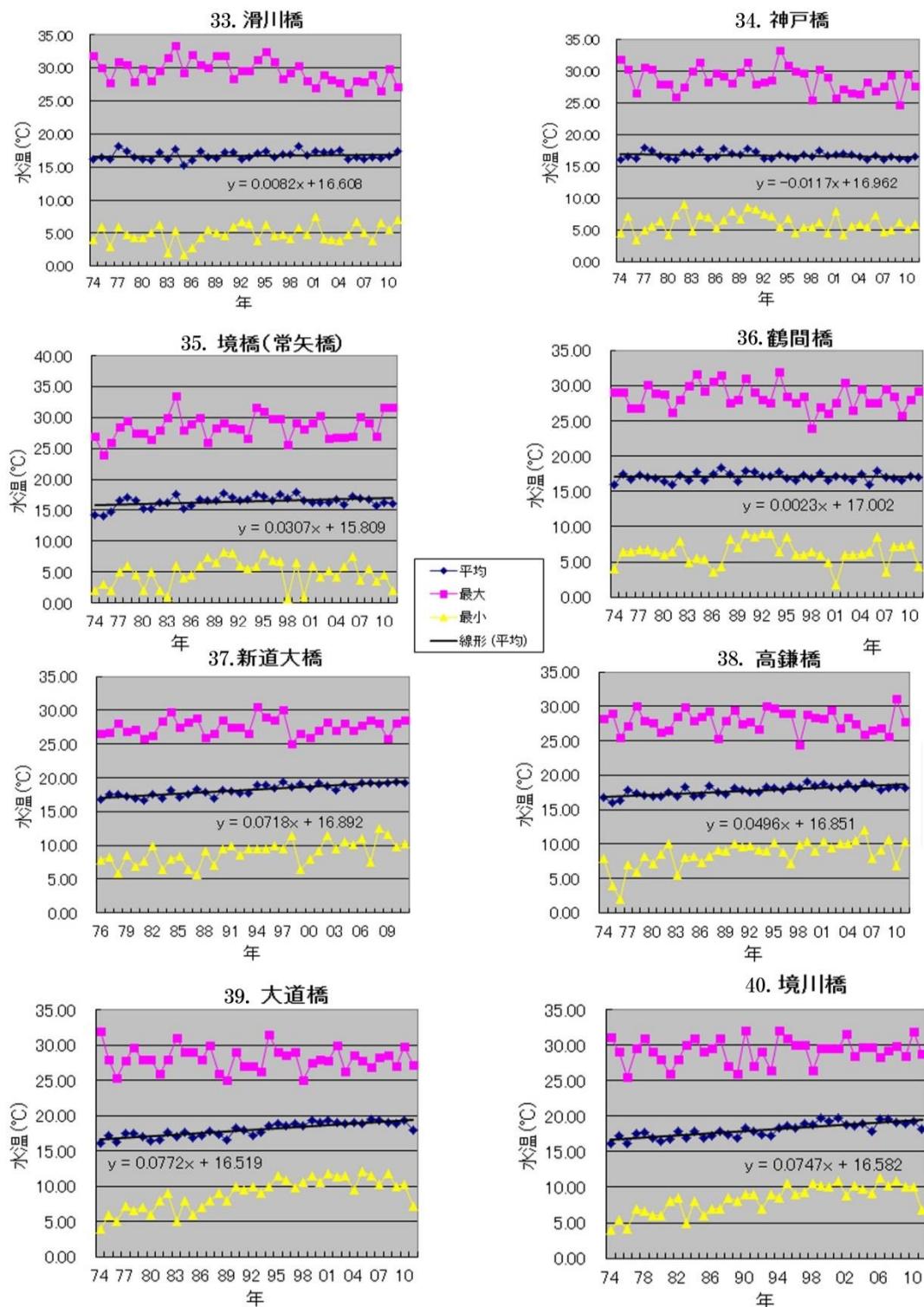


図2-5 河川水温の経年変化

(滑川・神戸川・境川)

上：最高、中：平均（線は回帰直線、式は回帰式）、下：最低

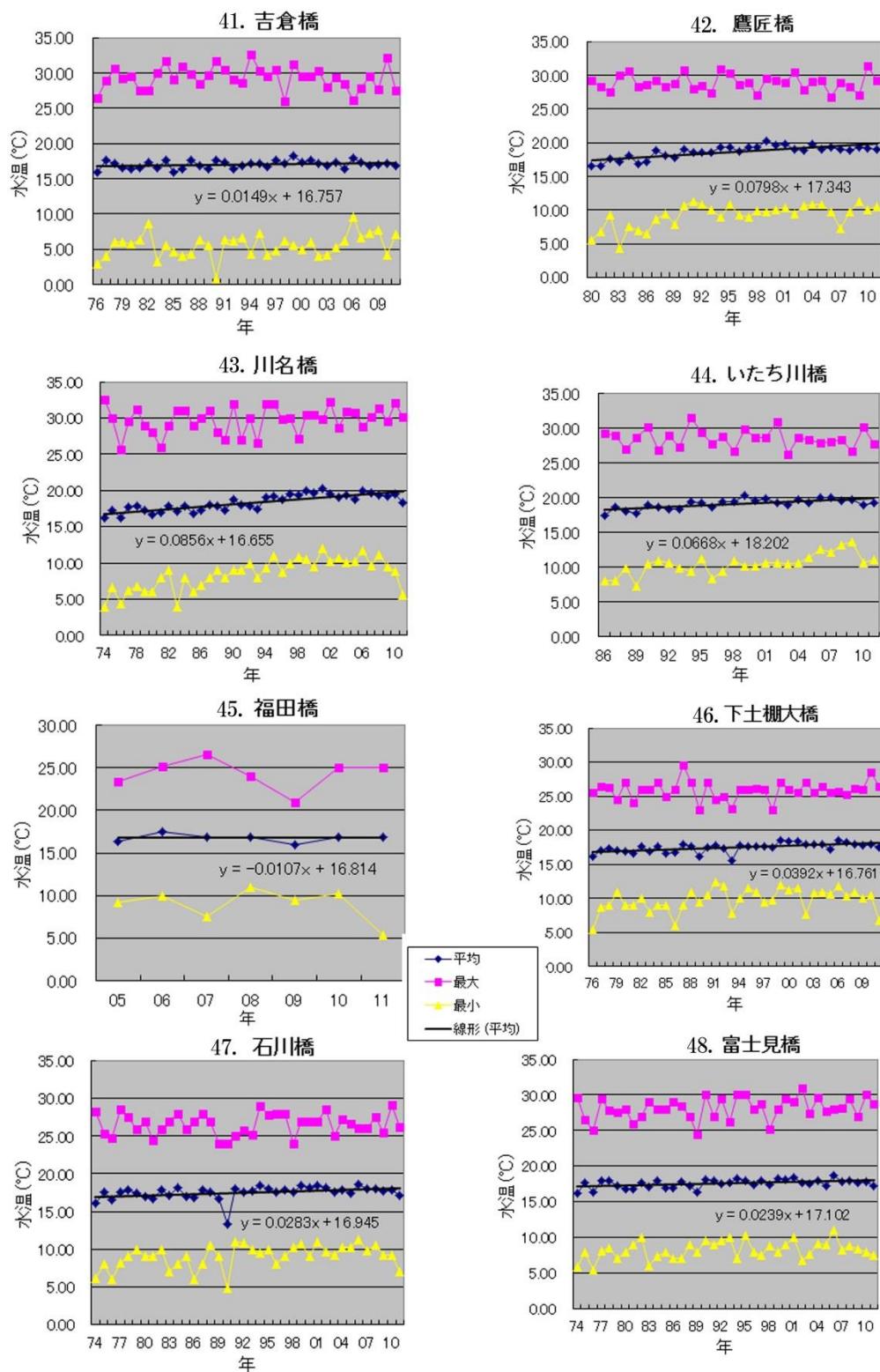


図2-6 河川水温の経年変化 (境川・引地川)
上：最高、中：平均（線は回帰直線、式は回帰式）、下：最低

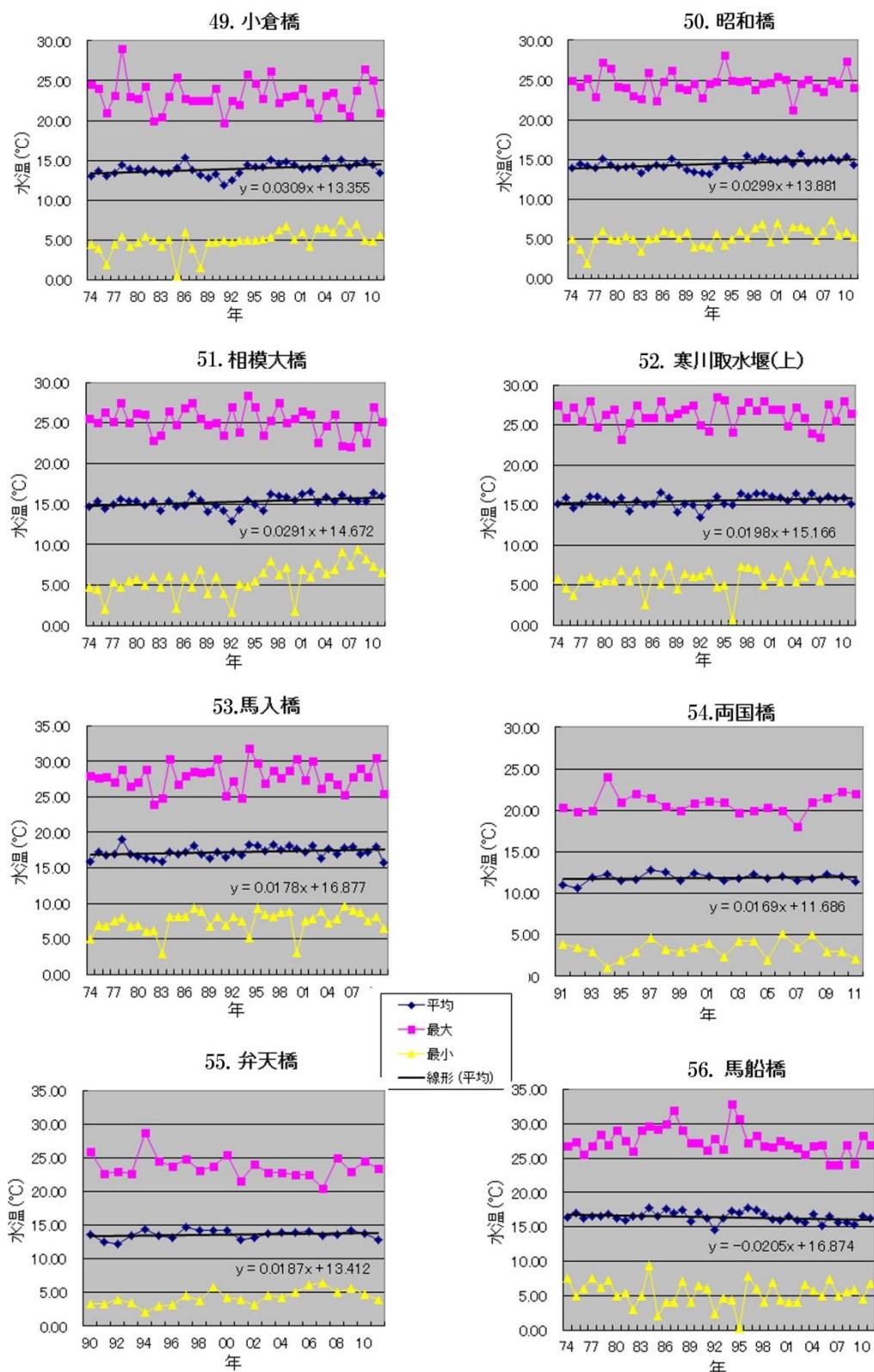


図2-7 河川水温の経年変化 (相模川)
上：最高、中：平均（線は回帰直線、式は回帰式）、下：最低

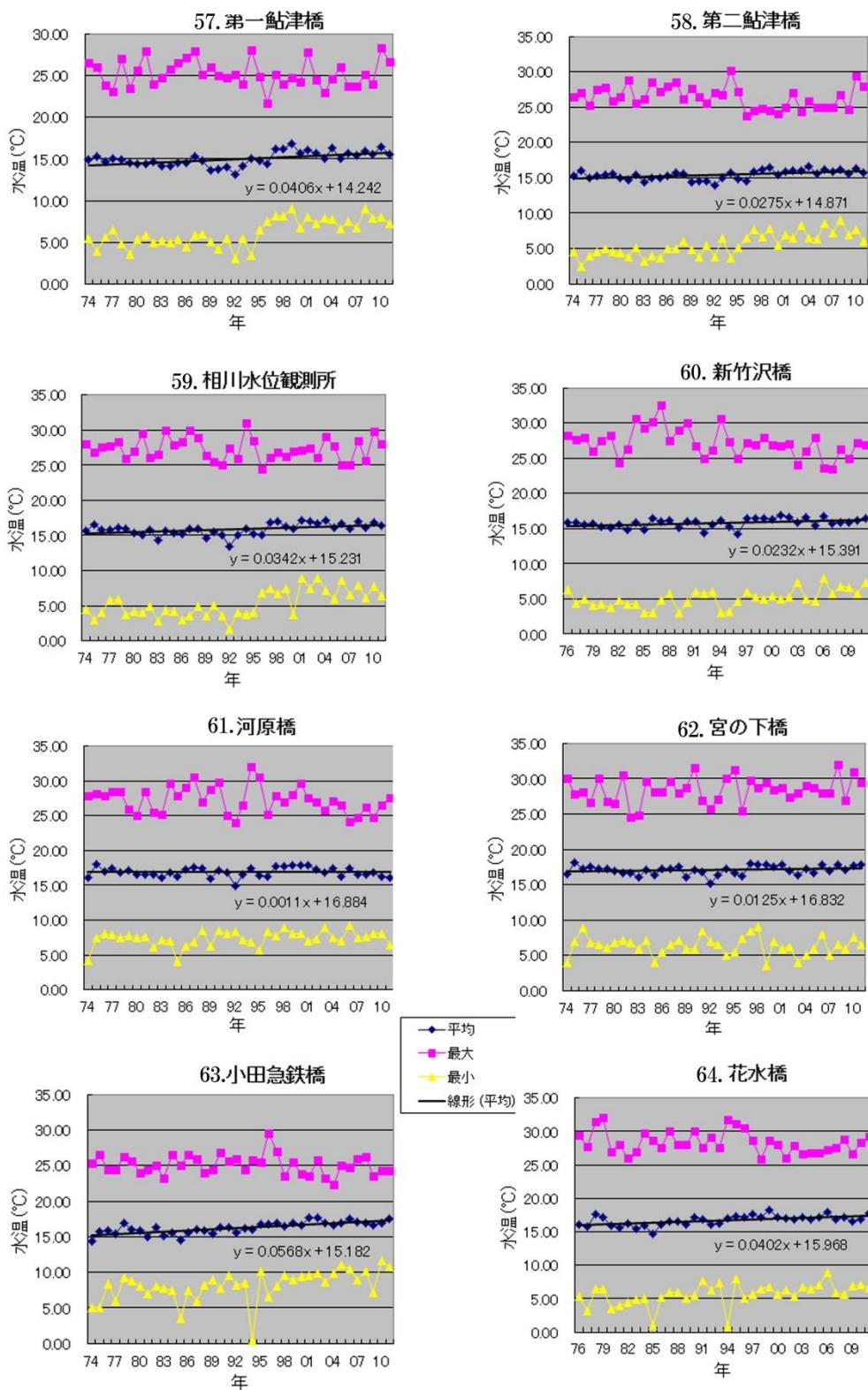


図 2-8 河川水温の経年変化（相模川・金目川）
上：最高、中：平均（線は回帰直線、式は回帰式）、下：最低

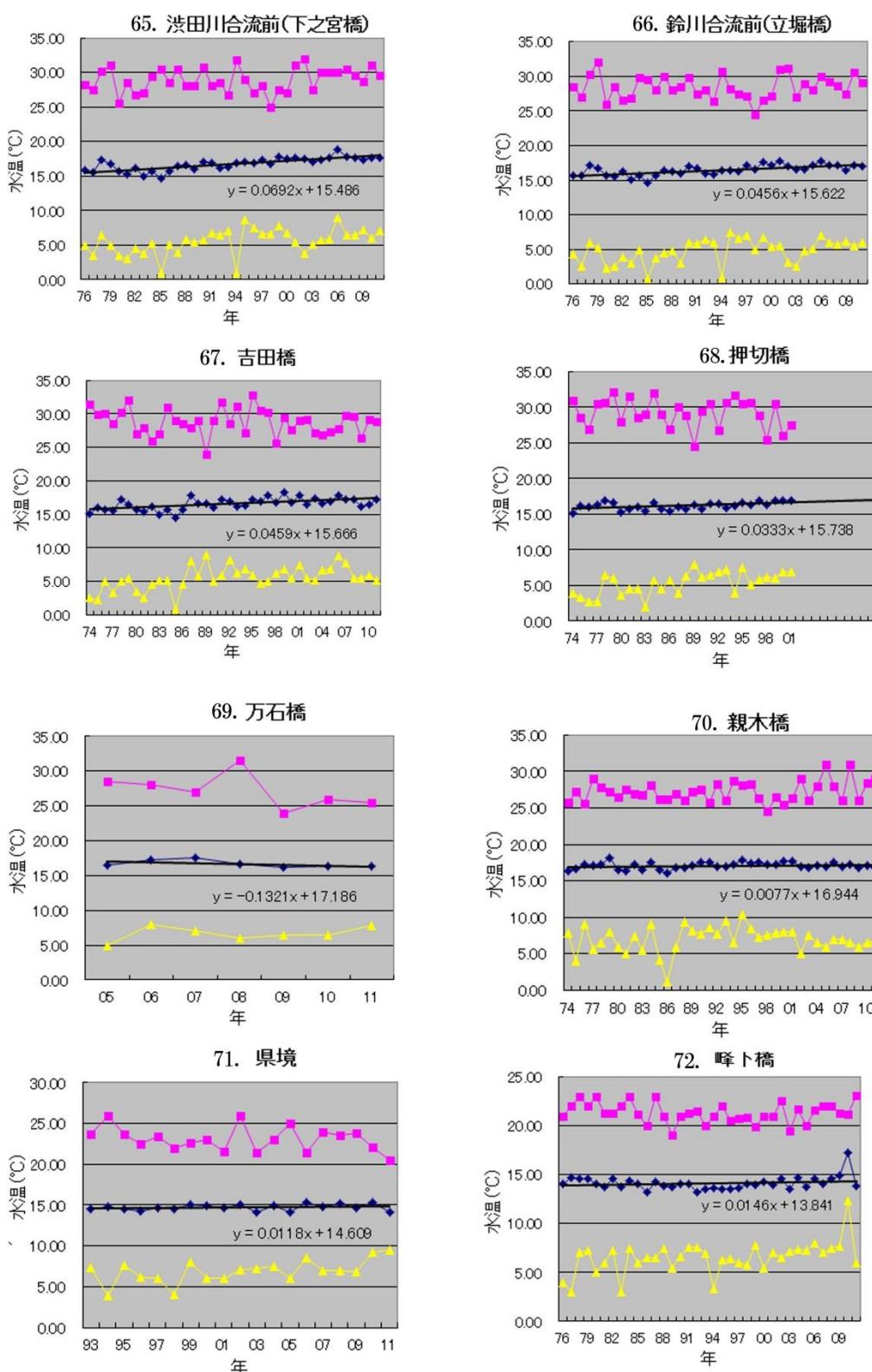


図2-9 河川水温の経年変化 (金目川・葛川・中村川・森戸川・酒匂川)

上：最高、中：平均（線は回帰直線、式は回帰式）、下：最低

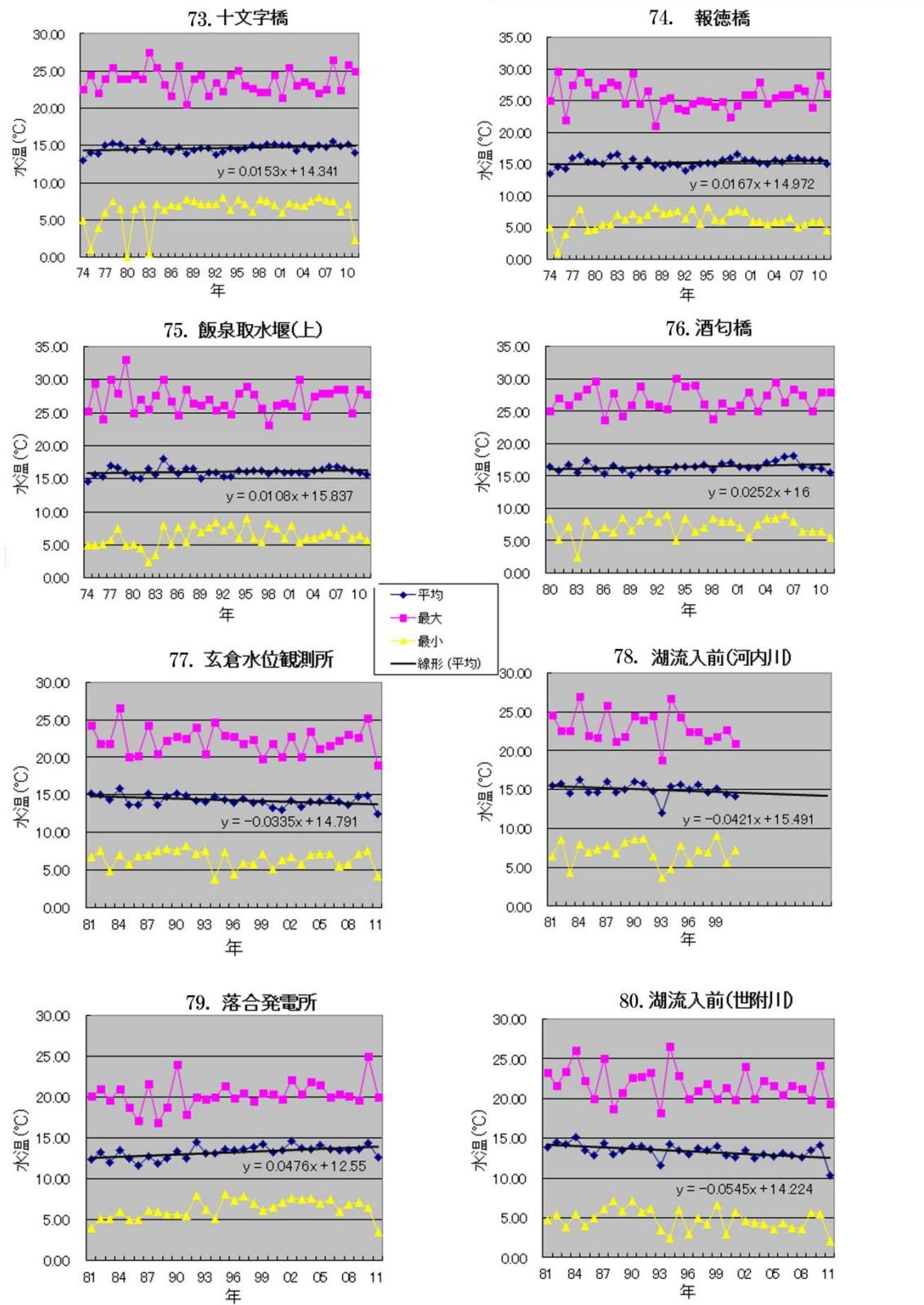


図 2-10 河川水温の経年変化 (酒勾川)
上：最高、中：平均（線は回帰直線、式は回帰式）、下：最低

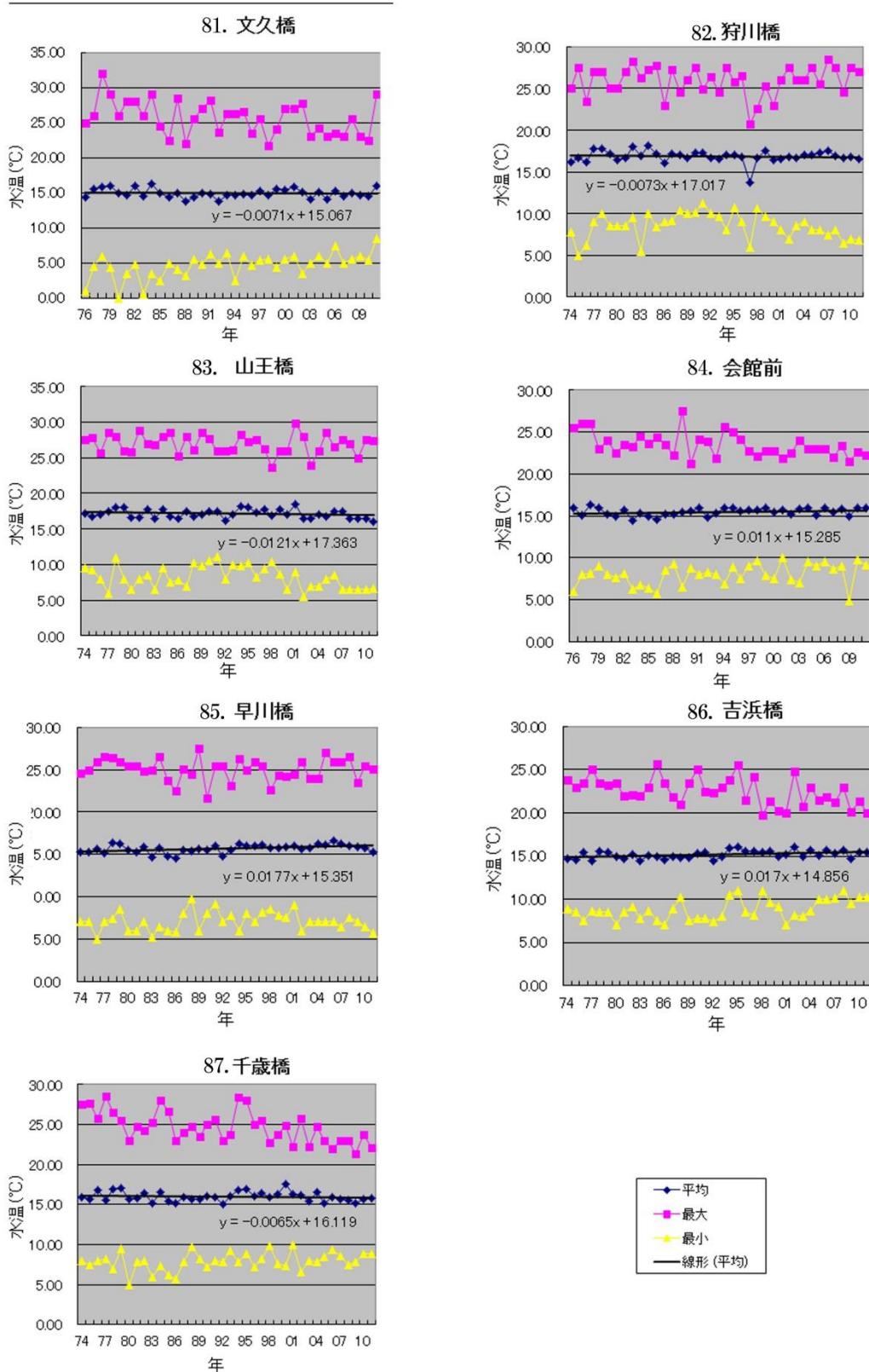


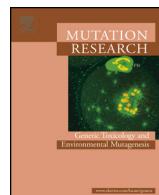
図2-11 河川水温の経年変化 (酒匂川・山王川・早川・新崎川・千歳川)
上:最高、中:平均(線は回帰直線、式は回帰式)、下:最低

学外発表論文等



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/gentoxCommunity address: www.elsevier.com/locate/mutres

Translesion DNA synthesis across various DNA adducts produced by 3-nitrobenzanthrone in *Escherichia coli*

Masanobu Kawanishi^a, Takaharu Kanno^{a,1}, Hiroshi Nishida^{a,2}, Tekeji Takamura-Enya^b, Takashi Yagi^{a,c,*}

^a Graduate School of Science and Radiation Research Center, Osaka Prefecture University, 1-2 Gakuen-cho, Sakai, Osaka 599-8570, Japan

^b Department of Applied Chemistry, Kanagawa Institute of Technology, 1030 Shimo-ogino, Atsugi, Kanagawa 243-0292, Japan

^c Department of Life Science, Dongguk University Seoul, 26, 3 Pil-dong, Jung-gu, Seoul 100-715, Republic of Korea

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 January 2013

Received in revised form 23 March 2013

Accepted 2 April 2013

Available online 9 April 2013

Keywords:

3-Nitrobenzanthrone

Site-specific modified plasmid

DNA adducts

Translesion DNA synthesis

ABSTRACT

To analyze translesion DNA synthesis (TLS) across lesions derived from the air pollutant 3-nitrobenzanthrone in *Escherichia coli*, we constructed site-specifically modified plasmids containing single molecule adducts derived from 3-nitrobenzanthrone. For this experiment, we adopted a modified version of the method developed by Fuchs et al. [29]. Each plasmid contained one of the following lesions in its *LacZ* gene: *N*-(2'-deoxyguanosin-8-yl)-3-aminobenzanthrone (dG-C8-N-ABA); 2-(2'-deoxyguanosin-*N*²-yl)-3-aminobenzanthrone (dG-*N*²-C2-ABA); 2-(2'-deoxyguanosin-8-yl)-3-aminobenzanthrone (dG-C8-C2-ABA); 2-(2'-deoxyadenosin-*N*⁶-yl)-3-aminobenzanthrone (dA-*N*⁶-C2-ABA); *N*-(2'-deoxyguanosin-8-yl)-3-acetylaminobenzanthrone (dG-C8-N-AcABA); or 2-(2'-deoxyguanosin-8-yl)-3-acetylaminobenzanthrone (dG-C8-C2-AcABA). All of the adducts inhibited DNA synthesis by replicative DNA polymerases in *E. coli*; however, the extent of the inhibition varied among the adducts. All five dG-adducts strongly blocked replication by replicative DNA polymerases; however, the dA-adduct only weakly blocked DNA replication. The induction of the SOS response increased the frequency of TLS, which was higher for the dG-C8-C2-ABA, dG-C8-N-AcABA and dG-C8-C2-AcABA adducts than for the other adducts. In our previous study, dG-C8-N-ABA blocked DNA replication more strongly and induced mutations more frequently than dG-*N*²-C2-ABA in human cells. In contrast, in *E. coli* the frequency of TLS over dG-*N*²-C2-ABA was markedly reduced, even under the SOS⁺ conditions, and dG-*N*²-C2-ABA induced G to T mutations. All of the other adducts were bypassed in a less mutagenic manner. In addition, using *E. coli* strains that lacked particular DNA polymerases we found that DNA polymerase V was responsible for TLS over dG-C8-N-AcABA and dG-C8-C2-AcABA adducts.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

3-Nitrobenzanthrone (3-NBA, 3-nitro-7H-benz[de]anthracen-7-one, CAS#: 17117-34-9, Fig. 1) is a mutagenic nitrated polycyclic aromatic hydrocarbon (nitro-PAH) that is found in diesel exhaust fumes and airborne particles [1]. 3-NBA has also been found in domestic coal-burning-derived particulates, surface soil and rainwater, presumably due to atmospheric washout [2–6]. In addition, 3-aminobenzanthrone (3-ABA), a metabolite of 3-NBA, has been detected in the urine of underground salt mine workers, who are occupationally exposed to diesel emissions [7].

In the Ames *Salmonella typhimurium* (TA98) assay, 3-NBA was demonstrated to display similar mutagenicity to 1,8-dinitropyrene, which is the strongest mutagen reported so far [1]. 3-NBA also induces micronucleus formation in mouse peripheral blood reticulocytes, human B-lymphoblastoid cells and human hepatoma cells [1,8–12] and exhibits DNA strand-breaking activity in human B-lymphoblastoid, hepatoma and lung cells [8,10,12,13]. Furthermore, 3-NBA has mutagenic effects on the *hprt* and *tk* loci in human

Abbreviations: 3-NBA, 3-nitrobenzanthrone; ABA, aminobenzanthrone; dA-*N*⁶-C2-ABA, 2-(2'-deoxyadenosin-*N*⁶-yl)-3-aminobenzanthrone; dG-C8-C2-ABA, 2-(2'-deoxyguanosin-8-yl)-3-aminobenzanthrone; dG-C8-C2-AcABA, 2-(2'-deoxyguanosin-8-yl)-3-acetylaminobenzanthrone; dG-C8-N-ABA, *N*-(2'-deoxyguanosin-8-yl)-3-aminobenzanthrone; dG-C8-N-AcABA, *N*-(2'-deoxyguanosin-8-yl)-3-acetylaminobenzanthrone; dG-*N*²-C2-ABA, 2-(2'-deoxyguanosin-*N*²-yl)-3-aminobenzanthrone; DISL, damage-induced strand loss; N-Aco-ABA, *N*-Acetoxy-3-aminobenzanthrone; *N*-Aco-*N*-Ac-ABA, *N*-acetoxy-*N*-acetyl-3-aminobenzanthrone; NER, nucleotide excision repair; TLS, translesion DNA synthesis; AF, 2-aminofluorene; AAF, 2-acetylaminofluorene; dG-C8-N-AF, *N*-(2'-deoxyguanosin-8-yl)-2-aminofluorene; dG-C8-N-AAF, *N*-(2'-deoxyguanosin-8-yl)-2-acetylaminofluorene.

* Corresponding author at: Graduate School of Science and Radiation Research Center, Osaka Prefecture University, 1-2 Gakuen-cho, Sakai-city, Osaka 599-8570, Japan. Tel.: +81 072 254 9862; fax: +81 072 254 9938.

E-mail address: yagi-t@riast.osakafu-u.ac.jp (T. Yagi).

¹ Present address: Department of Cell and Molecular Biology, Karolinska Institute, Sweden.

² Present address: Shin Nippon Biomedical Laboratories, Ltd., Japan.

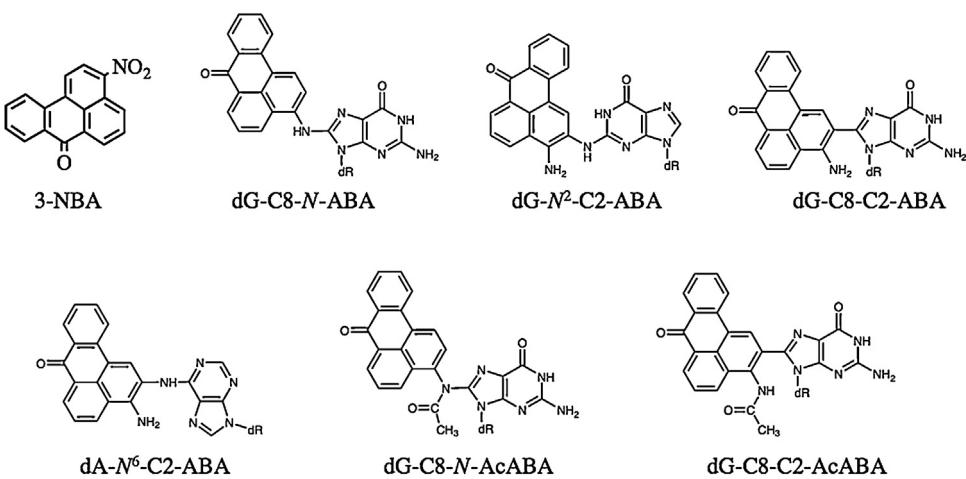


Fig. 1. Chemical structures of 3-NBA and its DNA adducts.

B-lymphoblastoid cells [9,12] and induces lung tumor formation in experimental animals [14]. Therefore, 3-NBA is regarded as an environmental risk factor for human lung cancer in urban areas [12].

The metabolic activation of nitro-PAH occurs through their *N*-reduction to form *N*-hydroxy arylamines, which can bind directly to DNA or undergo further activation by esterification to produce species that are highly reactive with DNA [15–18]. The reactive intermediates of 3-NBA, *N*-acetoxy-3-aminobenzanthrone (*N*-Aco-ABA) and *N*-acetoxy-*N*-acetyl-3-aminobenzanthrone (*N*-Aco-*N*-Ac-ABA), form adducts with the *N*² and C8 positions of guanine and the *N*⁶ position of adenine *in vitro* [6,19–26]. In mammalian cultured cells and rodents exposed to 3-NBA, 2-(2'-deoxyguanosin-8-yl)-3-aminobenzanthrone (dG-C8-N-ABA), 2-(2'-deoxyguanosin-*N*²-yl)-3-aminobenzanthrone (dG-*N*²-C2-ABA) and 2-(2'-deoxyadenosin-*N*⁶-yl)-3-aminobenzanthrone (dA-*N*⁶-C2-ABA) were identified as major adducts [6,20]. In our previous study using the LC/MS/MS, 3-NBA formed more dG-C8-N-ABA and dG-*N*²-C2-ABA than dA-*N*⁶-C2-ABA in human hepatoma HepG2 cells [21]. It has also been reported that reactions of the 3-NBA reactive metabolites to DNA in *vitro* yield 2-(2'-deoxyguanosin-8-yl)-3-aminobenzanthrone (dG-C8-C2-ABA), *N*-(2'-deoxyguanosin-8-yl)-3-acetylaminobenzanthrone (dG-C8-N-AcABA) and 2-(2'-deoxyguanosin-8-yl)-3-acetylaminobenzanthrone (dG-C8-C2-AcABA). These adducts were minor or have not been identified so far *in vivo* [20–26].

The nucleotide excision repair (NER) pathway is the major mechanism by which bulky PAH-DNA adducts are removed, and the efficiency of adduct removal depends on the chemical structures of the adducts involved [27]. In proliferating cells, residual adducts arrest progression at replication forks, induce the formation of replication gaps, and cause DNA strands to separate, which can lead to apoptosis [27]. Thus, cells perform translesion DNA synthesis (TLS) to prevent replication being blocked [27]. TLS is performed by low stringency DNA polymerases, each of which displays a different specificity for adducted DNA bases. In *Escherichia coli*, DNA polymerases II, IV and V (Pol II, Pol IV and Pol V), which are encoded by the polB, dinB and umuDc genes, respectively, are considered to play a major role in TLS, which is regulated by the SOS response [27]. These SOS-inducible TLS polymerases allow cells to cope with various DNA lesions; however, they frequently induce mutations at the lesion sites. Among the TLS polymerases, Pol V was found to be essential for TLS over base substitution mutations induced by UV light, and Pol II was demonstrated to be responsible for TLS over *N*-2-acetylaminofluorene (AAF)-induced -2 frameshift mutations [28].

Fuchs et al. developed a sophisticated method for analyzing cellular strategies for accommodating replication-hindering adducts in DNA [29]. To study the effects of single adducts on DNA replication, they constructed heteroduplex plasmid molecules containing a two-base insertion in one strand, which was located opposite the adduct site of the other strand. The insertion functioned as a strand marker, and the color of the colony carrying the progeny plasmids depended on the outcome of replication since the marker was located in the *LacZ* gene.

In this study, based on Fuchs' method we constructed site-specifically modified plasmids containing single molecule adducts derived from *N*-Aco-ABA or *N*-Aco-*N*-Ac-ABA. Each plasmid contained a single molecule of dG-C8-N-ABA, dG-*N*²-C2-ABA, dG-C8-C2-ABA, dA-*N*⁶-C2-ABA, dG-C8-N-AcABA or dG-C8-C2-AcABA in its *LacZ* gene (Fig. 1). To evaluate the efficiency of bypasses across these adducts, the mono-modified plasmids were introduced into and replicated in *E. coli*. Furthermore, to determine which polymerases were responsible for TLS over each adduct, the plasmids were also propagated in *E. coli* strains lacking one of the TLS polymerases.

2. Materials and methods

2.1. Materials

General chemicals, which were essentially of analytical grade, were purchased from Sigma-Aldrich, Japan (Tokyo, Japan). Acetic anhydride was obtained from Nacalai Tesque (Kyoto, Japan). Acetonitrile (MeCN) was purchased from Merck KGaA (Darmstadt, Germany). [γ -³²P]ATP (3000 Ci/mmol) was obtained from Amersham Biosciences Ltd. (Buckinghamshire, UK), and T4 polynucleotide kinase was purchased from Toyobo, Co., Ltd. (Osaka, Japan). Nuclease P1 was obtained from Yamasa Shuzo Co. (Chiba, Japan). Thirteen-mer deoxyoligonucleotides (HPLC grade) were purchased from Sigma-Aldrich, Japan. The restriction enzyme *Bgl*II and calf intestine alkaline phosphatase were obtained from New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA, USA).

2.2. Preparation of ABA adduct-containing oligonucleotides

N-Aco-ABA and *N*-Aco-*N*-Ac-ABA were synthesized as described previously [20,23]. Deoxyoligonucleotides with the sequences 5'-CCTTCCGTCTCCC and 5'-CCTTCCATCTCCC (the target positions for adduct formation are underlined) were reacted with *N*-Aco-ABA or *N*-Aco-*N*-Ac-ABA in limited conditions in order to favor the formation of mono-adducted species [20,21]. In brief, to modify the oligonucleotides with *N*-Aco-ABA, *N*-Aco-ABA solution (50 μ L) was mixed with 100 μ L of each oligonucleotide (1 nmol/ μ L in 1 mM Tris-HCl, pH 8.0), 10 mM sodium-citrate buffer (pH 7.0, 40 μ L) and H₂O (50 μ L). The resultant mixtures were incubated at 55 °C for 24 h in an argon atmosphere. Then, the *N*-Aco-ABA-modified oligonucleotides were purified using high performance liquid chromatography (HPLC; Agilent 1100 series HPLC system equipped with an Agilent G1315B photodiode array detector; Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). The oligonucleotide reaction mixtures were eluted at a flow rate of 1 mL/min for 60 min using the Cosmosil-AR II column (ϕ 4.6 mm × 250 mm, Nacalai Tesque) along a linear gradient

from 0% to 25% MeCN in 100 mM triethylamine acetate (TEAA, Sigma-Aldrich, Japan) (pH 7.0). Oligonucleotides containing the dG-C8-C2-ABA, dG-C8-N-ABA and dA-N⁶-ABA adducts were eluted at retention times of 37.6, 39.6 and 40.9 min, respectively. Oligonucleotides containing the dG-N²-C2-ABA adduct were prepared using the previously described procedure with slight modifications [24]. Briefly, the corresponding amidite without the O⁶-nitrobenzyl protective group, which was prepared by direct aryl amination, was used for oligonucleotide synthesis [25]. To modify the oligonucleotides with N-AcO-N-Ac-ABA, N-AcO-N-Ac-ABA solution (50 µL) was mixed with 50 µL of the oligonucleotide (5'-CCTTCGGTCTCCC, 1 nmol/µL, in TE buffer), 40 µL of 10 mM sodium citrate buffer (pH 7.0) and 60 µL of H₂O. Each mixture was incubated at 55 °C for 16 h under an argon atmosphere, before being washed with diethyl ether 3 times and separated using HPLC with a Shield RP18 5 µm column (φ4.6 mm × 250 mm; Waters Co., Milford, MA, USA) at a flow rate of 1 mL/min. The mixture was then eluted with isocratic 5% MeCN for 0–5 min, before being eluted along a linear gradient from 5% to 80% MeCN over 5–105 min in 100 mM triethylammonium acetate (TEAA; pH 7.0). In these conditions, 13-mer deoxyoligonucleotides containing single dG-C8-C2-AcABA or dG-C8-N-AcABA adducts were eluted at 21.2 min and 23.6 min, respectively. To confirm that the correct modifications had been induced, samples (10 µL) of the ABA adduct-containing oligonucleotides were digested to nucleotides. Each adducted oligodeoxynucleotide was digested to the nucleoside level with nuclease P1 (1 unit) and alkaline phosphatase (10 units) and then subjected to HPLC. The identification of each adduct was performed by comparing their UV spectra with those of chemically synthesized nucleoside standards, as described previously [19,20,23]. For further purification, these site-specifically modified 13-mer deoxyoligonucleotides were labeled with [γ -³²P]ATP and then separated by denaturing 20% polyacrylamide gel electrophoresis. The corresponding bands were cut out from the gel, and the modified oligonucleotides were eluted with 0.5 M sodium acetate (pH 8.5) buffer containing 1 mM EDTA. The modified oligonucleotides were precipitated with ethanol.

2.3. Construction of mono-modified plasmids

Site-directed modified plasmids were prepared by the previously described procedure with slight modifications [29]. In brief, the pUCNarH+15mer plasmid is identical to the pUCNarH plasmid [29] except that it contains a 15-mer oligonucleotide (5'-CCTTCAGATCTCCC) insert in its *HincII* site. The linear forms of the two parental plasmids were mixed in equal quantities, heat-denatured, and incubated at 55 °C in buffer (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA (pH 7)) to allow the formation of gapped-duplex structures. The crude gapped-duplex mixture was incubated at 16 °C with a 2-fold molar excess of a ³²P-labeled 13-mer oligonucleotide that was complementary to the gap except for a 2-nucleotide bulge that formed in the middle of the gap in the presence of ATP (1 mM) and T4 DNA ligase (New England Biolabs) for 3 min. As a negative control, we also constructed non-modified plasmids that possessed normal dG or dA bases instead of the adducts using the non-modified oligonucleotides. The covalently closed circle plasmids were purified by equilibrium centrifugation along a CsCl gradient.

2.4. Bacterial strains and SOS induction

The *E. coli* strains used in this study were derivatives of the MGZ strain constructed by Napolitano et al. [28]. The null allele of *uvrA6* was introduced into MGZ strain chromosomes lacking one of the TLS polymerases (*polB*, *dinB* or *umuD*) using the standard P1 transduction method. To induce the SOS response, exponentially growing bacteria in MgSO₄ (10 mM) solution were treated with UV irradiation at a dose of 5 J/m². After the irradiation but prior to the transformation, the cells were incubated in lysogeny broth (LB) under aerated conditions for 30 min at 37 °C in order to allow the SOS response to occur.

2.5. TLS assay in *E. coli*

Each plasmid (1 ng) was introduced into *E. coli* using an electroporation apparatus (Gene Pulser; BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA). The *E. coli* were plated onto LB agar plates containing ampicillin, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside (X-gal) and isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG). As shown in Fig. 2A, in this system if the ABA-modified strand is used as a replication template (i.e., TLS occurs), the progeny plasmids will possess functional *lacZ* gene reading frames, and hence, their colonies will be tinged blue. When the opposite strand is used as a replication template (i.e., damage-induced strand loss occurs; DISL), the progeny plasmids will possess dysfunctional *lacZ* gene reading frames; thus, their colonies will appear white. If TLS causes a frameshift during replication, the *LacZ* reading frame becomes dysfunctional, which also results in white colonies. However, frameshifts can be distinguished from DISL because the complementary strand of the adducted strand contains a recognition sequence for the restriction enzyme *BglII*. In the present study, portion of the progeny plasmids displayed frameshifts was low enough to be considered negligible (less than 1%, data not shown). Therefore, blue colonies were considered to have been caused by TLS, while white colonies were

considered to have been produced by DISL. Thus, the TLS frequency was calculated using the following equation:

$$\text{TLS frequency (\%)} = \left\{ \frac{\text{Number of blue colonies}}{\text{Total number of colonies}} \right\} \times 100.$$

We counted more than 30 thousand colonies for each adduct. The relative TLS frequency value was calculated as the ratio (%) of the TLS frequency of the modified plasmid to that of the non-modified plasmid; i.e.,

$$\text{Relative TLS frequency value (\%)} = \left\{ \frac{\text{TLS frequency of ABA modified plasmid}}{\text{TLS frequency of unmodified control plasmid}} \right\} \times 100.$$

In order to determine which TLS polymerases were responsible for the replication of the adducts (dG-N²-C2-ABA, dG-C8-C2-ABA, dG-C8-N-AcABA and dG-C8-C2-AcABA), statistical comparisons between the results obtained in the SOS[−] and SOS⁺ conditions were carried out using the Student's *t*-test for one-tailed comparisons. The plasmids in which TLS occurred were purified from the blue bacteria cultured in 2 mL of LB medium and sequenced with the ABI 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) to identify any mutations. The blue bacteria contain progeny plasmids from both the adducted strand and its complementary strand. Therefore, identification of a nucleotide sequence of progeny plasmid from the adducted strand was carried out after subtraction of the fluorescence of the other strand that had a two-base insertion. When the fluorescence of the progeny plasmids from the adducted strand was feeble, the isolation of the plasmid was performed by retransformation of *E. coli* before sequencing.

3. Results

3.1. TLS analysis

Using the site-directed mono-modified plasmids (Fig. 2A), we analyzed TLS across the adducts in *E. coli*. To prevent the adducts being excised, we used NER-deficient *E. coli* strains (*uvrA*[−]) in every experiment. In *E. coli*, the replicative DNA polymerases Pol I and Pol III replicate DNA in SOS[−] conditions, whereas TLS polymerases such as Pol II, Pol IV and Pol V participate in DNA replication in SOS⁺ conditions. The relative frequencies of TLS across the adducts in *E. coli* (MGZuvrA[−] strain, which does not lack any TLS polymerases) under the SOS^{+/−} conditions are shown in Fig. 2B. In the SOS[−] conditions, the relative frequencies of TLS across the dG-C8-N-ABA, dG-N²-C2-ABA, dG-C8-C2-ABA, dG-C8-N-AcABA and dG-C8-C2-AcABA adducts were 12.8%, 2.2%, 0.23%, 0.28% and 0.25%, respectively. Meanwhile, the relative frequency of TLS across the dA-N⁶-C2-ABA adduct in the SOS[−] conditions was 68%, which indicates that all of the adducts inhibited DNA replication by replicative DNA polymerases; however, the extent of the inhibition varied among the adducts. All five dG adducts strongly blocked replication by the replicative DNA polymerases; however, the dA adduct only weakly blocked replication. Among the dG adducts, the dG-C8-N-ABA adduct blocked DNA replication by replicative DNA polymerases less strongly than the other dG adducts. After SOS induction, the relative frequencies of TLS across the dG-C8-N-ABA, dG-N²-C2-ABA, dG-C8-C2-ABA dG-C8-N-AcABA, dG-C8-C2-AcABA and dA-N⁶-C2-ABA adducts increased to 25.8%, 3.6%, 17%, 23.3%, 14.1% and 75.1%, respectively. The increases in these values after SOS induction were due to DNA replication by the TLS polymerases. The dG-C8-C2-ABA, dG-C8-N-AcABA and dG-C8-C2-AcABA adducts displayed greater increases in their relative TLS frequencies than the other adducts.

3.2. Mutation frequency per TLS event and type of mutation

The progeny plasmids in which TLS occurred over the adducts under the SOS⁺ conditions (around 100 plasmids were examined for each adduct) were sequenced to reveal their mutation frequencies and the types of mutations that they possessed. As shown in Table 1, the proportion of mutagenic TLS events among all TLS events was 13% for the dG-N²-C2-ABA adducts, whereas

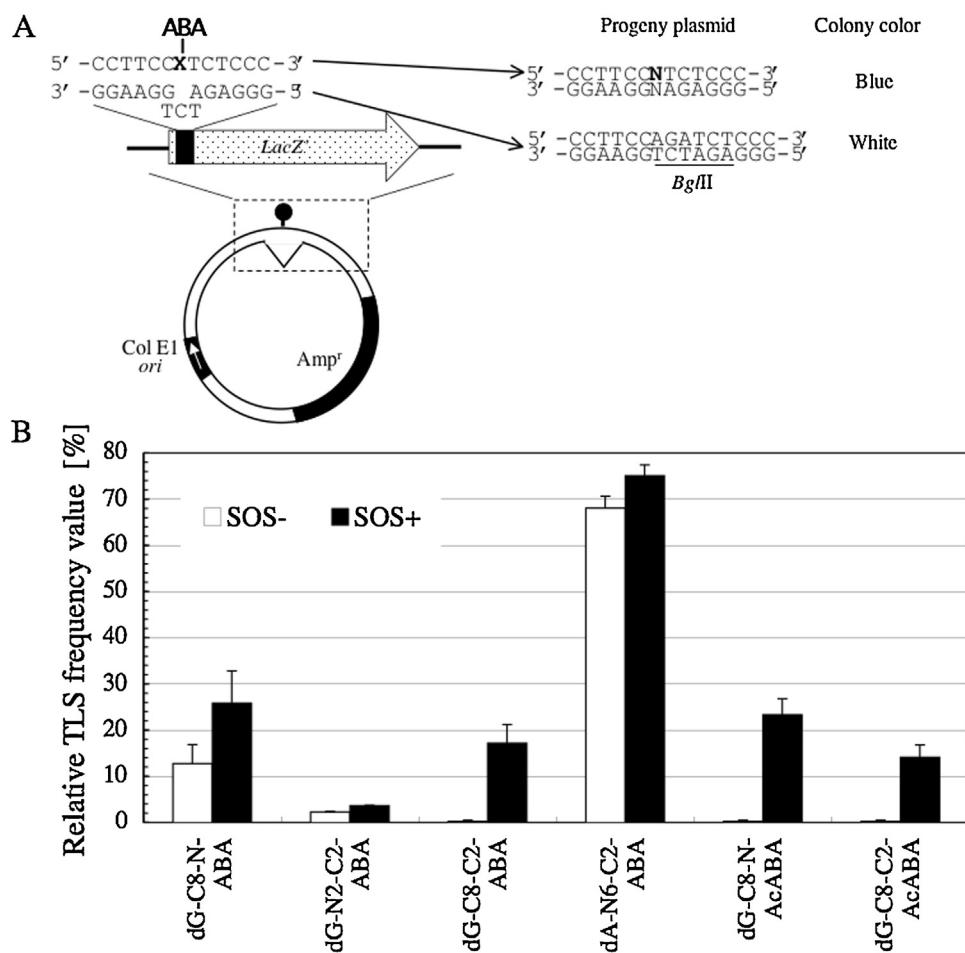


Fig. 2. Replication efficiency across the adducts in *E. coli* (*uvrA*⁻). The site-specifically mono-modified plasmids were replicated in nucleotide excision repair-deficient *E. coli*. (A) Structure of the mono-modified plasmids and the principle behind the assay system. X-ABA represents the adducted base shown in Fig. 1. (B) Replication efficiency across the adducts in the host *E. coli* (*uvrA*⁻) cells under the SOS⁻ or SOS⁺ conditions. Relative TLS frequency value was calculated as the ratio (%) of the TLS frequency of the modified plasmid to that of the non-modified plasmid. The TLS frequency (%) of each plasmid was calculated using the equation: ((number of blue colonies)/(total number of colonies)) × 100. We examined more than thirty thousand colonies for each adduct (see Section 2). The mean results of at least three independent experiments are plotted together with the S.D.

the other adducts induced fewer mutations during TLS. The dG-C8-C2-ABA, dA-N⁶-C2-ABA and dG-C8-N-AcABA adducts did not display any TLS-induced mutations. G to T transversions were the most frequent TLS-induced mutations in the dG-N²-C2-ABA adducts.

3.3. TLS frequency in *E. coli* strains lacking one of the TLS polymerases

In order to determine which TLS polymerases were responsible for the replication of each adduct, we measured the relative TLS frequencies of each adduct in *E. coli* strains that lacked one of the

TLS polymerases. In the *E. coli* strain that possessed all of the TLS polymerases, an increase in the frequency of TLS over the dG-N²-C2-ABA adducts was observed after SOS induction, whereas no such increase was detected in the ΔPol IV or ΔPol V strains (Fig. 3). This indicates that in addition to the replicative DNA polymerases, both Pol IV and Pol V participate in TLS over dG-N²-C2-ABA adducts. Furthermore, the frequencies of TLS across dG-C8-N-AcABA and dG-C8-C2-AcABA adducts did not increase after SOS induction in the ΔPol V strain, which indicates that Pol V is responsible for TLS across these adducts. There was no significant decrease in the frequency of TLS across the dG-C8-N-ABA, dG-C8-C2-ABA or dA-N⁶-C2-ABA adducts under the SOS⁺ conditions.

Table 1

Types of mutation induced by the adducts in *E. coli* (*uvrA*⁻) under the SOS⁺ conditions.

Adduct	dG-C8-N-ABA	dG-N ² -C2-ABA	dG-C8-C2-ABA	dA-N ⁶ -C2-ABA	dG-C8-N-AcABA	dG-C8-C2-AcABA
Proportion of mutagenic TLS events (%) (number of mutant colonies/number of TLS (blue) colonies sequenced)	1 (1/96)	13 (13/96)	<1 (0/96)	<1 (0/96)	<1 (0/113)	3 (4/119)
Type of mutation (number of mutations)	G to T (1)	G to T (7)				G to T (3)
		G to C (3)				
		Other (3) ^a				

^a Mutations at unadducted sites were classified as "other".

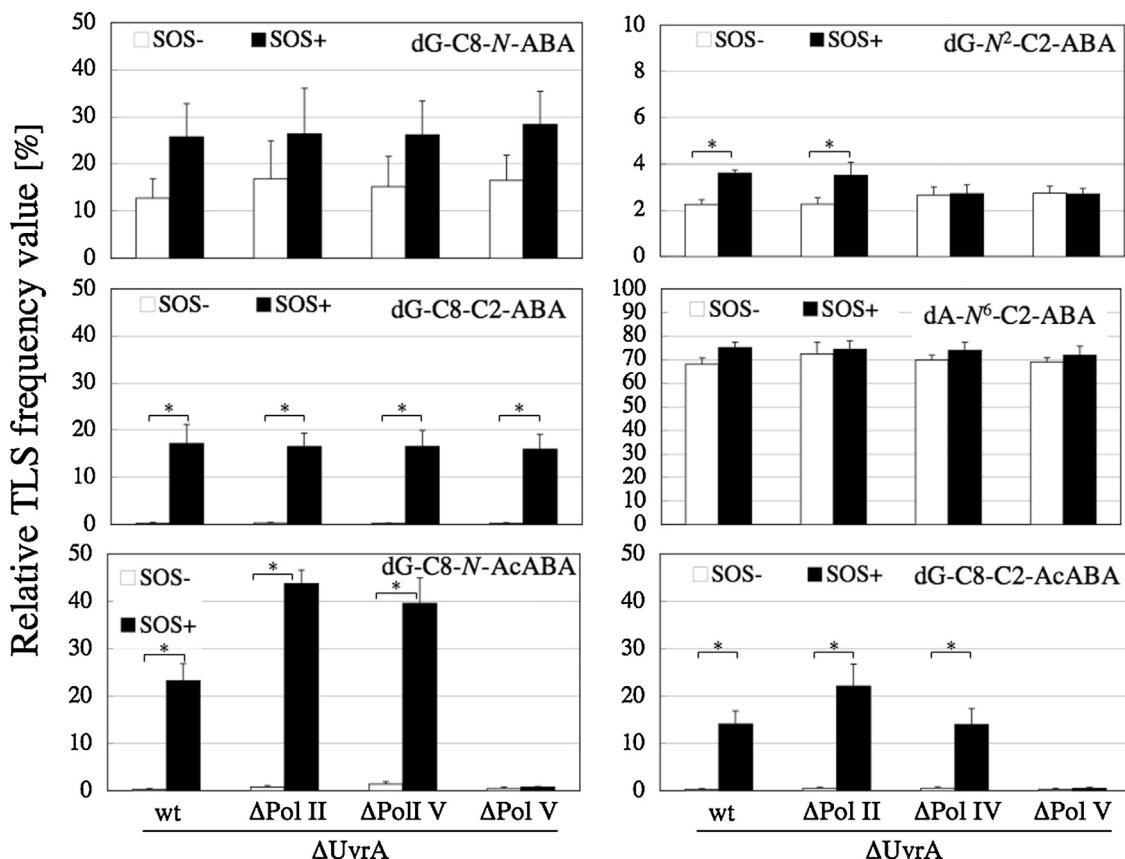


Fig. 3. Replication efficiency across the adducts in *E. coli* lacking one TLS polymerase. Replication efficiency across the adducts in host *E. coli* strains that lacked both *uvrA* and one of the TLS polymerases ($\Delta\text{Pol II}$, $\Delta\text{Pol IV}$, or $\Delta\text{Pol V}$) in the SOS⁻ or SOS⁺ conditions. "wt" indicates the strain that only lacked *uvrA*. Relative TLS frequency value was calculated as the ratio (%) of the TLS frequency of the modified plasmid to that of the non-modified plasmid. We examined more than thirty thousand colonies for each adduct. The mean results of at least three independent experiments are plotted together with the S.D. Asterisks indicate a significant difference ($p < 0.05$ in Student's *t*-test).

4. Discussion

In *E. coli*, DNA polymerases II, IV and V are considered to play a major role in TLS, and the expression levels of these polymerases are upregulated by the SOS response. However, the ability of a particular polymerase to perform TLS over an adduct and the fidelity of the results depend on the chemical structure of the DNA lesion involved and the DNA sequence in which the lesion occurs [27]. In the present study, when *E. coli* replicated DNA templates containing dA-N⁶-C2-ABA adducts, replication was barely affected (Fig. 2B), suggesting that the replicative polymerases (Pol I and Pol III) carried out TLS over the adducts since the induction of the SOS response in the host cells did not affect the relative TLS frequency value of the dA-N⁶-C2-ABA adducts (Fig. 2B). However, all of the other adducts markedly inhibited DNA replication, and the increases in their relative TLS frequencies induced by the SOS response indicated that TLS polymerases facilitate the bypassing of these lesions (Fig. 2B). Note, that the TLS frequencies of the dG-C8-N-ABA and dG-N²-C2-ABA adducts under the SOS⁻ conditions were not low enough to be considered negligible, indicating that some of the progeny plasmids were replicated by replicative DNA polymerases.

The results obtained using *E. coli* strains lacking one of the TLS polymerases indicated that Pol V carries out TLS over dG-C8-N-AcABA and dG-C8-C2-AcABA adducts (Fig. 3). In the SOS⁺ condition, the TLS frequencies across dG-C8-N-AcABA in $\Delta\text{Pol II}$ and $\Delta\text{Pol IV}$ strains were higher than those in the wild type strain. Since Pol V performs markedly efficient bypass across the adduct, lack of Pol II or Pol IV might increase a chance for Pol V to access the replisome at the damaged site, and result in more efficient TLS across the adduct in $\Delta\text{Pol II}$ and $\Delta\text{Pol IV}$ strains. In TLS over dG-C8-C2-ABA

adducts, Pol II, Pol IV and Pol V might be functionally redundant since similar increases in the frequency of TLS across dG-C8-C2-ABA adducts were found in all of the single polymerase knockout strains after SOS induction (Fig. 3). In the case of dG-C8-N-ABA adducts, in addition to replication by replicative DNA polymerases in the SOS⁻ conditions, Pol II, Pol IV and Pol V also participate in TLS over these adducts since SOS induction increased their relative TLS frequency value, and the TLS frequency of the dG-C8-N-ABA adducts displayed similar increases in all of the single TLS polymerase knockout strains after SOS induction (Fig. 3). In the case of dG-N²-C2-ABA adducts, besides the replicative DNA polymerases, Pol IV and Pol V also carry out TLS across these adducts (Fig. 3). The dG-N²-C2-ABA adducts displayed a low TLS frequency, even under the SOS⁺ conditions (about 3%, Figs. 2B and 3). In addition, TLS across dG-N²-C2-ABA adducts resulted in G to T mutations, whereas all the other adducts were bypassed in a less mutagenic manner (Table 1). These findings indicate that among the ABA adducts, dG-N²-C2-ABA is the biggest obstacle in accurate DNA replication for *E. coli*.

Comparing the present results to published data, some analogies in the relationship between the chemical structures of adduct and DNA replication are found. The chemical nature of the adducts dG-C8-N-ABA and dG-C8-N-AcABA is similar to that of the corresponding 2-aminofluorene (AF)- and AAF-dG adducts: *N*-(2'-deoxyguanosin-8-yl)-2-aminofluorene (dG-C8-N-AF) and *N*-(2'-deoxyguanosin-8-yl)-2-acetylaminofluorene (dG-C8-N-AAF), respectively. The bypass manner of the AF and AAF adducts is remarkably similar to that of the ABA and AcABA adducts, respectively. Namely, dG-C8-N-AF and dG-C8-N-ABA are relatively well bypassed under the SOS⁻ condition, presumably by Pol III

without remarkable influence of SOS induction [29]. The bypass properties of dG-C8-N-AAF and dG-C8-N-AcABA also appear to be similar: *i.e.*, the both adducts severely block DNA replication under the SOS[−] condition, and SOS induction markedly facilitates the bypass that absolutely requires Pol V. dG-C8-C2-AcABA is also a guanine-C8 adduct with an acetyl group on the aromatic amine, and differs solely by the position where the guanine-C8 is linked to ABA. TLS across dG-C8-C2-AcABA requires Pol V similarly to that across dG-C8-N-AAF and dG-C8-N-AcABA. dG-N²-C2-ABA and dA-N⁶-C2-ABA are adducts to extracyclic amino groups in dG and dA. These two adducts behave differently from all other adducts: *i.e.*, dA-N⁶-C2-ABA blocks replication weakly and is bypassed to the high level presumably by Pol III, while dG-N²-C2-ABA is poorly bypassed even under the SOS⁺ condition. This weak SOS-mediated bypass of dG-N²-C2-ABA appears to depend upon both Pol IV and Pol V, and a similar genetic control was observed for the adduct of benzo[a]pyrene to the same N² position, (+)-trans-anti-benzo[a]pyrene-N²-dG [28].

In our previous study, we evaluated the efficiency of TLS across dG-C8-N-ABA, dG-N²-C2-ABA and dA-N⁶-C2-ABA adducts and the mutagenic potential of these processes using mono-modified plasmids in human cells [21]. In human cells, the dG-N²-C2-ABA adduct was not the utmost burden for accurate DNA replication (unlike in *E. coli*). Instead, dG-C8-N-ABA markedly blocked DNA replication in human cells, and caused mutagenic TLS events most frequently among these three adducts. Furthermore, dA-N⁶-C2-ABA blocked DNA replication in human cells, and its relative TLS frequency value was 43.1%. The different host cells used in our previous and present studies would have been responsible for the discrepancies between their results. In fact, in a study comparing mutagenesis in *E. coli* with that in simian kidney (COS-7) cells, Tan et al. reported that the mutagenic potential of AAF-derived DNA adducts located in the *NarI* restriction enzyme site depended on the host cells used for the experiment [30].

We should also consider the DNA strand in which a DNA polymerase encounters a lesion. We used different mono-modified plasmids in our *E. coli* and human cell studies. The plasmids used in the present study carried a unidirectional ColE1 *ori*, whereas those used in our previous human cell study possessed a bidirectional SV40 *ori*. This disparity would have caused differences in the location of TLS: *i.e.*, in the leading or lagging strand, and might have affected the mutation frequency [26].

In the *Salmonella* Ames assay, 3-NBA was found to be a strong inducer of frameshift mutations [1]. In contrast, we did not detect frameshift mutations in the present study. The sequence in which a lesion occurs has been shown to affect the frequency of mutation [30]. The tester strains used to detect frameshift mutations in the Ames assay (TA98 and its derivatives) contain repetitive sequences in their target genes. Repetitive sequences are likely to induce DNA strand slippage, which results in deletion mutations; however, the target sites in our mono-modified plasmids did not contain any repetitive sequences. Thus, the inconsistent results would have resulted from differences in the target gene sequences.

Usually, nitro-PAHs form several kinds of DNA adduct in organisms. Conventional mutation assays can provide data on the overall mutagenicity of compounds. However, the mutagenic effects induced by particular compounds will differ between DNA adducts. Furthermore, the sequence in which a lesion occurs is known to affect the risk of mutagenesis. In fact, Vaidyanathan and Cho reported that aminofluorene in different sequences induced conformational heterogeneity, which affects nucleotide insertion efficiency in a conformation-specific manner during TLS [31]. Therefore, evaluating both the overall mutagenic potential of a compound and its effects on individual adducts located in specific sequences is necessary to fully understand the mutagenic potential of a compound. This study increases our understanding of

the molecular mechanisms of the mutagenesis and carcinogenesis induced by 3-NBA.

Conflicts of interest statement

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Acknowledgements

We thank Drs. R.P.P. Fuchs, N. Koffel-Schwartz, R. Napolitano and R.Janel-Bintz (CNRS, France) for their cooperation with the production of the mono-modified plasmids and providing us with the *E. coli* strains. We also thank Drs. T. Nohmi and M. Yamada (NIHS, Japan) for their kind advice on establishing the *E. coli* strains. This study was supported by Grants-in-Aid (Project Numbers 17310039 (for T.Y.), 17710047 (for M.K.), 19710058 (for M.K.), 23710081 (for M.K.) and 24310047 (for T.Y.)) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan and a Grant-in Aid for Cancer Research from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan.

References

- [1] T. Enya, H. Suzuki, T. Watanabe, T. Hirayama, Y. Hisamatsu, 3-Nitrobenzanthrone, a powerful bacterial mutagen and suspected human carcinogen found in diesel exhaust and airborne particulates, *Environ. Sci. Technol.* 31 (1997) 2772–2776.
- [2] R. Taga, N. Tang, T. Hattori, K. Tamura, S. Sakai, A. Toriba, R. Kizu, K. Hayakawa, Direct-acting mutagenicity of extracts of coal burningderived particulates and contribution of nitropolycyclic aromatic hydrocarbons, *Mutat. Res.* 581 (2005) 91–95.
- [3] T. Murahashi, T. Watanabe, S. Otake, Y. Hattori, T. Takamura, K. Wakabayashi, T. Hirayama, Determination of 3-nitrobenzanthrone in surface soil by normal-phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, *J. Chromatogr. A* 992 (2003) 101–107.
- [4] T. Watanabe, T. Hasei, T. Yoshifumi, S. Otake, T. Murahashi, T. Takamura, T. Hirayama, K. Wakabayashi, Mutagenic activity and quantification of nitroarenes in surface soil in the Kinki region of Japan, *Mutat. Res.* 538 (2003) 121–131.
- [5] T. Murahashi, E. Iwanaga, T. Watanabe, T. Hirayama, Determination of the mutagen 3-nitrobenzanthrone in rainwater collected in Kyoto, Japan, *J. Health Sci.* 49 (2003) 386–390.
- [6] V.M. Arlt, H.H. Schmeiser, M.R. Osborne, M. Kawanishi, T. Kanno, T. Yagi, D.H. Phillips, T. Takamura-Enya, Identification of three major DNA adducts formed by the carcinogenic air pollutant 3-nitrobenzanthrone in rat lung at the C8 and N2 position of guanine and at the N6 position of adenine, *Int. J. Cancer* 118 (2006) 2139–2146.
- [7] A. Seidel, D. Dahmann, H. Krekeler, J. Jacob, Biomonitoring of polycyclic aromatic compounds in the urine of mining workers occupationally exposed to diesel exhaust, *Int. J. Hyg. Environ. Health* 204 (2002) 333–338.
- [8] E. Lamy, E. Kassie, R. Gminski, H.H. Schmeiser, V. Mersch-Sundermann, 3-Nitrobenzanthrone (3-NBA) induced micronucleus formation and DNA damage in human hepatoma (HepG2) cells, *Toxicol. Lett.* 146 (2004) 103–109.
- [9] P.T. Phousongphouang, A.J. Grosovsky, D.A. Eastmond, M. Covarrubias, J. Arey, The genotoxicity of 3-nitrobenzanthrone and the nitropyrene lactones in human lymphoblasts, *Mutat. Res.* 472 (2000) 93–103.
- [10] V.M. Arlt, K.J. Cole, D.H. Phillips, Activation of 3-nitrobenzanthrone and its metabolites to DNA-damaging species in human B-lymphoblastoid MCL-5 cells, *Mutagenesis* 19 (2004) 149–156.
- [11] V.M. Arlt, L.Zhan, H.H. Schmeiser, M. Honma, M. Hayashi, D.H. Phillips, T. Suzuki, DNA adducts and mutagenic specificity of the ubiquitous environmental pollutant 3-nitrobenzanthrone in Muta Mouse, *Environ. Mol. Mutagen.* 43 (2004) 186–195.
- [12] V.M. Arlt, 3-Nitrobenzanthrone, a potential human cancer hazard in diesel exhaust and urban air pollution: a review of the evidence, *Mutagenesis* 20 (2005) 399–410.
- [13] E. Nagy, C. Johansson, M. Zeisig, L. Moller, Oxidative stress and DNA damage caused by the urban air pollutant 3-NBA and its isomer 2-NBA in human lung cells analysed with three independent methods, *J. Chromatogr. Biomed. Life. Sci.* 827 (2005) 94–103.
- [14] E. Nagy, M. Zeisig, K. Kawamura, Y. Hisamatsu, A. Sugeta, S. Adachi, L. Moller, DNA-adduct and tumor formations in rats after intratracheal administration of the urban air pollutant 3-nitrobenzanthrone, *Carcinogenesis* 26 (2005) 1821–1828.
- [15] F.A. Beland, F.F. Kadlubar, Metabolic activation and DNA adducts of aromatic amines and nitroaromatic hydrocarbons, in: C.S. Cooper, P.L. Grover (Eds.), *Handbook of Experimental Pharmacology Chemical Carcinogenesis and Mutagenesis*, vol. 94/I, Springer-Verlag, Heidelberg, 1990, pp. 267–325.

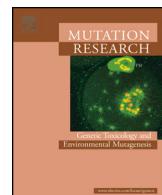
- [16] F.A. Beland, M.M. Marrques, DNA adducts of nitropolycyclic aromatic hydrocarbons, in: DNA Adducts: Identification and Biological Significance, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, 1994, pp. 229–244.
- [17] P.E. Hanna, R.B. Banks, Arylhydroxylamines and arylhydroxamic acids: conjugation reactions, in: Bioactivation of Foreign Compounds, Academic Press, New York, 1985, pp. 375–402.
- [18] F.F. Kadlubar, F.A. Beland, Chemical properties of ultimate carcinogenic metabolites of arylamines and arylamides, in: Polycyclic Hydrocarbons and Carcinogenesis, American Chemical Society, Washington, DC, 1985, pp. 341–370.
- [19] T. Takamura-Enya, M. Kawanishi, H. Suzuki, S. Matsui, Y. Hisamatsu, An unusual DNA adduct derived from the powerfully mutagenic environmental contaminant, 3-nitrobenzanthrone, *Chem. Res. Toxicol.* 11 (1998) 1460–1467.
- [20] T. Kanno, M. Kawanishi, T. Takamura-Enya, V.M. Arlt, D.H. Phillips, T. Yagi, DNA adduct formation in human hepatoma cells treated with 3-nitrobenzanthrone: analysis by the ^{32}P -postlabeling method, *Mutat. Res.* 634 (2007) 184–191.
- [21] M. Kawanishi, Y. Fujikawa, H. Ishii, H. Nishida, Y. Higashigaki, T. Kanno, T. Matsuda, T. Takamura-Enya, T. Yagi, Adduct formation and repair, and translesion DNA synthesis across the adducts in human cells exposed to 3-nitrobenzanthrone, *Mutat. Res.*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2013.03.005>, in press.
- [22] M. Kawanishi, T. Enya, H. Suzuki, H. Takebe, S. Matsui, T. Yagi, Postlabelling analysis of DNA adducts formed in human hepatoma cells treated with 3-nitrobenzanthrone, *Mutat. Res.* 470 (2000) 133–139.
- [23] T. Takamura-Enya, M. Kawanishi, T. Yagi, Y. Hisamatsu, Structural identification of DNA adducts derived from 3-nitrobenzanthrone, a potent carcinogen present in the atmosphere, *Chem. Asian J.* 2 (2007) 1174–1185.
- [24] M. Lukin, T. Zaliznyak, F. Johnson, C.R. de Los Santos, Incorporation of 3-aminobenzanthrone into 2'-deoxyoligonucleotides and its impact on duplex stability, *J. Nucleic Acids* 2011 (2011) 521035.
- [25] T. Takamura-Enya, S. Enomoto, K. Wakabayashi, Palladium-catalyzed direct N-arylation of nucleosides, nucleotides, and oligonucleotides for efficient preparation of dG-N² adducts with carcinogenic amino-/nitroarenes, *J. Org. Chem.* 71 (2006) 5599–5606.
- [26] X. Veautre, R.P. Fuchs, Greater susceptibility to mutations in lagging strand of DNA replication in *Escherichia coli* than in leading strand, *Science* 261 (1993) 598–600.
- [27] E.C. Friedberg, G.C. Walker, W. Siede, R.D. Wood, R.A. Schultz, T. Ellenberger, DNA Repair and Mutagenesis, ASM Press, Washington, DC, 2006.
- [28] R. Napolitano, R. Janel-Bintz, J. Wagner, R.P. Fuchs, All three SOS-inducible DNA polymerases (Pol II, Pol IV and Pol V) are involved in induced mutagenesis, *EMBO J.* 19 (2000) 6259–6265.
- [29] N. Koffel-Schwartz, F. Coin, X. Veautre, R.P. Fuchs, Cellular strategies for accommodating replication-hindering adducts in DNA: control by the SOS response in *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93 (1996) 7805–7810.
- [30] X. Tan, N. Suzuki, A.P. Grollman, S. Shibutani, Mutagenic events in *Escherichia coli* and mammalian cells generated in response to acetylaminofluorene-derived DNA adducts positioned in the Nar I restriction enzyme site, *Biochemistry* 41 (2002) 14255–14262.
- [31] V.G. Vaideyanathan, B.P. Cho, Sequence effects on translesion synthesis of an aminofluorene-DNA adduct: conformational, thermodynamic, and primer extension kinetic studies, *Biochemistry* 51 (2012) 1983–1995.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/gentox
 Community address: www.elsevier.com/locate/mutres



Adduct formation and repair, and translesion DNA synthesis across the adducts in human cells exposed to 3-nitrobenzanthrone

Masanobu Kawanishi^a, Yoshihiro Fujikawa^a, Hiroshi Ishii^a, Hiroshi Nishida^a, Yuka Higashigaki^a, Takaharu Kanno^a, Tomonari Matsuda^b, Takeji Takamura-Enya^c, Takashi Yagi^{a,d,*}

^a Graduate School of Science and Radiation Research Center, Osaka Prefecture University, 1-2 Gakuen-cho, Naka-ku, Sakai, Osaka 599-8570, Japan

^b Research Center for Environmental Quality Management, Kyoto University, 1-2 Yumihama, Otsu, Shiga 520-0811, Japan

^c Department of Applied Chemistry, Kanagawa Institute of Technology, 1030 Shimo-ogino, Atsugi, Kanagawa 243-0292, Japan

^d Department of Life Science, Dongguk University Seoul, 26, 3 Pil-dong, Jung-gu, Seoul 100-715, Republic of Korea

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 December 2012

Received in revised form 26 February 2013

Accepted 22 March 2013

Available online 6 April 2013

Keywords:

3-Nitrobenzanthrone

DNA adduct

DNA repair

Translesion DNA synthesis

Mutation

ABSTRACT

3-Nitrobenzanthrone (3-nitro-7H-benz[d,e]anthracen-7-one, 3-NBA) is a potent environmental mutagen that is found in diesel exhaust fumes and airborne particulates. It is known to produce several DNA adducts, including three major adducts *N*-(2'-deoxyguanosin-8-yl)-3-aminobenzanthrone (dG-C8-N-ABA), 2-(2'-deoxyadenosin-*N*⁶-yl)-3-aminobenzanthrone (dA-*N*⁶-C2-ABA), and 2-(2'-deoxyguanosin-*N*²-yl)-3-aminobenzanthrone (dG-*N*²-C2-ABA) in mammalian cells. In the present study, we measured the quantity of the formation and subsequent reduction of these adducts in human hepatoma HepG2 cells that had been treated with 3-NBA using LC-MS/MS analysis. As a result, dG-C8-N-ABA and dG-*N*²-C2-ABA were identified as major adducts in the HepG2 cells, and dA-*N*⁶-C2-ABA was found to be a minor adduct. Treatment with 1 µg/mL 3-NBA for 24 h induced the formation of 2835 ± 1509 dG-C8-N-ABA and 3373 ± 1173 dG-*N*²-C2-ABA per 10⁷ dG and 877 ± 330 dA-*N*⁶-C2-ABA per 10⁷ dA in the cells. The cellular DNA repair system removed the dG-C8-N-ABA and dA-*N*⁶-C2-ABA adducts more efficiently than the dG-*N*²-C2-ABA adducts. After a 24-h repair period, 86.4 ± 11.1% of the dG-*N*²-C2-ABA adducts remained, whereas only 51.7 ± 2.7% of the dG-C8-N-ABA adducts and 37.8 ± 1.7% of the dA-*N*⁶-C2-ABA adducts were present in the cells. We also evaluated the efficiency of bypasses across these three adducts and their mutagenic potency by introducing site-specific mono-modified plasmids into human cells. This translesion DNA synthesis (TLS) assay showed that dG-C8-N-ABA blocked DNA replication markedly (its replication frequency was 16.9 ± 2.7%), while the replication arrests induced by dG-*N*²-C2-ABA and dA-*N*⁶-C2-ABA were more moderate (their replication frequencies were 33.3 ± 6.2% and 43.1 ± 7.5%, respectively). Mutagenic TLS was observed more frequently in replication across dG-C8-N-ABA (30.6%) than in replication across dG-*N*²-C2-ABA (12.1%) or dA-*N*⁶-C2-ABA (12.1%). These findings provide important insights into the molecular mechanism of 3-NBA-mutagenesis.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

3-Nitrobenzanthrone (3-nitro-7H-benz[d,e]anthracen-7-one, 3-NBA, CAS 17117-34-9, Fig. 1) is a powerful mutagenic aromatic

nitro ketone that is found in diesel exhaust fumes and airborne particles [1]. Its atmospheric washout by rainfall is associated with the 3-NBA contamination of surface soil [2–4]. In the Ames *Salmonella typhimurium* (TA98) assay, the mutagenicity of 3-NBA was found to be as high as that of 1,8-dinitropyrene, the strongest mutagen that has been reported so far [1]. 3-NBA induces micronucleus formation in mouse peripheral blood reticulocytes [1,5] and causes DNA strand breaks in human cell comet assays [6–8]. Further studies have demonstrated that 3-NBA is mutagenic in mammalian assay systems [5,9] and induces lung tumors in experimental animals [10]. Therefore, 3-NBA is regarded as an environmental risk factor for human lung cancer in urban areas (see review [11]).

The covalent bonding of DNA to nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons (nitro-PAH) results in events that are critical for mutation and cancer initiation [12]. Nitro-PAH acquires

Abbreviations: 3-NBA, 3-nitrobenzanthrone; ABA, aminobenzanthrone; dA-*N*⁶-C2-ABA, 2-(2'-deoxyadenosin-*N*⁶-yl)-3-aminobenzanthrone; dG-C8-N-ABA, *N*-(2'-deoxyguanosin-8-yl)-3-aminobenzanthrone; dG-*N*²-C2-ABA, 2-(2'-deoxyguanosin-*N*²-yl)-3-aminobenzanthrone; MRM, multiple reaction monitoring; NER, nucleotide excision repair; N-Aco-ABA, *N*-acetoxy-3-aminobenzanthrone; N-OH-ABA, *N*-hydroxy-3-aminobenzanthrone; SI, stable isotope; XP, xeroderma pigmentosum; XPA, XP patient who belongs to complementation group A.

* Corresponding author at: Graduate School of Science and Radiation Research Center, Osaka Prefecture University, 1-2 Gakuen-cho, Naka-ku, Sakai, Osaka 599-8570, Japan. Tel.: +81 072 254 9862; fax: +81 072 254 9938.

E-mail address: yagi-t@riast.osakafu-u.ac.jp (T. Yagi).

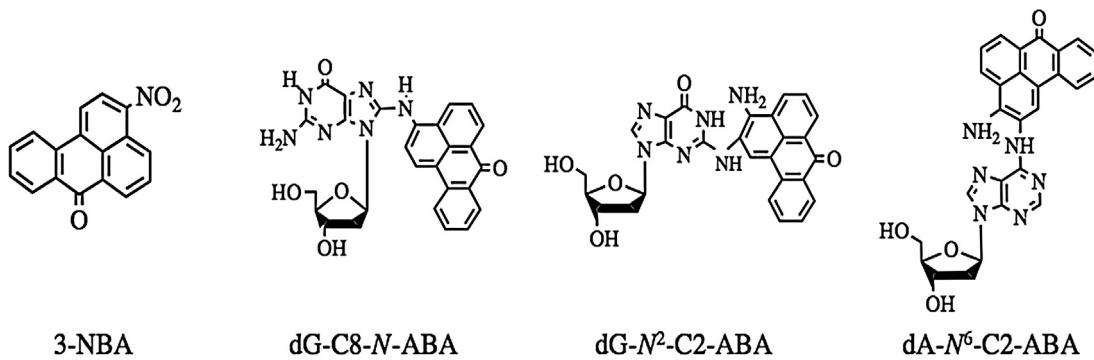


Fig. 1. Chemical structures of 3-NBA and its DNA adducts.

carcinogenicity by being metabolized into reactive electrophiles. It has been shown that the metabolism of 3-NBA is primarily mediated through cytosolic nitroreductases, followed by activation by *N*-acetyltransferase and sulfotransferases, which leads to the formation of reactive intermediates that can form covalent bonds with DNA [13–18]. Using the ³²P-postlabeling and high performance liquid chromatography equipped with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method, a number of bulky aromatic DNA adducts, including three major adducts, *N*-(2'-deoxyguanosin-8-yl)-3-aminobenzanthrone (dG-C8-N-ABA), 2-(2'-deoxyadenosin-*N*⁶-yl)-3-aminobenzanthrone (dA-N⁶-C2-ABA), and 2-(2'-deoxyguanosin-*N*²-yl)-3-aminobenzanthrone (dG-N²-C2-ABA), have been detected in cells and tissues treated with 3-NBA (Fig. 1) [5,6,8,10,13–15,17,19–29].

The nucleotide excision repair (NER) pathway is the major mechanism by which bulky adducts are removed, and the efficiency of their removal is known to depend on the chemical structures of the adducts [30]. In proliferating cells, residual adducts arrest progression at replication forks, form replication gaps, or cause DNA disconnection, leading to apoptosis [30]. To prevent replication being blocked, cells possess a translesion DNA synthesis (TLS) mechanism [30]. TLS is performed by low stringency polymerases, each of which displays a different specificity for adducted substrate DNA bases. In mammalian cells, these polymerases include Polη, ι , κ , and Rev1 in the Y-family and Polζ in the B-family [31–37]. The ability of TLS polymerases to extend a DNA strand over adducted bases and their ability to insert the correct bases opposite the adducted bases affect the risk of mutation. Human Polη inserts incorrect bases opposite benzo[a]pyrene (B[a]P)-adducted guanine (B[a]P-dG) residues; *i.e.*, in an error-prone manner, whereas it efficiently bypasses UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers in an error-free manner *in vitro* [38,39]. The efficiency of adduct bypasses during TLS and the associated risk of mutagenesis depends on the chemical structures of the DNA adducts involved.

To elucidate the molecular mechanism responsible for 3-NBA-induced mutagenesis in human cells, we used LC-MS/MS to quantify the formation of dG-C8-N-ABA, dG-N²-C2-ABA and dA-N⁶-C2-ABA adducts in human hepatoma HepG2 cells that had been treated with 3-NBA, as well as the subsequent reduction of these adducts through the cellular repair process. We also evaluated the efficiency of bypasses across these adducts and the frequency of mutations induced by the adducts by introducing site-specific mono-modified plasmids into human cells.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture

Human hepatoma HepG2 cells obtained from the RIKEN Cell Bank (Wako, Japan) and the SV40-transformed human fibroblast cell line XP2OS(SV) [40] were cultured in RPMI1640 medium (Sigma-Aldrich Japan, Tokyo) supplemented with 10% fetal bovine serum (JRN BIOSCIENCES, KS, USA) in a 5% CO₂ atmosphere at 37 °C.

The XP2OS(SV) was originated from a xeroderma pigmentosum (XP) patient who belonged to complementation group A (XPA) [40], and this cell line is incapable of performing NER.

2.2. 3-NBA treatment and genomic DNA extraction

The cells were exposed to 3-NBA, as reported previously [28]. Briefly, HepG2 cells (80% confluent) on a 75 cm² dish were washed with phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.5) (Takara Bio Co., Kyoto, Japan) and incubated in RPMI1640 containing various concentrations of 3-NBA for the indicated time periods. 3-NBA was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO; Nacalai Tesque, Kyoto, Japan). The DMSO concentration was not higher than 1% (v/v). Cellular DNA was extracted and digested with the micrococcal nuclease/spleen phosphodiesterase method, as described previously [41]. In order to evaluate the efficiency of adduct removal by the cellular DNA repair mechanism, HepG2 cells were treated with 0.01 µg/mL of 3-NBA for 1 h. The cells were washed with PBS, and then, in order to allow the cells to repair their DNA, they were cultured for the indicated time period in RPMI1640 medium without fetal bovine serum to inhibit cell proliferation. To measure cell viability, HepG2 cells cultured in a 96-well microtiter plate were exposed to various concentrations of 3-NBA for the indicated time periods. Living cells were stained with Neutral Red (Wako Chemical Co., Osaka, Japan; 50 g/mL) and fixed with 1% formalin containing 1% CaCl₂ for 1 h. The Neutral Red was extracted from the stained cells with 50% ethanol containing 50% acetic acid, and their OD₅₄₀ values were measured with a Model 680 microplate reader (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Cell viability was calculated as the ratio of the OD₅₄₀ of the 3-NBA-exposed cells to that of the solvent control cells.

2.3. Adduct quantification with LC/ESI-MS/MS

The adduct quantification analysis was performed using the Shimadzu HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan), which consists of LC-10ADvp dual pumps, an SIL-10ADvp autosampler, a Shim-pack FC-ODS column (4.6 mm × 150 mm, 3 µm, Shimadzu), and an SPD-10 ADvp UV-Vis detector, as described previously [41]. The HPLC mobile phases A and B were water and methanol, respectively. The HPLC flow rate was set at 0.4 mL/min. The HPLC gradient started at 40% B, was increased linearly to 80% B over 20 min, and returned to the initial conditions over 1 min, which were maintained for a further 20 min. The HPLC system was interfaced with a Quattro Ultima Pt tandem quadrupole mass spectrometer with an electrospray interface (Waters-Micromass, Milford, MA, USA). The temperature of the electrospray source was maintained at 130 °C, and the desolvation temperature was maintained at 380 °C. Nitrogen was used as the desolvation gas (700 L/h), and the cone gas flow rate was set to 30 L/h. The capillary voltage was set at 3.5 kV. The collision cell pressure and collision energy were set to 3.8 × 10^{−3} mbar and 10 eV, respectively. The adducts were analyzed by MS/MS using multiple reaction monitoring (MRM). The ion transition was set at [M+H]⁺ to [M+H−116]⁺, and the [M+H] of dG-C8-N-ABA and dG-N²-C2-ABA were set at *m/z* 511.2, and that of dA-N⁶-C2-ABA was set at *m/z* 495.2. Fifty µL samples were injected in each experiment. The absorbance at 254 nm was also monitored with a UV-Vis detector to monitor DNA digestion, and the peak areas of dG and dT were used for peak normalization, as described previously [41]. The adduct standards were prepared as described previously [29,42]. The stable isotope-labeled (SI-labeled) internal adduct standards were also synthesized as described previously [29,42] with ¹³C and ¹⁵N labeled 2'-deoxyguanosin (^U-¹³C₁₀ 98%, ^U-¹⁵N₅ 96–98%; Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA, USA) and 2'-deoxyadenosin (^U-¹³C₁₀ 98%, ^U-¹⁵N₅ 96–98%; Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA, USA). The SI-labeled standards (1 nM) and the indicated concentrations of the non-SI-labeled standards were mixed and injected into the LC-MS/MS system. The [M+H] of the SI-labeled dG-C8-N-ABA and dG-N²-C2-ABA were *m/z* 526.2, and that of the SI-labeled dA-N⁶-C2-ABA was *m/z* 510.2. The standard curves for quantification were drawn using the peak area of the SI-labeled adduct (*a_{IS}*) and the peak area of the unlabeled adduct (*a_{AS}*). To quantify the amount of the adducts, the SI-labeled adducts

were mixed with DNA extracted from the cells, and the mixture was digested with enzymes, as described in the following section.

2.4. Preparation of oligonucleotides with ABA adducts

N-Hydroxy-3-aminobenzanthrone (N-OH-ABA) was prepared as described previously [28]. Oligonucleotides containing dG-N²-C2-ABA (5'-CCTTCGGTCTCCC-3', underlined G indicates dG-N²-C2-ABA) were prepared using a slightly modified version of the previously described procedure [43]. Briefly, the corresponding amidite without the O⁶-nitrobenzyl protective group, which was prepared by direct aryl amination, was used for oligonucleotide synthesis [44]. To prepare oligonucleotides containing dG-C8-N-ABA and dA-N⁶-C2-ABA, N-OH-ABA (1 mg) was dissolved in 100 µL of tetrahydrofuran (Low water solvent, Nacalai Tesque), and then 5 mg of TBD-methyl polystyrene (PS-TBD) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and 0.6 µL of pyruvonitrile (Merck KGaA) were added to obtain a reactive derivative of 3-NBA, N-acetoxy-3-aminobenzanthrone (N-Aco-ABA). To remove excess pyruvonitrile, 5 µL of anhydrous methanol (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) were added, and the mixture was incubated for 10 min at room temperature. Then, the reaction mixture was centrifuged to deplete PS-TBD. A sample of the reaction mixture (25 µL) containing N-Aco-ABA was then mixed with the oligonucleotides (5'-CCTTCGGTCTCCC-3' or 5'-CCTTCATCTCCC-3', the underlined bases were targeted for modification; Sigma-Aldrich Japan; HPLC-purification grade; 1 nmol/µL in 1 mM Tris-HCl (pH 8.0); 50 µL), 10 mM sodium citrate buffer (pH 7.0, 40 µL), and H₂O (135 µL), and the mixture was incubated at 55 °C for 24 h. Twenty-five µL of the aqueous layer were subjected to HPLC (using an Agilent 1100 series system equipped with a G1315B photodiode array detector, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) and eluted over 60 min at a flow rate of 1 mL/min using a Cosmoseil 5C₁₈-AR-II column (φ4.6 mm × 250 mm, Nacalai Tesque) with a linear gradient from 0% to 25% acetonitrile (Nacalai Tesque) in 0.1 M triethylamine acetate (pH 7.0). The oligonucleotides containing the dG-C8-N-ABA and dA-N⁶-C2-ABA adducts were eluted at retention times of 40.3 min and 39.5 min, respectively. The oligonucleotides containing the ABA adducts were collected repeatedly to obtain sufficient amounts. The collected fractions were freeze-dried and dissolved at 20 pmol/µL in 1 mM Tris-HCl (pH 8.0). To confirm that the correct modifications had been induced, a sample (10 µL) of the oligonucleotides containing the ABA adducts was digested to nucleotides. The oligonucleotides were mixed with 1 unit (1 µL) of nuclease P1 (Yamasa Shouyu, Chiba, Japan), 0.3 µL of 3 M sodium acetate (pH 5.2), and H₂O (up to 50 µL), before being incubated at 37 °C for 2 h. Then, 5 µL of 1 M Tris-HCl (pH 8.0) and 1 µL of alkaline phosphatase (New England Biolabs, Inc., MA, USA; 10,000 unit/µL) were added and incubated for 2 h at 37 °C. The digestion mixture (50 µL) was separated via HPLC at a flow rate of 1 mL/min using the Cosmoseil 5C₁₈-AR-II column with a linear gradient from 0% to 25% acetonitrile in 0.1 M triethylamine acetate (pH 7.0) for 60 min, followed by isocratic elution of 25% acetonitrile in 0.1 M triethylamine acetate. The UV spectrum of each adduct was identical to those of the chemically synthesized nucleoside standards [28]. The modified oligonucleotides (70 pmol) were mixed with 0.5 µL of 1 mM ATP (Sigma-Aldrich Co.), 1 µL of 10× protruding buffer (TOYOBO Co. Ltd., Osaka, Japan), 0.3 µL of T4 polynucleotide kinase (TOYOBO Co. Ltd.; 10 unit/µL), 0.7 µL of [³²P]-ATP (Perkin-Elmer Japan, Yokohama, Japan; 111 TBq/mmol, 370 MBq/mL), and H₂O (up to 10.0 µL) and incubated for 30 min at 37 °C. After heat inactivation of the enzyme for 20 min at 65 °C, the phosphorylated oligonucleotides were purified by 20% denatured polyacrylamide gel electrophoresis. The slice of gel containing the oligonucleotides was cut out, and the oligonucleotides were eluted from the slice via incubation in 330 µL of elution buffer (pH 8.5) (0.5 M sodium acetate trihydrate and 1 mM EDTA) over 4 h at 37 °C. After being eluted, the oligonucleotides were purified with ethanol precipitation and dried in air. The amount of each oligonucleotide was quantified with a liquid scintillation counter (Tri-Carb 2500 TR; Perkin Elmer Japan). After being quantified, the oligonucleotides were dissolved in 1 pmol/µL combined with 5 mM Tris-HCl (pH 8.0).

2.5. TLS assay using mammalian cultured cells

Fuchs et al. developed a single-strand segregation analytical method involving the introduction of a double-stranded plasmid with a single DNA lesion into *Escherichia coli* [45], and we modified this system for mammalian cells. The ABA-modified plasmid was constructed, and the TLS assay was performed as described previously [46,47] with some modifications. Briefly, pUCSV40H and pUCSV40H + BglII were digested with EcoRV and ScalI, respectively; mixed; and then incubated in order to form a gapped duplex plasmid, as described previously [46]. The gapped duplex plasmid was incubated with a 2-fold molar excess of the purified 13-mer oligonucleotide, which was complementary to the gap sequence except for a bulge in the middle, in the presence of ATP (1 mM) and T4 DNA ligase (New England Biolabs) at 16 °C for 6 min. Unmodified 13-mer oligonucleotides were used to construct the control plasmids. The covalently closed circular plasmids were purified via equilibrium centrifugation on a CsCl gradient.

For the cellular TLS assay, XP2OS(SV) cells were used to prevent the adducts from being eliminated by NER. The cells were transfected with the plasmids (150 ng) using a Qiagen Effectene Reagent kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), as described previously [46]. Seventy-two hours after the transfection procedure, the plasmids were extracted from the cells using the QIAprep spin miniprep kit (Qiagen), digested with

the restriction endonuclease *Dpn*I (New England Biolabs) to remove the unreplicated plasmids, and introduced into *E. coli* strain DH5α. The *E. coli* was plated onto LB agar plates containing ampicillin, 5-bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-galactoside (X-gal), and isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG). In this system, when the ABA-modified strand was replicated as a template (*i.e.*, TLS occurred), the reading frame of the *lacZ* gene of the progeny plasmids was functional, resulting in the *E. coli* colonies becoming blue. When the opposite strand was replicated (*i.e.*, damage-induced strand loss occurred; DISL), the progeny plasmids contained a dysfunctional reading frame in their *lacZ* genes; hence, the *E. coli* colonies were white. When TLS caused a frameshift during replication, the reading frame of the *LacZ* gene was dysfunctional, and the colony appeared white. However, frameshifts could be distinguished from DISL because the complementary strand of the adducted strand contained a recognition sequence for the *Bgl*II restriction enzyme (5'-AGATCT). In the present study, few progeny plasmids carrying frameshifts were observed (1.6% in dG-C8-N-ABA, 0.6% in dG-N²-C2-ABA, and 0.7% in dA-N⁶-C2-ABA). Therefore, the blue colonies were simply considered to have been produced by TLS, while the white colonies were considered to have been produced by DISL. Accordingly, the frequency of TLS was calculated using the following equation:

$$\text{TLS frequency} = \frac{\text{number of blue colonies}}{\text{number of total colonies}} \times 100.$$

We examined at least 1500 colonies for each adduct. The relative TLS frequency value was calculated as the ratio (%) of the TLS frequency of the modified plasmid to that of the non-modified plasmid; *i.e.*,

The relative TLS frequency value

$$= \frac{\text{TLS frequency of ABA modified plasmid}}{\text{TLS frequency of unmodified control plasmid}} \times 100.$$

Statistical comparisons between each mono-modified plasmid and the non-modified control plasmid were carried out using Student's *t*-test for one-tailed comparisons.

The plasmids in which TLS occurred were purified from the blue bacteria cultured in 2 mL of LB media and sequenced with the ABI 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA) to identify any mutations.

3. Results

3.1. DNA adduct production in cultured human cells

The viability of the HepG2 cells after 3-NBA treatment varied in a concentration- and duration-dependent manner. The HepG2 cells displayed viability of greater than 85% after treatment with concentrations of 0.01 µg/mL or less for 24 h. However, their viability decreased to 82.0 ± 3.0%, 68.0 ± 4.5% and 35.0 ± 3.2% after 1, 6 and 24 h treatment with 0.1 µg/mL of 3-NBA, respectively. After treatment with 1 µg/mL of 3-NBA, the viability of the cells decreased to 80.7 ± 2.1%, 60.5 ± 3.6% and 30.5 ± 3.4% after 1 h, 6 h and 24 h treatment, respectively (data not shown). Using LC-MS/MS and SI-labeled internal standards, we quantified adduct production in the HepG2 cells treated with 3-NBA. The resultant standard curves are shown in Fig. 2A. The dose-response relationship and time course of the production of each adduct in the 3-NBA-treated HepG2 cells are shown in Fig. 2B–D. dG-C8-N-ABA and dG-N²-C2-ABA were identified as major adducts in the 3-NBA-treated HepG2 cells, and dA-N⁶-C2-ABA was found to be a minor adduct. Treatment with 0.01 µg/mL 3-NBA for 15 min produced 123 ± 27 dG-C8-N-ABA and 67 ± 5.7 dG-N²-C2-ABA per 10⁷ dG, and treatment with 1 µg/mL for 24 h induced the production of 2835 ± 1509 dG-C8-N-ABA and 3373 ± 1173 dG-N²-C2-ABA per 10⁷ dG in the HepG2 cells. Meanwhile, treatment with 0.01 µg/mL 3-NBA for 15 min produced 14 ± 4.2 dA-N⁶-C2-ABA per 10⁷ dA, and treatment with 1 µg/mL for 24 h resulted in a dA-N⁶-C2-ABA frequency of 877 ± 330 per 10⁷ dA in the HepG2 cells. The amount of dG-C8-N-ABA and dG-N²-C2-ABA were larger and increased more rapidly than that of dA-N⁶-C2-ABA. Despite treatment with a high concentration of 3-NBA (1 µg/mL), the frequency of dA-N⁶-C2-ABA did not reach 1000 adducts per 10⁷ dA even after 24 h exposure. After treatment with low (0.01 µg/mL) and medium (0.1 µg/mL) concentrations of 3-NBA, reductions in the levels of the adducts were observed in a treatment period-dependent manner. This tendency was particularly marked for dG-C8-N-ABA and dA-N⁶-C2-ABA, probably due to DNA repair.

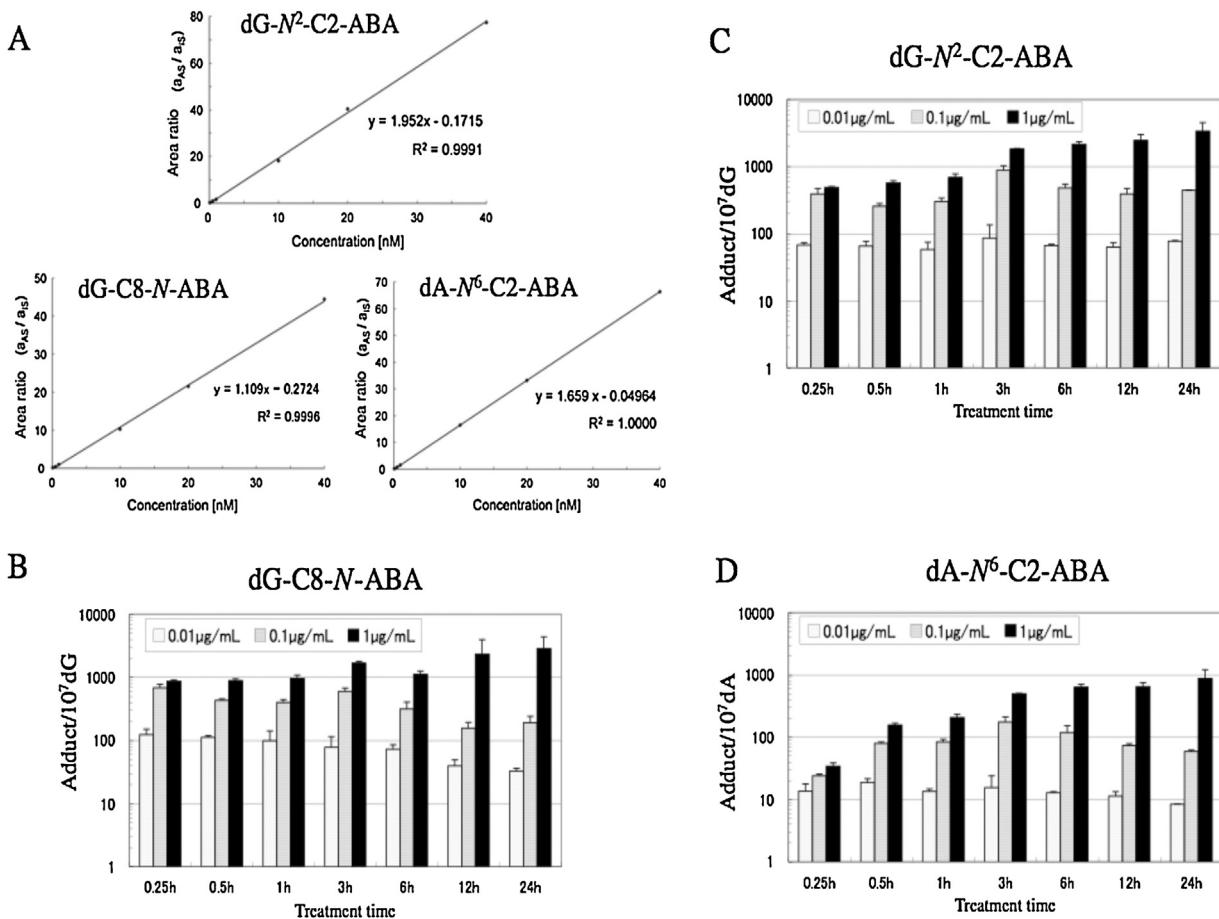


Fig. 2. Formation of DNA adducts in human hepatoma HepG2 cells treated with 3-NBA. (A) Standard curves for the adducts obtained by LC-MS/MS analysis using SI-labeled adduct standards. The SI-labeled standards (1 nM) and the indicated concentrations of the unlabeled standards were mixed and injected into the LC-MS/MS system. “ a_{AS} ” and “ a_{AS} ” indicate the peak areas of the SI-labeled adduct and unlabeled adduct, respectively. (B–D) Dose-response relationship and time-course of adduct production in human hepatoma HepG2 cells treated with 3-NBA. The cells were treated with the indicated conditions of 3-NBA, and then their genomic DNA was extracted. The amounts of the dG-C8-N-ABA (B), dG-N²-C2-ABA (C), and dA-N⁶-C2-ABA (D) adducts per 10^7 dG or dA in genomic DNA were determined using LC-MS/MS. The mean values of at least three independent experiments are plotted together with the S.D.

3.2. DNA adduct removal by DNA repair

After treatment with 3-NBA (0.01 μg/mL for 1 h), the HepG2 cells were cultured for various periods to allow DNA repair to occur. Then, the DNA was extracted, and the adducts were quantified with LC-MS/MS, as described in the previous section. The amount of residual adducts is shown in Fig. 3. The cellular DNA repair system removed dG-C8-N-ABA and dA-N⁶-C2-ABA more efficiently than dG-N²-C2-ABA. Six hours after the 3-NBA treatment, $74.3 \pm 14.5\%$ of the dG-C8-N-ABA adducts and $77.0 \pm 9.8\%$ of the dA-N⁶-C2-ABA adducts remained in the HepG2 cells, whereas $108 \pm 6.2\%$ of the dG-N²-C2-ABA adducts were still present. After a 24-h repair period, although $86.4 \pm 11.1\%$ of the dG-N²-C2-ABA adducts remained, only $51.7 \pm 2.7\%$ of the dG-C8-N-ABA adducts and $37.8 \pm 1.7\%$ of the dA-N⁶-C2-ABA adducts were present in the HepG2 cells. Six hours later, similar amount of dG-C8-N-ABA and dA-N⁶-C2-ABA remained, but the amount of dA-N⁶-C2-ABA decreased more than that of dG-C8-N-ABA between 12 and 24 h. Of the three adducts, the dG-N²-C2-ABA adducts were repaired least efficiently.

3.3. TLS assay involving cultured human cells

Using site-directed mono-modified shuttle vector plasmids (Fig. 4A), we analyzed TLS across DNA adducts in human

NER-deficient XPA cells. The relative TLS frequency values of the dG-C8-N-ABA, dG-N²-C2-ABA and dA-N⁶-C2-ABA adducts were $16.9 \pm 2.7\%$, $33.3 \pm 6.2\%$ and $43.1 \pm 7.5\%$, respectively (Fig. 4B). All of the adducts displayed significantly lower TLS frequencies than the unmodified control plasmid ($p < 0.01$). This result indicates that all of the adducts inhibited DNA synthesis; however, replication (i.e., TLS) did occur to a certain extent (the relative TLS frequency values of the dG-C8-N-ABA, dG-N²-C2-ABA and dA-N⁶-C2-ABA adducts were 16.9%, 33.3% and 43.1%, respectively). Among these adducts, the dG-C8-N-ABA adduct blocked DNA replication to a significantly greater extent than the other adducts ($p < 0.01$). The TLS frequency of dA-N⁶-C2-ABA was significantly higher than those of the other adducts ($p < 0.05$).

The progeny plasmids that displayed TLS were sequenced to reveal the types of mutation that they contained and their frequencies. As shown in Fig. 4C, the frequency of mutagenic TLS events relative to all TLS events was 30.6% for the dG-C8-N-ABA adduct, 12.2% for the dG-N²-C2-ABA adduct, and 12.0% for the dA-N⁶-C2-ABA adduct. TLS of dG-N²-C2-ABA and dA-N⁶-C2-ABA induced mutations less frequently than TLS of dG-C8-N-ABA. The types of mutation induced by TLS across the ABA adducts were revealed by base sequence analysis of the sites opposite the adducts. The types of base(s) incorporated into the sites opposite the adducts are shown in Fig. 5. In the site opposite the dG-C8-N-ABA adduct,

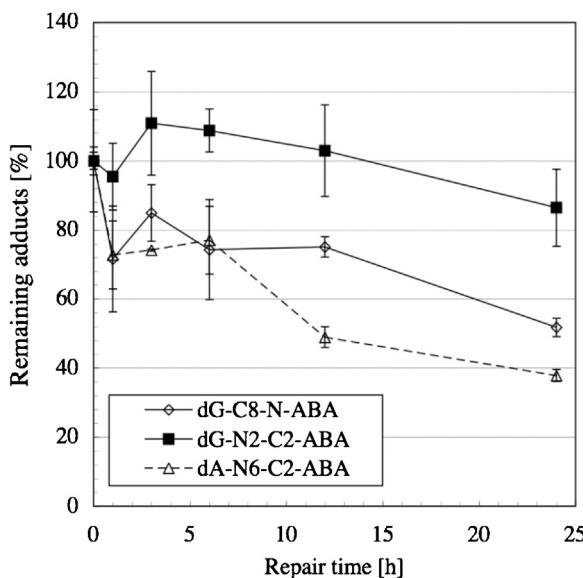


Fig. 3. Removal of the adducts from cellular DNA by the DNA repair system of HepG2 cells. After the HepG2 cells had been exposed to 3-NBA (0.01 µg/ml. for 1 h), they were cultured for the indicated time to allow DNA repair. Then, their genomic DNA was extracted, and the adducts within it were quantified with LC-MS/MS. In the graph, the amount of each adduct at 0 h repair was considered to represent 100%. The mean values of at least three independent experiments are plotted together with the S.D.

the correct base (cytosine) was incorporated in most cases (69.4%). Thymine (*i.e.*, a G to A mutation; 15%), adenine (*i.e.*, a G to T mutation; 8.8%), and guanine (*i.e.*, a G to C mutation; 2.0%) were incorporated as incorrect bases. Multiple mutations were also found in 3.4% of TLS-positive progeny plasmids. Misincorporation was also observed at the adjacent site (0.7%) and at positions 2 bases away from the adduct (0.7%). At the site opposite the dG-N²-C2-ABA adduct, the correct base (cytosine) was incorporated in most cases (87.9%), and thymine (*i.e.*, G to A mutation; 2.2%) and adenine (*i.e.*, G to T mutation; 10%) were incorporated as incorrect bases. At the site opposite the dA-N⁶-C2-ABA adduct, the correct base (thymine) was incorporated in most cases (87.9%). Cytosine (*i.e.*, A to G mutation; 9.3%) and adenine (*i.e.*, an A to T mutation; 0.8%) were also incorporated as incorrect bases. Mutations at unadducted sites and multiple mutations (*i.e.*, plural base substitutions) were rarely observed in the dG-C8-N-ABA and dA-N⁶-C2-ABA plasmids and were categorized as “others” (Fig. 5).

4. Discussion

On the basis of the data obtained in the present study, we propose a model that attempts to describe adduct formation and repair, and TLS across such adducts, in human cells exposed to 3-NBA (Fig. 6). Assuming that the mutagenicity of a mutagen is manifested as the sum of the mutagenicity of various DNA adducts caused by the mutagen, we also roughly determined the degree of contribution of these 3-NBA-derived adducts to the mutagenicity using a following equation: [adduct formation] × [1 – repair efficiency] × [TLS efficiency] × [frequency of mutagenic TLS] (Table 1).

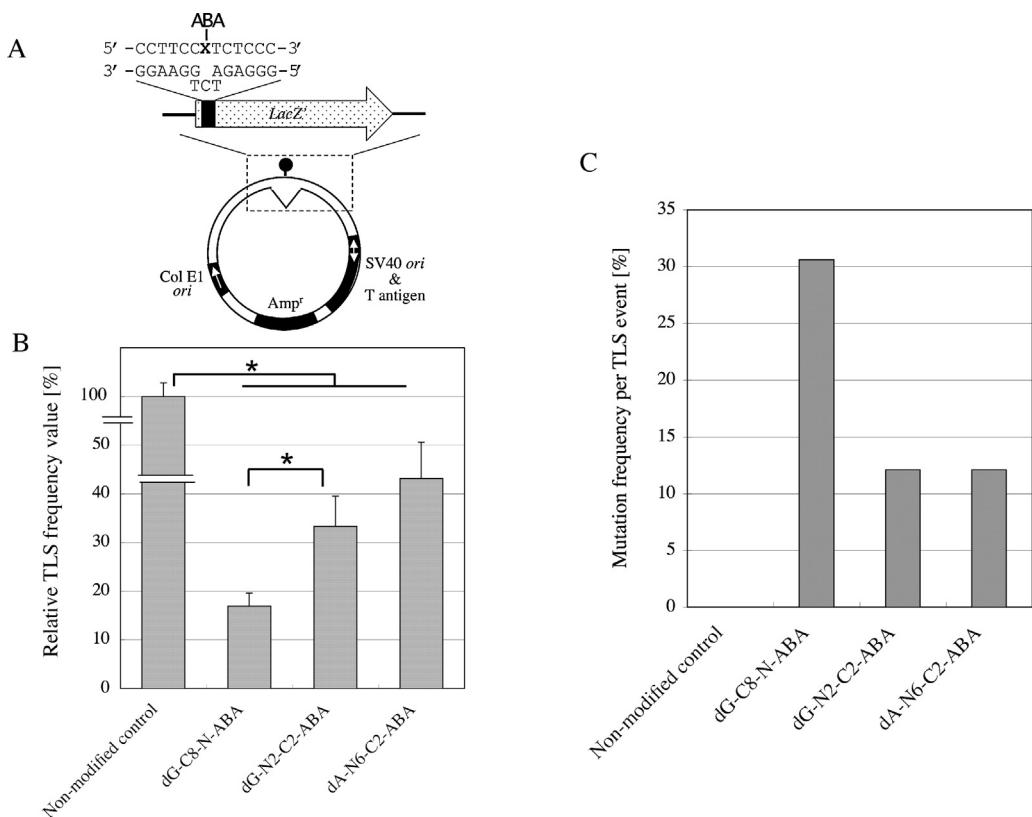


Fig. 4. Replication efficiency across the adducts in human XPA cells. The site-specific mono-modified plasmids were propagated in nucleotide excision repair-deficient XP cells. (A) Structure of the mono-modified plasmids. (B) Replication efficiency across the adducts. The relative TLS frequency value represents the ratio (%) of the TLS frequency of the modified plasmid to that of the non-modified plasmid. The TLS frequency of each plasmid was calculated using the equation: [number of blue colonies]/[number of total colonies] × 100. We counted at least 1500 colonies in each adduct. See Section 2. The mean values of at least three independent experiments are plotted together with the S.D. Asterisks indicate a significant difference ($p < 0.05$ in Student's *t*-test). (C) Frequency of mutagenic TLS events relative to all TLS events. The TLS-positive progeny plasmids (around 200 progeny plasmids were examined for each adduct) were sequenced, and the mutation frequency was calculated.

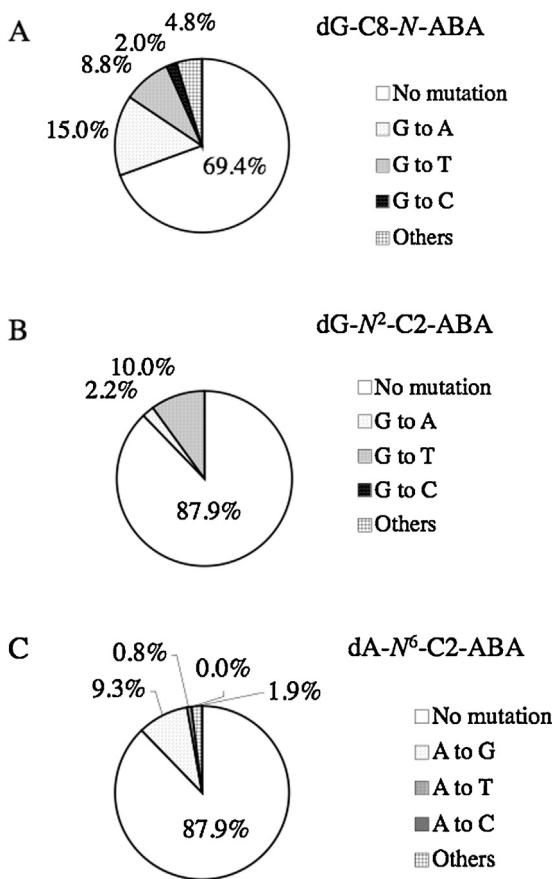


Fig. 5. Types of mutations induced by the adducts in human XPA cells. The progeny plasmids of the mono-modified plasmids obtained in Fig. 4C were sequenced.

LC-MS/MS analysis revealed that treatment with 3-NBA induced the production of dG-C8-N-ABA and dG-N²-C2-ABA as major adducts and dA-N⁶-C2-ABA as a minor adduct in HepG2 cells (Figs. 2 and 6 and “Adduct formation” in Table 1). Cellular DNA repair mechanisms efficiently removed both dG-C8-N-ABA and

dA-N⁶-C2-ABA; however, they were less efficient at removing dG-N²-C2-ABA (Figs. 3 and 6 and “1 – (repair efficiency)” in Table 1). The TLS assay indicated that the remaining dG-C8-N-ABA blocked DNA replication markedly, while dG-N²-C2-ABA and dA-N⁶-C2-ABA induced more moderate replication arrest (Figs. 4 and 6, and “1 – (TLS efficiency)” in Table 1). Mutagenic TLS occurred more frequently during replication across dG-C8-N-ABA adducts than during replication across dG-N²-C2-ABA or dA-N⁶-C2-ABA adducts (Figs. 5 and 6 and “Frequency of mutagenic TLS” in Table 1). After all, dG-C8-N-ABA adduct was the greatest contributor to both the replication block and the mutagenesis followed by dG-N²-C2-ABA adduct among these three adducts in human cells (Table 1 “Contribution to the replication block” and “Contribution to the mutagenesis”, respectively).

The above estimation and the types of mutation induced by each adduct indicate that 3-NBA induces primarily G to A and G to T mutations in human cells (Table 1 and Fig. 5). According to the IARC TP53 Database (R16, November 2012), both G:C to A:T and G:C to T:A are predominant mutations found in p53 tumor suppressor gene in human lung tumor samples [48]. Although contribution of 3-NBA to human lung cancer development is unclear, our results do not contradict these mutation signatures found in actual lung cancers. Furthermore, G:C to T:A transversions were detected at high frequencies in murine cells and Muta Mouse mice treated with 3-NBA [5,49].

Note that in the present study we assessed the adduct formation and repair in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells, and TLS in human skin fibroblast cell line XP2OS(SV). Although 3-NBA is regarded as a risk factor for human lung cancer, we used HepG2 cells since the production level of the adducts was high enough due to their metabolic activation capability. In fact, the level in a human embryonic lung fibroblast cell line WI38VA13 was smaller than the 1/10–1/100 of that in HepG2 (data not shown). In addition, Arlt et al. reported that the low level of DNA adducts in the lung of Muta Mouse mice treated with 3-NBA, whereas they observed the high level of DNA adducts in the liver [5]. In the cellular TLS analysis, the cells that lack NER should be used to prevent the adducts from being eliminated before DNA replication. Since human lung and liver cells that lack NER were not available, we used human skin XP2OS(SV) cells for the TLS assay. Therefore, the adduct production, repair and

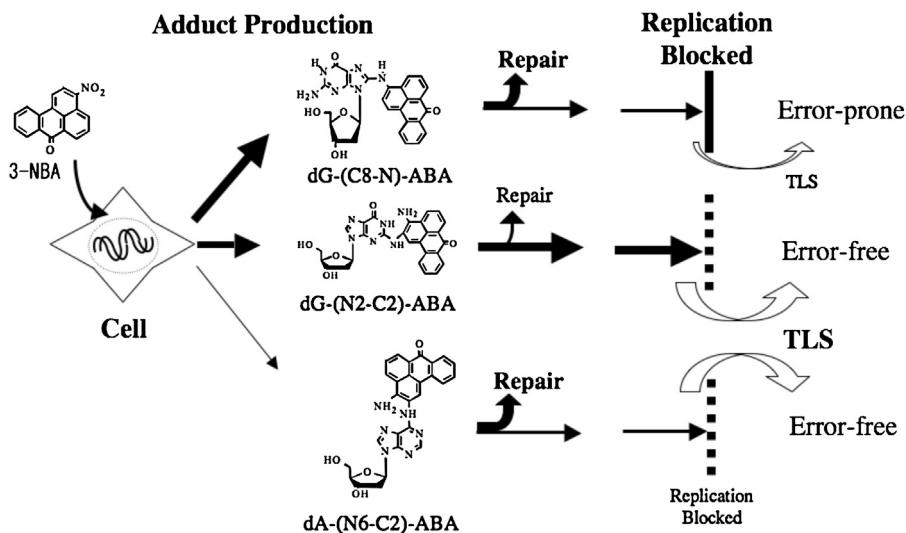


Fig. 6. Summary of the study. 3-NBA induced the formation of both dG-C8-N-ABA and dG-N²-C2-ABA as major adducts (the bold arrows) and dA-N⁶-C2-ABA as a minor adduct (the fine arrow) in the human HepG2 cells. The cellular DNA repair system efficiently removed both dG-C8-N-ABA and dA-N⁶-C2-ABA, but was less efficient at removing dG-N²-C2-ABA from DNA (the thicknesses of the curved and straight arrows symbolize the proportions of DNA adducts that were repaired and unrepaired, respectively). The remaining dG-C8-N-ABA adducts markedly blocked DNA replication (the bold vertical line), while the residual dG-N²-C2-ABA and dA-N⁶-C2-ABA adducts induced more moderate replication arrest (the dashed lines). Mutagenic TLS occurred more readily during replication across dG-C8-N-ABA (i.e., this process was error prone) than across dG-N²-C2-ABA and dA-N⁶-C2-ABA. See also Table 1.

Table 1

Contribution of three 3-NBA-derived adducts to the mutagenesis.

Adduct formation ^a (A)	1 – (repair efficiency) ^b (B)	TLS efficiency ^c (C)	1 – (TLS efficiency) ^c (D)	Frequency of mutagenic TLS ^d (E)	Contribution to ^e	
					Replication block (A × B × D)	Mutagenesis (A × B × C × E)
dG-C8-N-ABA	99	0.52	0.17	0.83	0.31	43
dG-N ² -C2-ABA	58	0.86	0.33	0.67	0.12	33
dA-N ⁶ -C2-ABA	13	0.38	0.43	0.57	0.12	2.8

^a The amounts [per 10⁷ dG/dA] are from Figs. 2B–D at 1-h exposure with 0.01 µg/mL of 3-NBA, that is the dose applied in the DNA repair experiment (Fig. 3).

^b The relative values are from Fig. 3 at 24-h repair time.

^c The relative values are from Fig. 4B.

^d The relative values are from the frequency of mutagenic TLS events relative to all TLS events in Fig. 4C.

^e Relative values per 10⁷ normal dG or dA.

TLS should be measured using human lung cells for more precise evaluation of the risk for lung cancer.

Various studies have suggested that nitro-PAH do not react directly with DNA but require metabolic activation by cellular enzymes including cytochrome P450, nitroreductases, N- and O-acetyltransferases, and sulfotransferases, to form DNA adducts. Various enzymes that catalyze the oxidation and conjugation of xenobiotics are expressed or induced in the HepG2 cells [50]. Therefore, HepG2 cells are frequently used in *in vitro* models for human biotransformation studies [51]. Our previous study of adduct formation, in which we used the ³²P-postlabeling method, revealed that the frequency (*i.e.*, relative adduct labeling) of dA-N⁶-C2-ABA was higher than that of dG-C8-N-ABA in HepG2 cells treated with 3-NBA [28]. The discrepancies between the results obtained with LC-MS/MS and the ³²P-postlabeling method might have been due to our use of butanol extraction in the previous study, which was not performed in the present study. Differences in the labeling efficiency of T4 polynucleotide kinase might also have affected our results since we assumed that the efficiencies were constant among adducts in the ³²P-postlabeling study.

Previously, we also studied DNA damage and mutations using a *supF* shuttle vector plasmid that was treated with a reactive derivative of 3-NBA, N-Aco-ABA, and then propagated in human cells. The previous study indicated that these ABA-induced adducts were repaired, and that adenine adducts were particularly efficiently repaired by the NER pathway [52]. This agrees with the present result that dA-N⁶-C2-ABA was efficiently removed by the cellular DNA repair system. Indeed, mutations at A:T sites were found more frequently in XP cells than in wild type cells in the abovementioned previous study [52]. Moreover, dA-N⁶-C2-ABA induced A to G base substitutions in the present study (Fig. 5), which accords with the fact that A:T to G:C transitions were frequently encountered in the *supF* gene propagated in the abovementioned XP cells [52].

In the present study, dG-N²-C2-ABA mainly induced G to T base substitutions (Fig. 5). The removal efficiency of dG-N²-C2-ABA by NER was low (Fig. 3); therefore, the NER-proficient/deficient status of a cell should not greatly affect mutagenesis by dG-N²-C2-ABA adducts within its DNA. In fact, in the abovementioned study using shuttle vector plasmids, the frequency of G:C to T:A transversions did not differ between NER-proficient WI38-VA13 cells and NER-deficient XP2(OS)SV cells [52].

The dG-C8-N-ABA adduct, a potent inhibitor of DNA replication, induced mutations more frequently than dG-N²-C2-ABA and dA-N⁶-C2-ABA, which are less potent inhibitors of replication (Figs. 4 and 5). Correlations between DNA synthesis inhibition and mutation frequency have been reported for other DNA adducts. The frequencies of mutations induced by B[a]P-dG and 4-hydroxyequilenin-dC (4-OHEN-dC) were revealed by Shachar et al. using a TLS assay involving gapped plasmids [53]. Their results showed that the DNA synthesis inhibition potency of an adduct

is correlated with its mutagenic potency; *i.e.*, 4-OHEN-dC inhibits DNA replication more strongly and induces more mutations than B[a]P-dG. Different TLS pathways, that Shachar et al. proposed [53], might be involved in these three adducts derived from 3-NBA.

Usually, nitro-PAH form several kinds of DNA adduct in organisms. Conventional mutation assays provide data on the overall mutagenicity of a compound. However, the mutagenic effects of the individual DNA adducts induced by a compound might differ. Therefore, evaluations of both the overall mutagenic potential of a compound and the individual mutagenic effects of each adduct that it produces are necessary to understand the mutagenic potential of a compound. This study increases our understanding of the molecular mechanism of the mutagenesis and carcinogenesis induced by 3-NBA.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

We thank Dr. R.P.P. Fuchs (CNRS) for his cooperation with the mono-modified plasmids. This study was supported by Grants-in-Aid (Project Numbers 17710047, 18101003, 19710058, and 24310047) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan.

References

- [1] T. Enya, H. Suzuki, T. Watanabe, T. Hirayama, Y. Hisamatsu, 3-Nitrobenzanthrone, a powerful bacterial mutagen and suspected human carcinogen found in diesel exhaust and airborne particulates, Environ. Sci. Technol. 31 (1997) 2772–2776.
- [2] T. Murahashi, E. Iwanaga, T. Watanabe, T. Hirayama, Determination of the mutagen 3-nitrobenzanthrone in rainwater collected in Kyoto, Japan, J. Health Sci. 49 (2003) 386–390.
- [3] T. Murahashi, T. Watanabe, S. Otake, Y. Hattori, T. Takamura, K. Wakabayashi, T. Hirayama, Determination of 3-nitrobenzanthrone in surface soil by normal phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, J. Chromatogr. A 992 (2003) 101–107.
- [4] T. Watanabe, T. Hasei, T. Yoshifumi, S. Otake, T. Murahashi, T. Takamura, T. Hirayama, K. Wakabayashi, Mutagenic activity and quantification of nitroarenes in surface soil in the Kinki region of Japan, Mutat. Res. 538 (2003) 121–131.
- [5] V.M. Arlt, L. Zhan, H.H. Schmeiser, M. Honma, M. Hayashi, D.H. Phillips, T. Suzuki, DNA adducts and mutagenic specificity of the ubiquitous environmental pollutant 3-nitrobenzanthrone in Muta Mouse, Environ. Mol. Mutagen. 43 (2004) 186–195.
- [6] V.M. Arlt, K.J. Cole, D.H. Phillips, Activation of 3-nitrobenzanthrone and its metabolites to DNA-damaging species in human B-lymphoblastoid MCL-5 cells, Mutagenesis 19 (2004) 149–156.
- [7] E. Lamy, F. Kassis, R. Gminski, H.H. Schmeiser, V. Mersch-Sundermann, 3-Nitrobenzanthrone (3-NBA) induced micronucleus formation and DNA damage in human hepatoma (HepG2) cells, Toxicol. Lett. 146 (2004) 103–109.
- [8] E. Nagy, C. Johansson, M. Zeisig, L. Moller, Oxidative stress and DNA damage caused by the urban air pollutant 3-NBA and its isomer 2-NBA in human lung

- cells analyzed with three independent methods, *J. Chromatogr. B* 827 (2005) 94–103.
- [9] P.T. Phousongphouang, A.J. Grosovsky, D.A. Eastmond, M. Covarrubias, J. Arey, The genotoxicity of 3-nitrobenzanthrone and the nitropyrene lactones in human lymphoblasts, *Mutat. Res.* 472 (2000) 93–103.
- [10] E. Nagy, M. Zeisig, K. Kawamura, Y. Hisamatsu, A. Sugeta, S. Adachi, L. Moller, DNA-adduct and tumor formations in rats after intratracheal administration of the urban air pollutant 3-nitrobenzanthrone, *Carcinogenesis* 26 (2005) 1821–1828.
- [11] V.M. Arlt, 3-Nitrobenzanthrone, a potential human cancer hazard in diesel exhaust and urban air pollution: a review of the evidence, *Mutagenesis* 20 (2005) 399–410.
- [12] J.M. Essigmann, M.L. Wood, The relationship between the chemical structures and mutagenic specificities of the DNA lesions formed by chemical and physical mutagens, *Toxicol. Lett.* 67 (1993) 29–39.
- [13] V.M. Arlt, C.A. Bieler, W. Mier, M. Wiessler, H.H. Schmeiser, DNA adduct formation by the ubiquitous environmental contaminant 3-nitrobenzanthrone in rats determined by ^{32}P -postlabeling, *Int. J. Cancer* 93 (2001) 450–454.
- [14] V.M. Arlt, H. Glatt, E. Muckel, U. Pabel, B.L. Sorg, H.H. Schmeiser, D.H. Phillips, Metabolic activation of the environmental contaminant 3-nitrobenzanthrone by human acetyltransferases and sulfotransferase, *Carcinogenesis* 23 (2002) 1937–1945.
- [15] V.M. Arlt, H. Glatt, E. Muckel, U. Pabel, B.L. Sorg, A. Seidel, H. Frank, H.H. Schmeiser, D.H. Phillips, Activation of 3-nitrobenzanthrone and its metabolites by human acetyltransferases, sulfotransferases and cytochrome P450 expressed in Chinese hamster V79 cells, *Int. J. Cancer* 105 (2003) 583–592.
- [16] V.M. Arlt, A. Hewer, B.L. Sorg, H.H. Schmeiser, D.H. Phillips, M. Stiborova, 3-Aminobenzanthrone, a human metabolite of the environmental pollutant 3-nitrobenzanthrone, forms DNA adducts after metabolic activation by human and rat liver microsomes: evidence for activation by cytochrome P450 1A1 and P450 1A2, *Chem. Res. Toxicol.* 17 (2004) 1092–1101.
- [17] V.M. Arlt, M. Stiborova, C.J. Henderson, M.R. Osborne, C.A. Bieler, E. Frei, V. Martinek, B. Sokpo, C.R. Wolf, H.H. Schmeiser, D.H. Phillips, The environmental pollutant and potent mutagen 3-nitrobenzanthrone forms DNA adducts after reduction by NAD(P)H:quinone oxidoreductase and conjugation by acetyltransferases and sulfotransferases in human hepatic cytosols, *Cancer Res.* 65 (2005) 2644–2652.
- [18] V.M. Arlt, C.J. Henderson, C.R. Wolf, H.H. Schmeiser, D.H. Phillips, M. Stiborova, Bioactivation of 3-aminobenzanthrone, a human metabolite of the environmental pollutant 3-nitrobenzanthrone: evidence for DNA adduct formation mediated by cytochrome P450 enzymes and peroxidases, *Cancer Lett.* 234 (2006) 220–231.
- [19] M. Kawanishi, T. Enya, H. Suzuki, H. Takebe, S. Matsui, T. Yagi, Postlabelling analysis of DNA adducts formed in human hepatoma cells treated with 3-nitrobenzanthrone, *Mutat. Res.* 470 (2000) 133–139.
- [20] J. Borlak, T. Hansen, Z. Yuan, H.C. Sikka, S. Kumar, S. Schmidbauer, H. Frank, J. Jacob, A. Seidel, Metabolism and DNA-binding of 3-nitrobenzanthrone in primary rat alveolar type II cells, in human fetal bronchial, rat epithelial and mesenchymal cell lines, *Polycycl. Aromat. Compd.* 21 (2000) 73–86.
- [21] V.M. Arlt, B.L. Sorg, M. Osborne, A. Hewer, A. Seidel, H.H. Schmeiser, D.H. Phillips, DNA adduct formation by the ubiquitous environmental pollutant 3-nitrobenzanthrone and its metabolites in rats, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300 (2003) 107–114.
- [22] V.M. Arlt, M. Stiborova, A. Hewer, H.H. Schmeiser, D.H. Phillips, Human enzymes involved in the metabolic activation of the environmental contaminant 3-nitrobenzanthrone: evidence for reductive activation by human NADPH:cytochrome P450 reductase, *Cancer Res.* 63 (2003) 2752–2761.
- [23] C.A. Bieler, V.M. Arlt, M. Wiessler, H.H. Schmeiser, DNA adduct formation by the environmental contaminant 3-nitrobenzanthrone in V79 cells expressing human cytochrome P450 enzymes, *Cancer Lett.* 200 (2003) 9–18.
- [24] C.A. Bieler, M. Cornelius, R. Klein, V.M. Arlt, M. Wiessler, D.H. Phillips, H.H. Schmeiser, DNA adduct formation by the environmental contaminant 3-nitrobenzanthrone after intratracheal instillation in rats, *Int. J. Cancer* 116 (2005) 833–838.
- [25] M.R. Osborne, V.M. Arlt, C. Kliem, W.E. Hull, A. Mirza, C.A. Bieler, H.H. Schmeiser, D.H. Phillips, Synthesis, characterisation and ^{32}P -postlabeling analysis of DNA adducts derived from the environmental contaminant 3-nitrobenzanthrone, *Chem. Res. Toxicol.* 18 (2005) 1056–1070.
- [26] M. Kawanishi, T. Enya, H. Suzuki, H. Takebe, S. Matsui, T. Yagi, Mutagenic specificity of a derivative of 3-nitrobenzanthrone in the supF shuttle vector plasmids, *Chem. Res. Toxicol.* 11 (1998) 1468–1473.
- [27] V.M. Arlt, H.H. Schmeiser, M.R. Osborne, M. Kawanishi, T. Kanno, T. Yagi, D.H. Phillips, T. Takamura-Enya, Identification of three major DNA adducts formed by the carcinogenic air pollutant 3-nitrobenzanthrone in rat lung at the C8 and N2 position of guanine and at the N6 position of adenine, *Int. J. Cancer* 118 (2006) 2139–2146.
- [28] T. Kanno, M. Kawanishi, T. Takamura-Enya, V.M. Arlt, D.H. Phillips, T. Yagi, DNA adduct formation in human hepatoma cells treated with 3-nitrobenzanthrone: analysis by the ^{32}P -postlabeling method, *Mutat. Res.* 634 (2007) 184–191.
- [29] G. Gamboa da Costa, R. Singh, V.M. Arlt, A. Mirza, M. Richards, T. Takamura-Enya, H.H. Schmeiser, P.B. Farmer, D.H. Phillips, Quantification of 3-nitrobenzanthrone-DNA adducts using online column-switching HPLC-electrospray tandem mass spectrometry, *Chem. Res. Toxicol.* 22 (2009) 1860–1868.
- [30] E.C. Friedberg, G.C. Walker, W. Siede, R.D. Wood, R.A. Schultz, T. Ellenberger, *DNA Repair and Mutagenesis*, ASM Press, Washington, DC, 2006.
- [31] E.C. Friedberg, Suffering in silence: the tolerance of DNA damage, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6 (2005) 943–953.
- [32] M.F. Goodman, Error-prone repair DNA polymerases in prokaryotes and eukaryotes, *Annu. Rev. Biochem.* 71 (2002) 17–50.
- [33] A.R. Lehmann, Replication of damaged DNA by translesion synthesis in human cells, *FEBS Lett.* 579 (2005) 873–876.
- [34] A.R. Lehmann, Translesion synthesis in mammalian cells, *Exp. Cell Res.* 312 (2006) 2673–2676.
- [35] A.J. Rattray, J.N. Strathern, Error-prone DNA polymerases: when making a mistake is the only way to get ahead, *Annu. Rev. Genet.* 37 (2003) 31–66.
- [36] A. Vaisman, A.R. Lehmann, R. Woodgate, DNA polymerases eta and iota, *Adv. Protein Chem.* 69 (2004) 205–228.
- [37] A.R. Lehmann, A. Niimi, T. Ogi, S. Brown, S. Sabbioneda, J.F. Wing, P.L. Kanouche, C.M. Green, Translesion synthesis: Y-family polymerases and the polymerase switch, *DNA Repair* 6 (2007) 891–899.
- [38] Y. Zhang, F. Yuan, X. Wu, O. Rechkoblit, J.S. Taylor, N.E. Geacintov, Z. Wang, Error-prone lesion bypass by human DNA polymerase eta, *Nucleic Acids Res.* 28 (2008) 4717–4724.
- [39] C. Masutani, R. Kusumoto, A. Yamada, N. Dohmae, M. Yokoi, M. Yuasa, M. Araki, S. Iwai, K. Takio, F. Hanaoka, The XPV (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase eta, *Nature* 399 (1999) 700–704.
- [40] H. Takebe, S. Nii, M.I. Ishii, H. Utsumi, Comparative studies of host-cell reactivation, colony forming ability and excision repair after UV irradiation of xeroderma pigmentosum, normal human and some other mammalian cells, *Mutat. Res.* 25 (1974) 383–390.
- [41] K. Kato, E. Yamamura, M. Kawanishi, T. Yagi, T. Matsuda, A. Sugiyama, Y. Uno, Application of the DNA adductome approach to assess the DNA-damaging capability of in vitro micronucleus test-positive compounds, *Mutat. Res.* 721 (2011) 21–26.
- [42] T. Takamura-Enya, M. Kawanishi, T. Yagi, Y. Hisamatsu, Structural identification of DNA adducts derived from 3-nitrobenzanthrone, a potent carcinogen present in the atmosphere, *Chem. Asian J.* 2 (2007) 1174–1185.
- [43] M. Lukin, T. Zaliznyak, F. Johnson, C.R. de Los Santos, Incorporation of 3-aminobenzanthrone into 2'-deoxyoligonucleotides and its impact on duplex stability, *J. Nucleic Acids* 2011 (2011) 521035.
- [44] T. Takamura-Enya, S. Enomoto, K. Wakabayashi, Palladium-catalyzed direct N-arylation of nucleosides, nucleotides, and oligonucleotides for efficient preparation of dG-N² adducts with carcinogenic amino-/nitroarenes, *J. Org. Chem.* 71 (2006) 5599–5606.
- [45] N. Koffel-Schwartz, F. Coin, X. Veautre, R.P. Fuchs, Cellular strategies for accommodating replication-hindering adducts in DNA: control by the SOS response in *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93 (1996) 7805–7810.
- [46] T. Sawai, M. Kawanishi, T. Takamura-Enya, T. Yagi, Establishment of a method for analyzing translesion synthesis across a single bulky adduct in human cells, *Genes Environ.* 31 (2009) 24–30.
- [47] C. Punchihewa, A. Inoue, A. Hishiki, Y. Fujikawa, M. Connelly, B. Evison, Y. Shao, R. Heath, I. Kuraoka, P. Rodrigues, H. Hashimoto, M. Kawanishi, M. Sato, T. Yagi, N. Fujii, Identification of a small molecule PCNA inhibitor that disrupts interactions with PIP-Box proteins and inhibits DNA replication, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 14289–14300.
- [48] A. Petitjean, E. Mathe, S. Kato, C. Ishioka, S.V. Tavtigian, P. Hainaut, M. Olivier, Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database, *Hum. Mutat.* 28 (2007) 622–629.
- [49] J. vom Brocke, A. Krais, C. Whibley, M.C. Hollstein, H.H. Schmeiser, The carcinogenic air pollutant 3-nitrobenzanthrone induces GC to TA transversion mutations in human p53 sequences, *Mutagenesis* 24 (2009) 17–23.
- [50] S. Knasmuller, W. Parzefall, R. Sanyal, S. Ecker, C. Schwab, M. Uhl, V. Mersch-Sundermann, G. Williamson, G. Hietsch, T. Langer, F. Darroudi, A.T. Natarajan, Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens, *Mutat. Res.* 402 (1998) 185–202.
- [51] S. Wilkening, F. Stahl, A. Bader, Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line HepG2 with regard to their biotransformation properties, *Drug Metab. Dispos.* 31 (2003) 1035–1042.
- [52] H. Nishida, M. Kawanishi, T. Takamura, T. Yagi, Mutagenic specificity of N-acetoxy-3-aminobenzanthrone, a major metabolically activated form of 3-nitrobenzanthrone, in shuttle vector plasmids propagated in human cells, *Mutat. Res.* 654 (2008) 82–87.
- [53] S. Shachar, O. Ziv, S. Avkin, S. Adar, J. Wittschieben, T. Reißner, S. Chaney, E.C. Friedberg, Z. Wang, T. Carell, N. Geacintov, Z. Livneh, Two-polymerase mechanisms dictate error-free and error-prone translesion DNA synthesis in mammals, *EMBO J.* 28 (2009) 383–393.

化学ループ利用による環境対応型プロセスの研究

研究者名：所属学科 大庭 武泰：応用化学科

1. 研究の目的

地球温暖化の原因物質である CO₂を分離可能なケミカルループ燃焼器の開発を行う。

2. 研究の必要性及び従来の方法

ケミカルループ燃焼法 (CLC) は日本で 1980 年代に提案された技術であり、金属酸化物中の酸素にて燃料を酸化させ、還元された金属を空気中の酸素にて元に戻す。発生する CO₂は水蒸気との混合ガスであるため熱回収後に冷却すれば高濃度高純度にて分離回収できる。近年、欧州等で石炭を燃料とした取り組みが盛んとなり、他の CO₂ 分離回収技術よりも低コストかつ高効率な技術として注目されている。日本においてもようやく再評価され、研究代表者は本技術が提案された研究室にて、ガス燃料に対するベンチ及びパイロットスケール装置の設計運転を行ったため(文献"Application of Fe₂O₃-Al₂O₃ Composite Particles as Solid Looping Material of the Chemical-Loop Combustor"), 受託研究で研究を開始した (2010/10/21 日刊工業新聞 1 面等に掲載)。

その後、将来的に国家プロジェクトとすべく、一般財団法人 石炭エネルギーセンター (JCOAL) での技術検討委員会の下部委員会として、研究代表者を委員長として CLC の実現可能性について調査を行った。引き続き、NEDO の調査研究として、ゼロエミッション石炭火力基盤技術「次世代高効率石炭ガス化技術最適化調査研究」「CO₂ 分離型化学燃焼石炭利用技術に関する検討」を実施している。

3. 期待される効果

地球温暖化の原因物質である CO₂を分離可能なケミカルループ燃焼器の開発ができれば、日本における石炭火力発電への応用に繋がり、将来的には他国への輸出および技術支援を通じて地球温暖化問題に対する国際的な貢献が可能となる。

4. 研究の経過及び結果

4. 1 NEDO プロジェクトへの参画

引き続き、NEDO の調査研究として、ゼロエミッション石炭火力基盤技術「次世代高効率石炭ガス化技術最適化調査研究」「CO₂ 分離型化学燃焼石炭利用技術に関する検討」を実施するにあたり、JCOAL の再委託先として、石炭と酸素キャリアの反応性を実験的に調査することになった。

4. 2 実験の詳細および結果

試験の概要

試験方法

- ・流動層反応器内の雰囲気を切り替え、燃料反応器(FR)および空気反応器(AR)とする
- ・石炭を投入し生成するガスをサンプリングバッグで捕集しGC分析

試験条件の概要

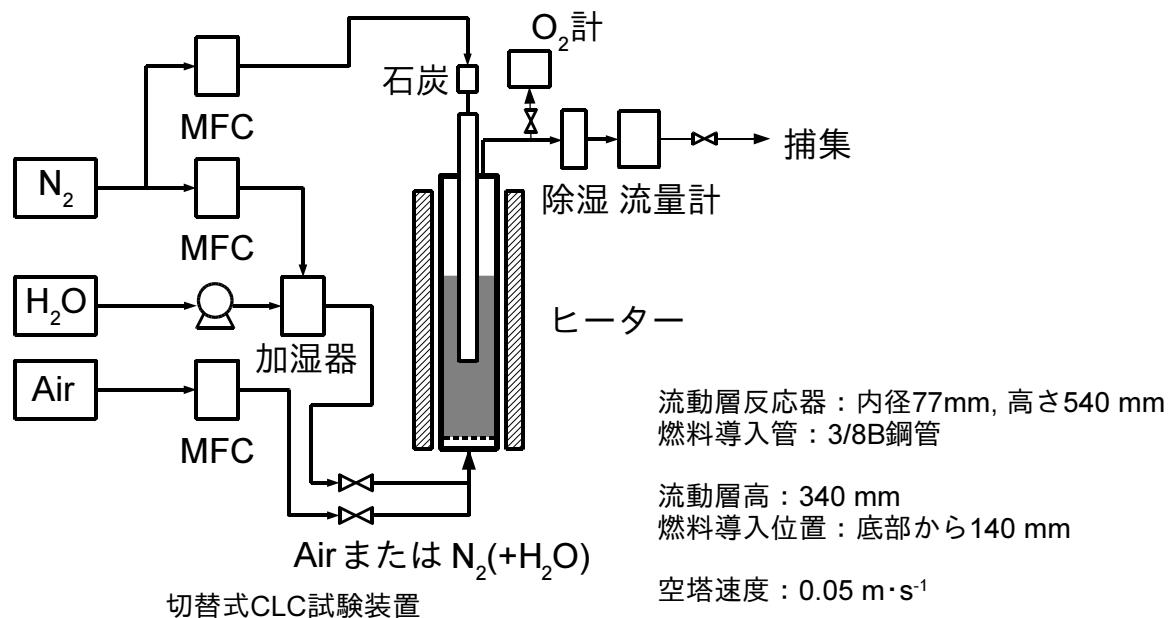
粒子：Al₂O₃粒子（人工）、Fe₂O₃-Al₂O₃焼結粒子（人工）、天然鉄系粒子

石炭：瀝青炭および褐炭

温度：650°C および 800°C

雰囲気：常圧、FR：窒素（20%水蒸気）、AR：空気

分析(GC)：CO, CO₂, CH₄, C₂H₄, C₂H₆, H₂, O₂, N₂



試験手順

空気で流動化→昇温→ N_2 のみで流動化→出口ガス酸素濃度0%確認→水蒸気導入
→燃料導入→ N_2 置換→空気に切替

使用粒子

- 高純度アルミナ粒子 99.99% Al_2O_3 , 粒径100 μm

市販品購入（アルミナビーズ）

- Fe_2O_3 - Al_2O_3 粒子

Fe_2O_3 含有率 25 wt%, 50 wt%

略称	Fe_2O_3	Al_2O_3
アルミナ	0%	100%
Fe25	25%	75%
Fe50	50%	50%

試薬を購入し、混合後噴霧乾燥造粒し焼結（平均粒径約80~100 μm ）

焼結過程を経ることにより固溶体が生成し粒子強度が高まる。

Fe_2O_3 含有率 25 wt%粒子 1200°Cでの反応実績あり

Fe_2O_3 含有率 50 wt%粒子 900°Cでの反応実績あり

- 天然鉱石

イルメナイト $FeTiO_3$

石炭

コールバンク（産業技術総合研究所）より入手

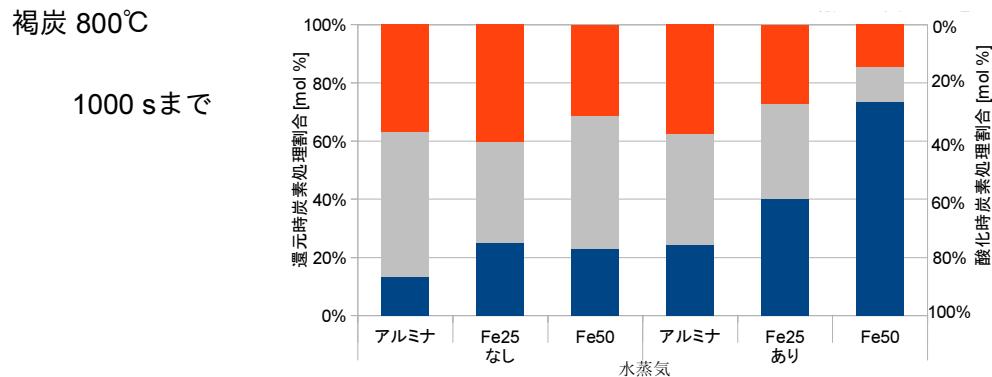
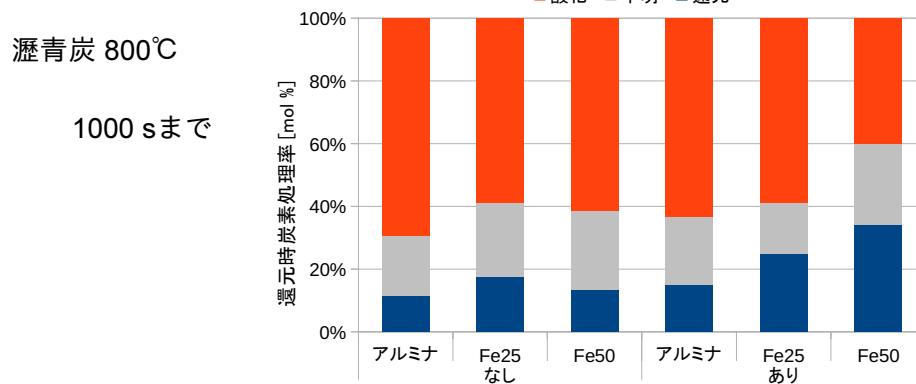
炭種	産地	工業分析			発熱量			元素分析						
		水分 wt%	灰分 wt%	揮発分 wt%	固定炭素 wt%	無水 無鉱物 cal/g	Ash wt%	C wt%	H wt%	N wt%	S wt%	O wt%	全硫黄 wt%	
SS057	瀝青炭C	CHN	2.34	10.93	32.88	53.85	8,129	11.2	74.09	4.78	1.38	0.52	8.03	0.58
SS069	褐炭F1	IDN	16.87	3.95	39.65	39.53	7,047	4.75	71.32	5.26	1.08	0.64	16.95	0.34

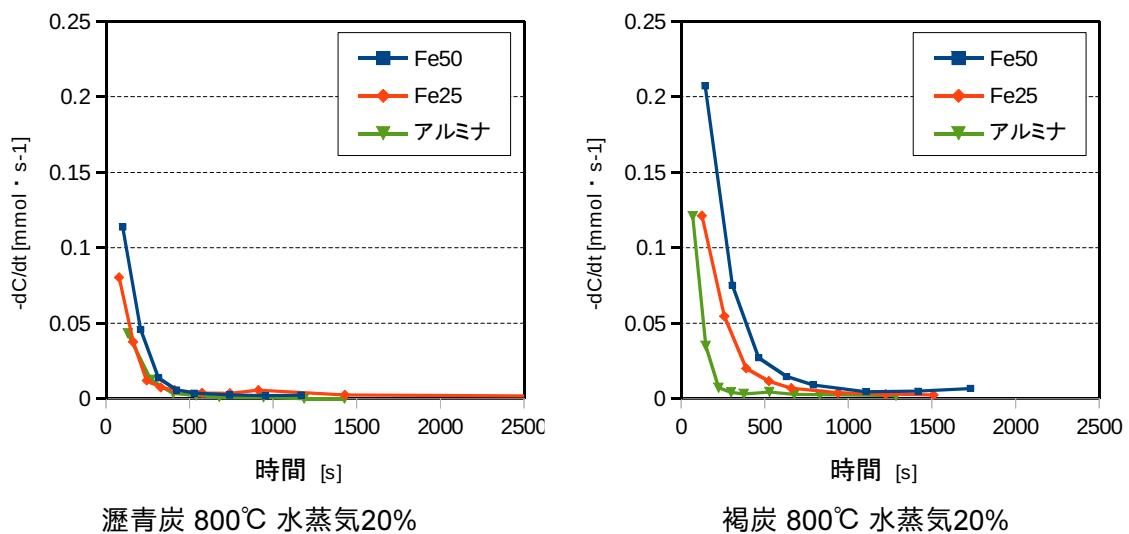
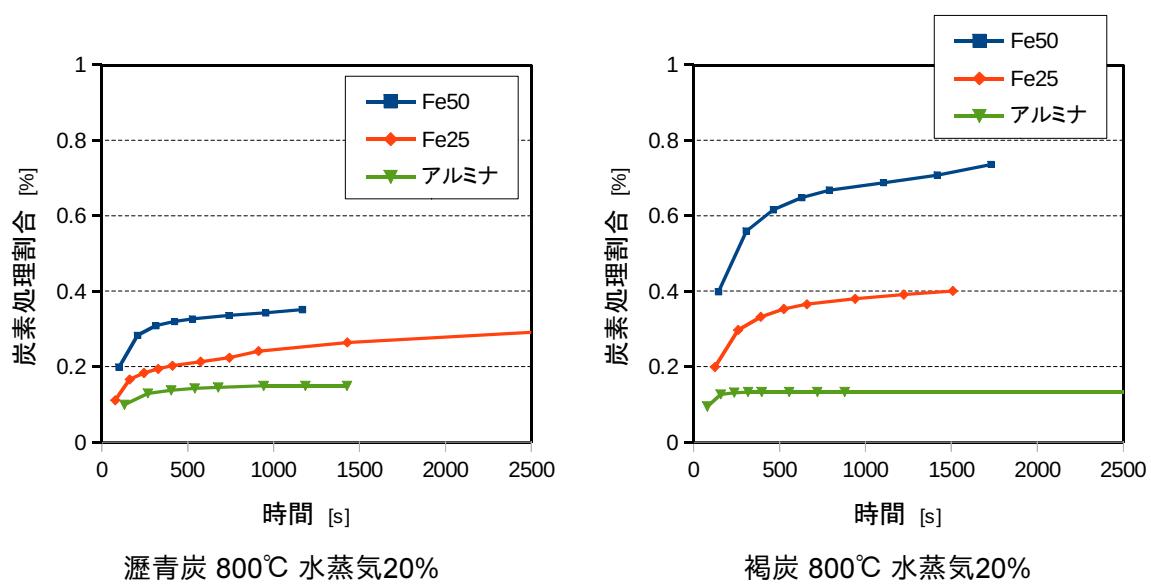
粒子	燃料	温度	雰囲気
アルミナ	瀝青炭	650°C	水蒸気あり
Fe25	褐炭	800°C	水蒸気無し
Fe50	瀝青炭チャー	900°C	
イルメナイト	褐炭チャー		

(石炭のチャー化は窒素雰囲気で流動化させ
昇温速度20 °C·min⁻¹、850°C 10分で行った)

粒子使用量	燃料導入量	水蒸気導入量
アルミナ 3.4 kg	約1 g	20%
Fe25 2.4 kg		
Fe50 2.0 kg		

試験結果の一部





5. 今後の計画

次年度の調査研究が実施されれば、さらにその後に本格的な開発へと繋がり、2030年頃を目途に実用化されることになる。

6. 研究成果の発表

本研究の成果はNEDO報告書に記載されているが、平成25年度のNEDO報告書はまだ発行されていないため、平成24年度の報告書を添付する。

ゼロエミッション石炭火力技術開発プロジェクト
ゼロエミッション石炭火力基盤技術
次世代高効率石炭ガス化技術最適化調査研究

CO₂分離型化学燃焼石炭利用技術に関する検討

平成24年度調査研究成果発表

平成25年7月19日

バブコック日立株式会社
株式会社IHI
(一財)石炭エネルギーセンター

CO₂分離型化学燃焼石炭利用技術の概念

● CO₂分離型化学燃焼(ケミカルルーピング燃焼)の原理

- ・金属酸化物が燃料反応塔と空気燃焼塔を循環
- ・燃料は金属酸化物中の酸素と反応/燃焼
- ・燃焼排ガスに空気中N₂を含まない

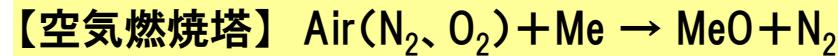
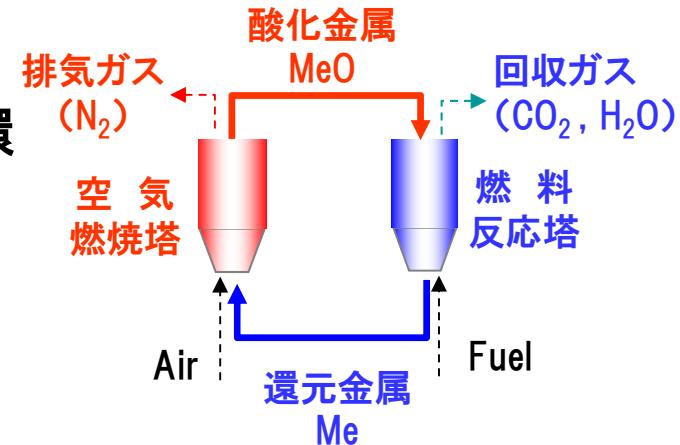


図1 ケミカルルーピング燃焼の原理

● 石炭利用の場合

【燃料反応塔】

- ・石炭(CH_n)が金属酸化物の酸素と反応、金属酸化物は還元



【空気燃焼塔】

- ・還元された金属酸化物が空気中の酸素と反応



平成24年度調査の目標と内容

● 平成24年度 調査研究の目標

- (1) CO₂回収型化学燃焼石炭利用技術の開発可能性を調査
- (2) 開発課題を整理し、技術開発ロードマップを作成

● 調査研究内容

- (1) 国内外の技術開発動向調査
- (2) プロセス基礎検討（FS, マーケット調査）
- (3) 技術開発ロードマップ作成

- ・欧米では、政府支援の下、今後も開発を継続
- ・数MWth規模のパイロット試験の実証段階まで進んでいる

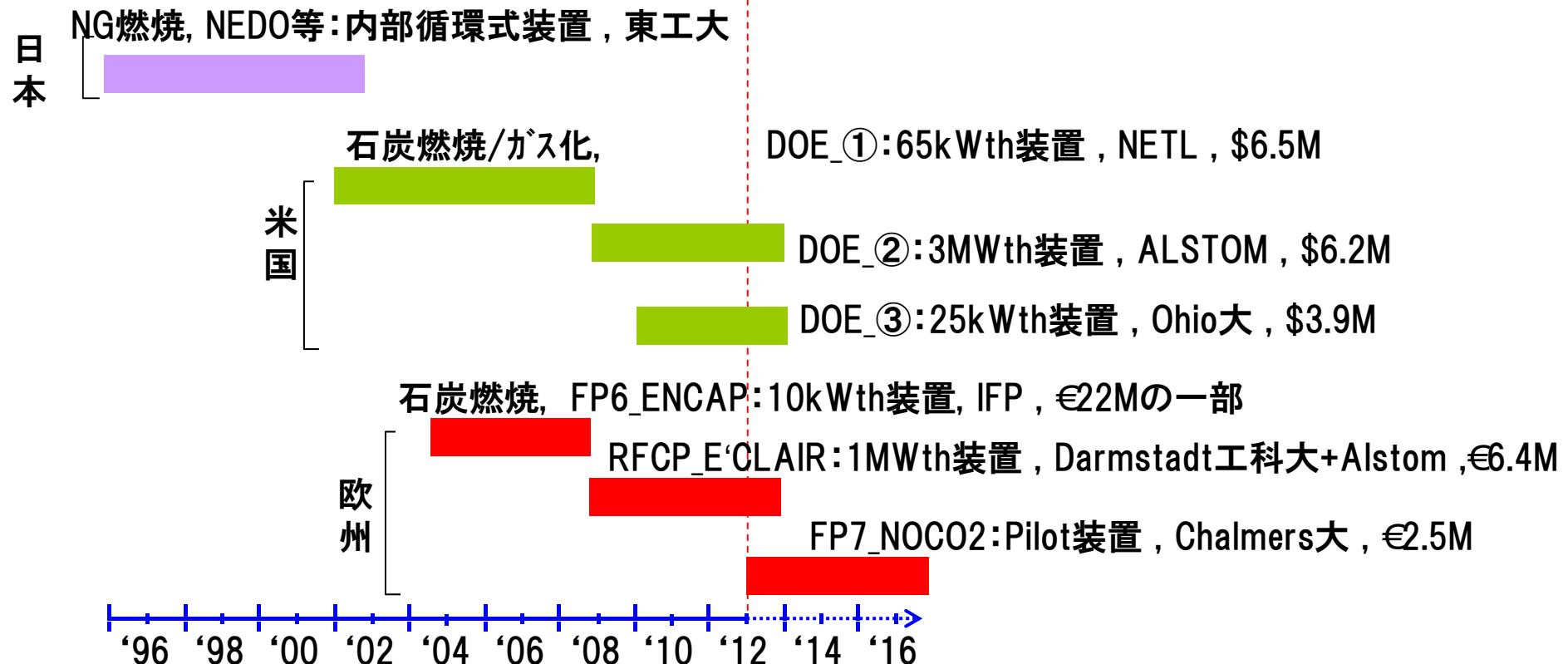


図2 技術開発プロジェクトの期間（プロジェクト名、装置規模、契約者、開発資金額）

■米国

- ① : Hybrid Combustion-Gasification CL Coal Power technology Development
- ② : Chemical Looping Combustion Prototype for CO2 Capture from Existing Pulverized Coal-Fired Power Plants
- ③ : Pilot Scale Testing of Carbon Negative, Product Flexible Syngas Chemical Looping

■欧洲

- ① ENCAP : Enhanced Capture of CO2
- ② IFP : institut français du pétrole (フランス国立石油研究所)
- ③ E'CLAIR : Emission Free Chemical Looping Coal Combustion Process
- ④ NOCO2 : Novel combustion principle with inherent capture of CO2 using combined manganese oxides that release oxygen

欧米での研究開発状況

熱自立運転可能な1～3MWth規模で原理、キャリア粒子、循環系の検証実施中

欧州:ÉCLAIRプロジェクト

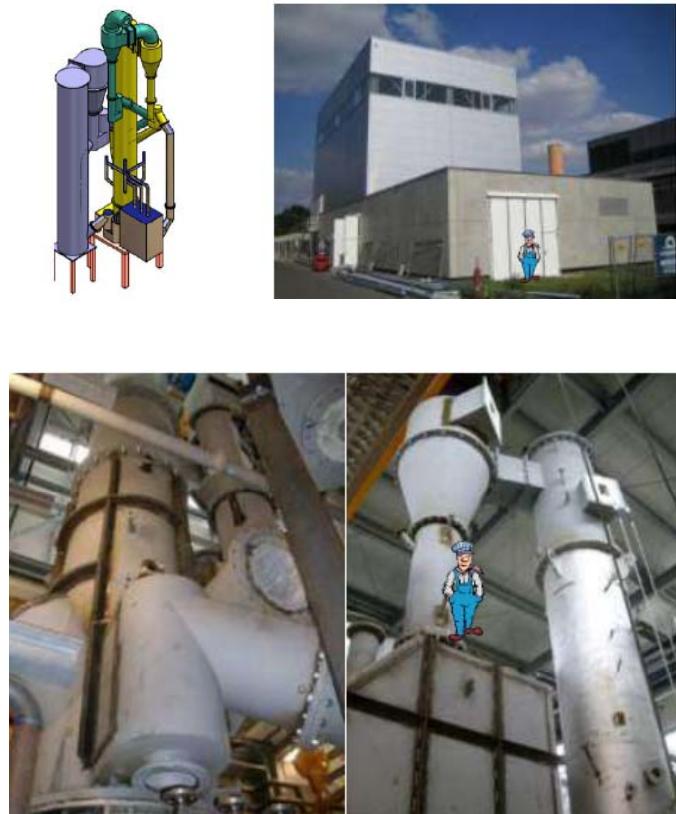


図3 1MWthFe系ケミカルループ試験装置
(Darmstadt工科大, 仏Alstom社)

米国:DOEプロジェクト(DE-NT0005286)

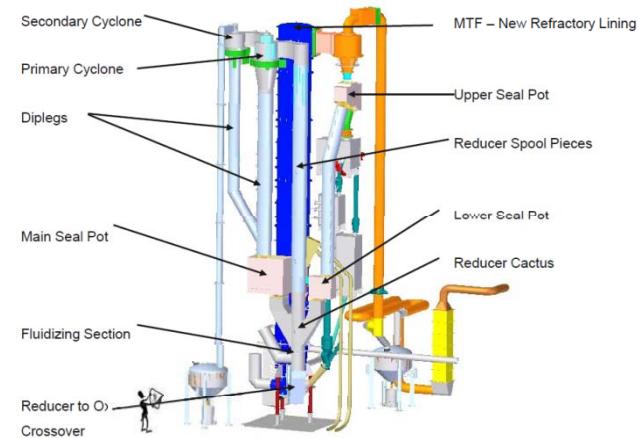


図4 3MWthCa系ケミカルループ試験装置
(米Alstom社)

石炭と酸素キャリアの基礎反応性を調査

Fe系酸素キャリアは、高反応性、低成本、高耐粉化性などの点で有望

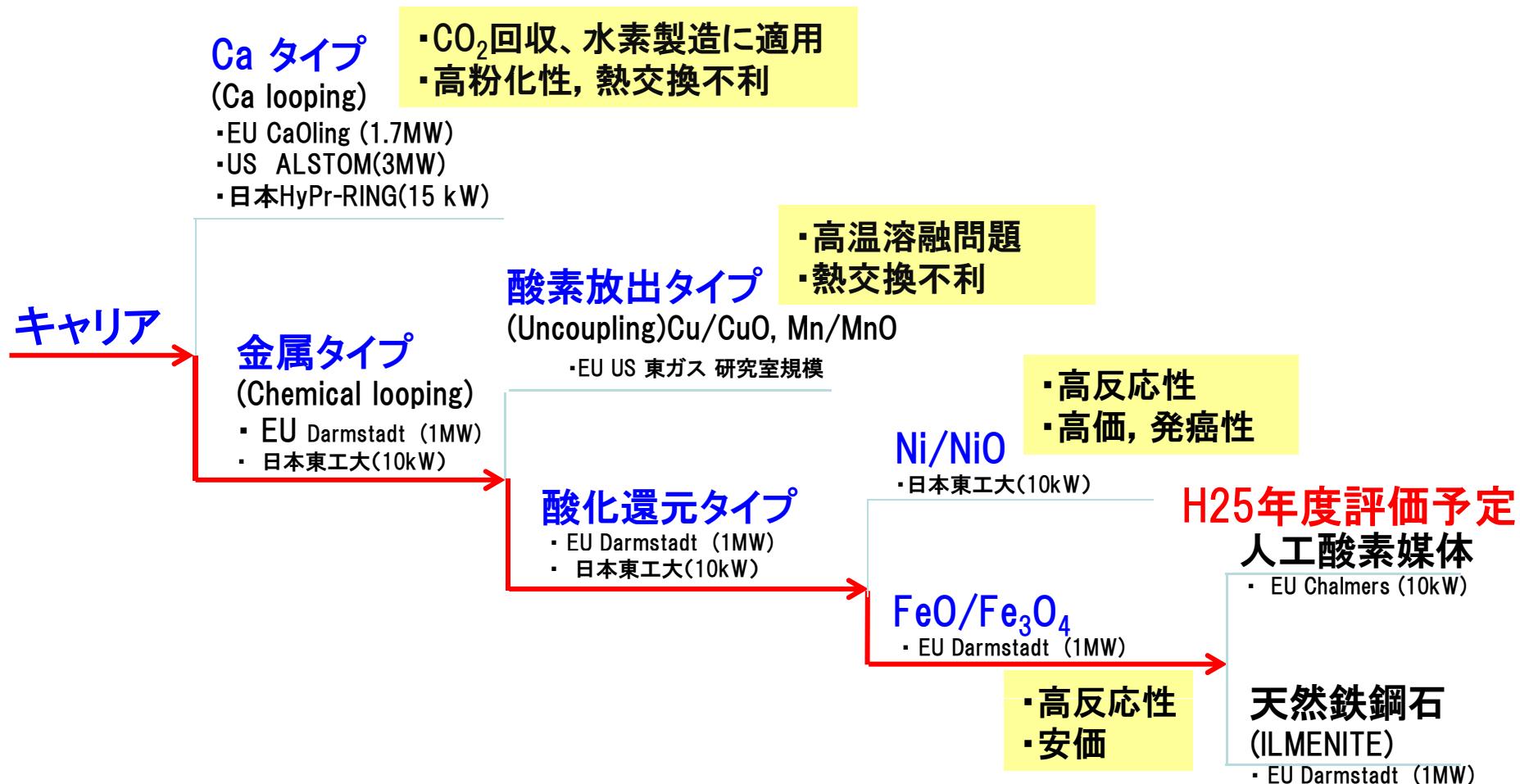
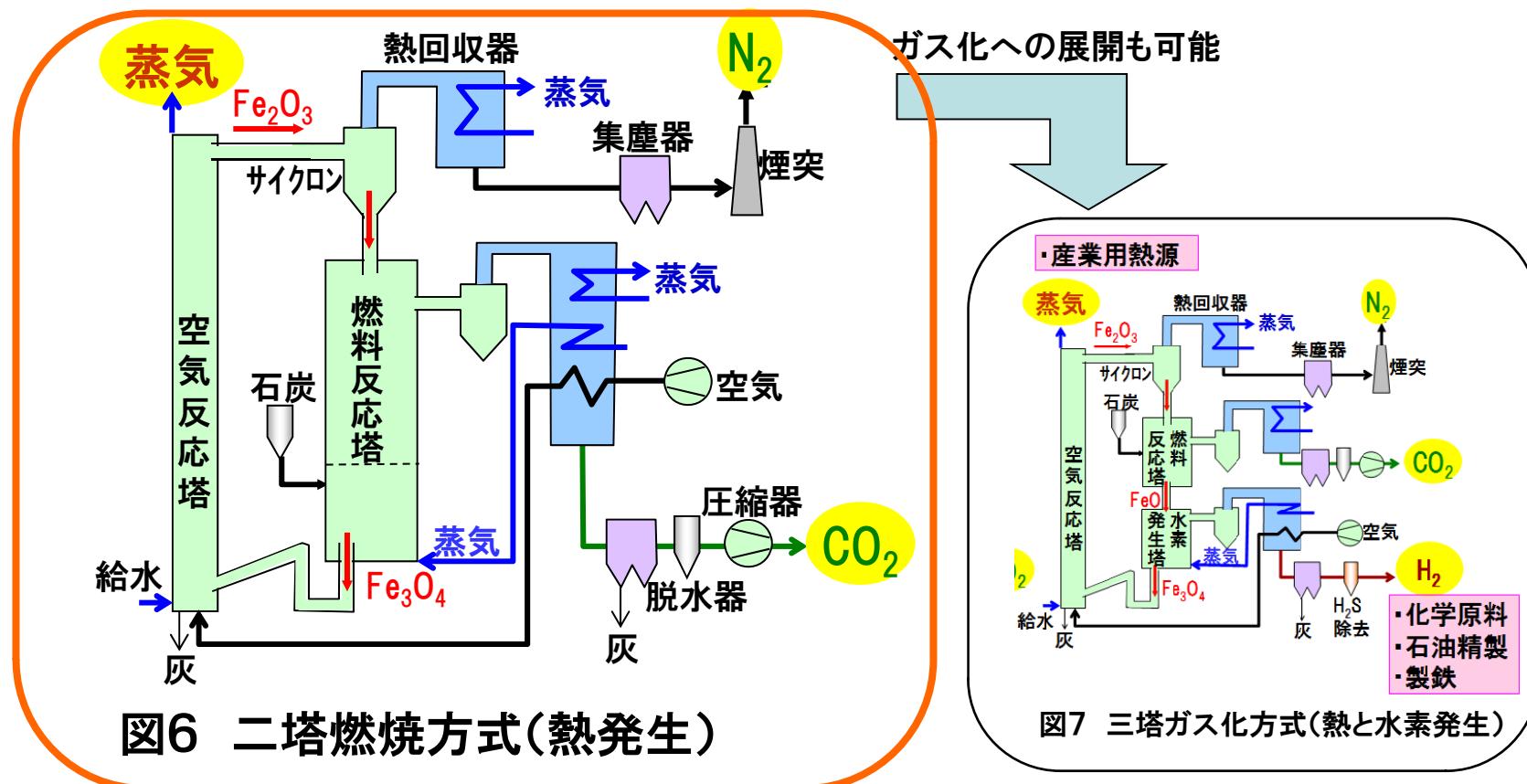


図5 各酸素キャリアの特徴及び調査結果

有望なケミカルルーピングプロセスの選定

- ・石炭ケミカルルーピングではチャーの反応が律速
→生成ガスとチャーとを分離しチャーの反応時間を確保
- ・実用化プロセスとして、二塔式(熱発生)を選定、ガス化への展開も検討

・発電、産業用熱源



CLCの建設費、運転費等を想定して発電単価とCO₂回収費(回収・昇圧・輸送・貯留)を試算し、CCS付きの超臨界微粉炭火力(SCPCC)、石炭ガス化複合発電(IGCC)、酸素燃焼(Oxyfuel)と比較した。

- CLCの建設費は、DOE/NETLによる比較対象技術の評価結果を参考し、ターゲットコストを設定した。
- CLC建設費の上限：IGCCから空気分離器を除いた値
 - CLC建設費の下限：SCPC並み

結果

CLCの発電単価は、SCPCやIGCCのCO₂回収率が低い場合は高くなるが、CO₂回収率が高くなると(60%以上)、SCPC、IGCC、Oxyfuelのいずれに対しても有利になる。

また建設費は、上限・下限を設定して評価を行ったが、発電単価に対する建設費の影響は比較的少ない。

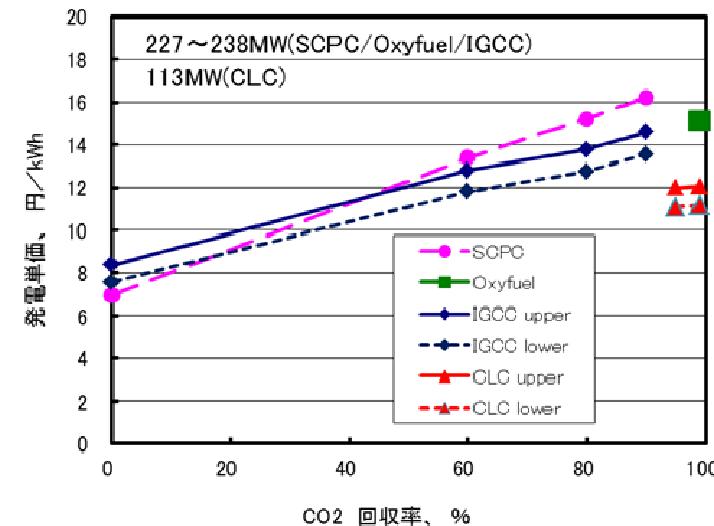


図8 CO₂回収率と発電原価の関係

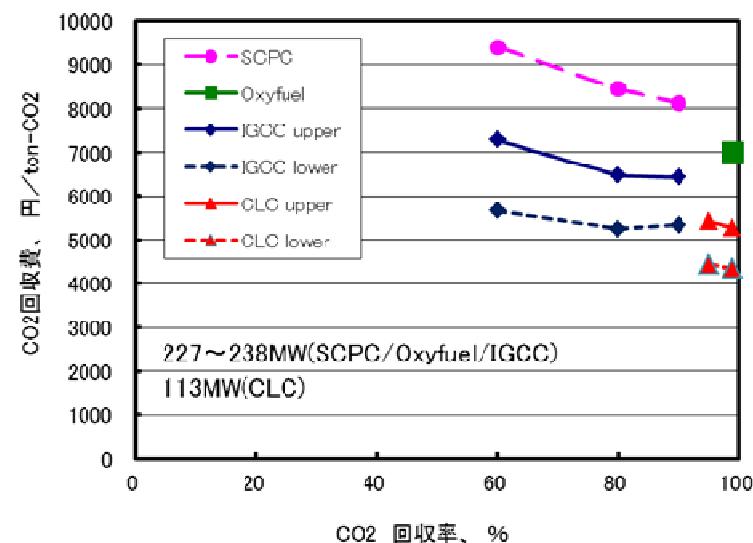


図9 CO₂回収率とCO₂回収費
(回収・昇圧・輸送・貯留)の関係

CLCの特徴(①CO₂回収時も高効率, ②多炭種適合, ③中小～大規模可)を活かしたターゲットの選定
→当初は中小規模対象, 技術開発進展した時点で大規模発電(60万kW級)へ

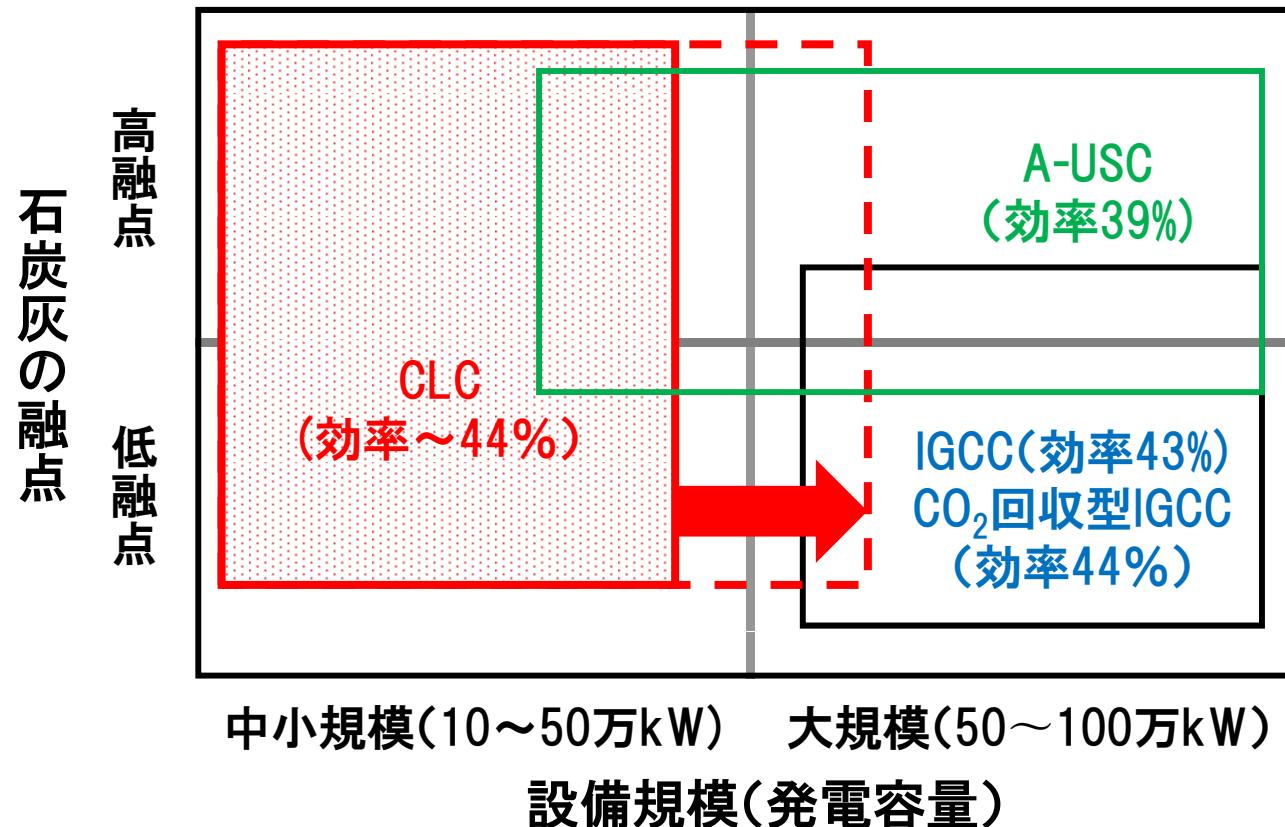


図10 CCS付き石炭火力におけるマーケットの想定
(発電効率は2030年におけるCCS付き : HHV)

2025年以降には数十基、うち循環流動層ボイラ(CFBC)は10数基のボイラ更新需要が発生する見込みであり、少なくとも年2~3基の建設が期待できる。さらに、CLCとの類似性が大きいCFBCのCLCへの改造提案による市場拡大を狙う。発電・熱発生用だけでなく、CLCガス化による化学、新エネルギー分野へ展開

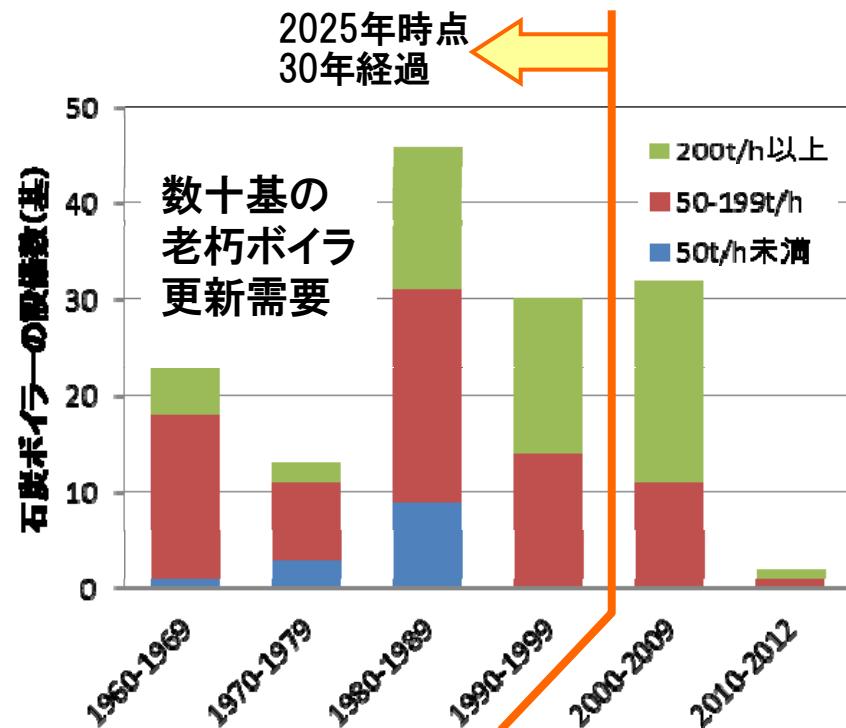


図11 我が国における石炭ボイラの建設年
(自家発電設備を含む)

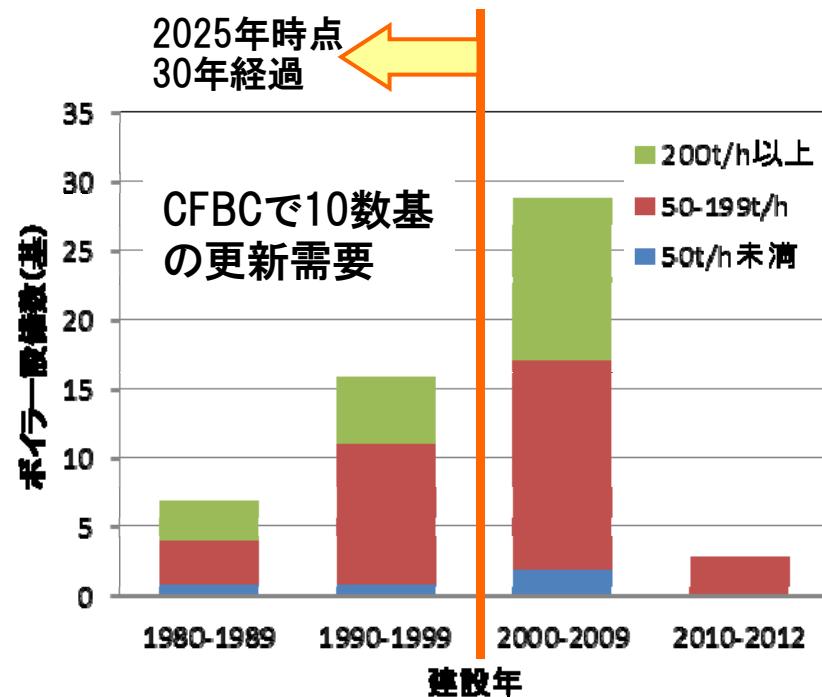


図12 我が国における循環流動層
ボイラ(CFBC)の建設年

海外においても小型(100MW未満)や比較的小規模(100MW～350MW)の石炭火力発電所を中心にCLCが導入される可能性が考えられる。

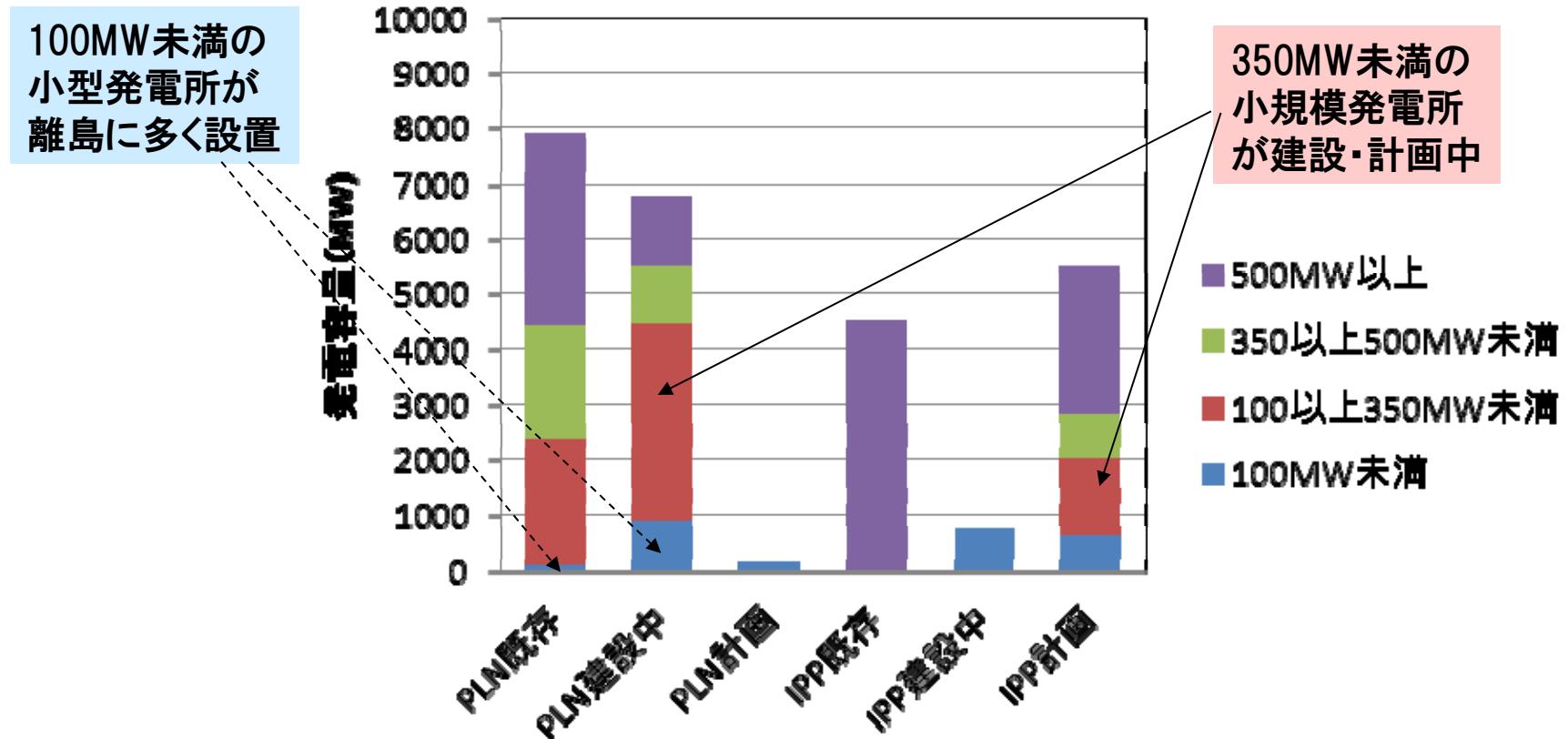
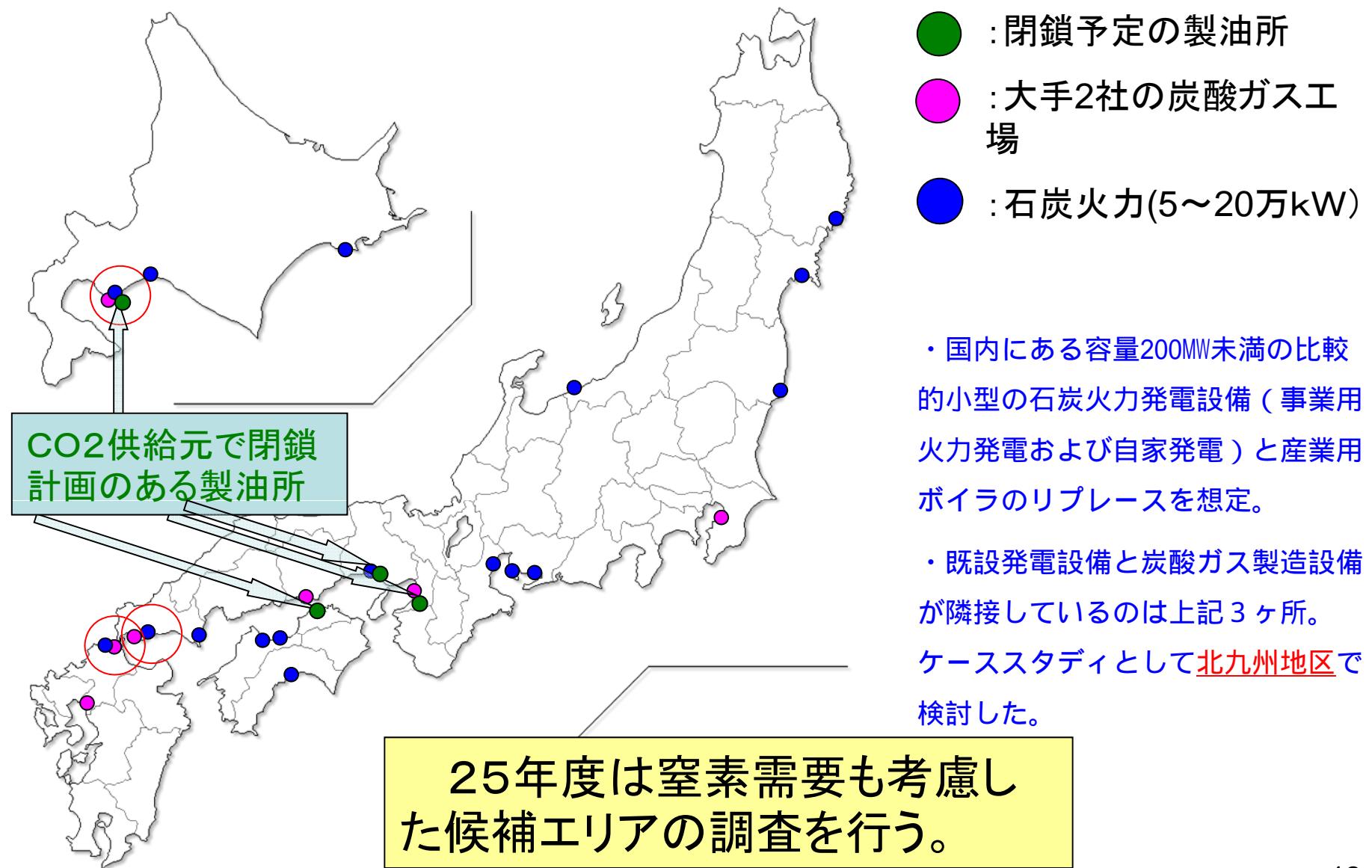


図13 インドネシアにおける石炭火力発電所の整理(発電容量)

モデル地区を想定したケミカルルーピング ビジネスの経済性: モデル地区



炭酸ガス、窒素市場規模

経済産業省化学工業統計年報 平成23年実績より、

1. 炭酸ガス

販売量80万トン 市場規模 191億円

販売単価: 23,900円/ton

主な用途: 溶接、飲用、冷却、製鋼、化学

2. 窒素ガス（液体窒素除く）

販売量1,022万トン 市場規模 375億円

販売単価: 3670円/ton

主な用途: 化学用、電気機械、鉄鋼

品目 Commodity	単位 Unit	生産 Production Quantity	受入 Receipt Quantity	消費 Consumption Quantity	出荷 Shipments		在庫 Inventory Quantity	
					販売 Sales	その他 Others		
					数量 Quantity	金額(百万円) Amount (¥ million)		
窒素計 Nitrogen	(3) 10^3m^3	13,670,088	646,334	4,090,857	9,935,179	63,820	285,471	37,082
窒素(ガス) Nitrogen, gas	10^3m^3	11,858,995	614,211	4,048,985	8,181,672	37,506	239,997	234
窒素(液化) Nitrogen, liquid	10^3m^3	1,811,093	32,123	41,872	1,753,507	26,314	45,474	36,848
アルゴン Argon	10^3m^3	259,192	16,782	40,162	226,922	20,508	7,849	4,634
水素 Hydrogen	(4) 10^3m^3	501,028	8,921	287,737	220,417	9,470	1,805	278
溶解アセチレン Dissolved acetylene	(4) t	11,608	432	-	11,592	7,572	551	340
フルオロカーボン Fluoro carbon	t	68,403	32,127	50,834	40,874	32,203	6,520	8,659
炭酸ガス Carbon dioxide	(5) t	888,061	50,898	129,556	799,061	19,102	6,123	9,183



平成23年
— 2011 —

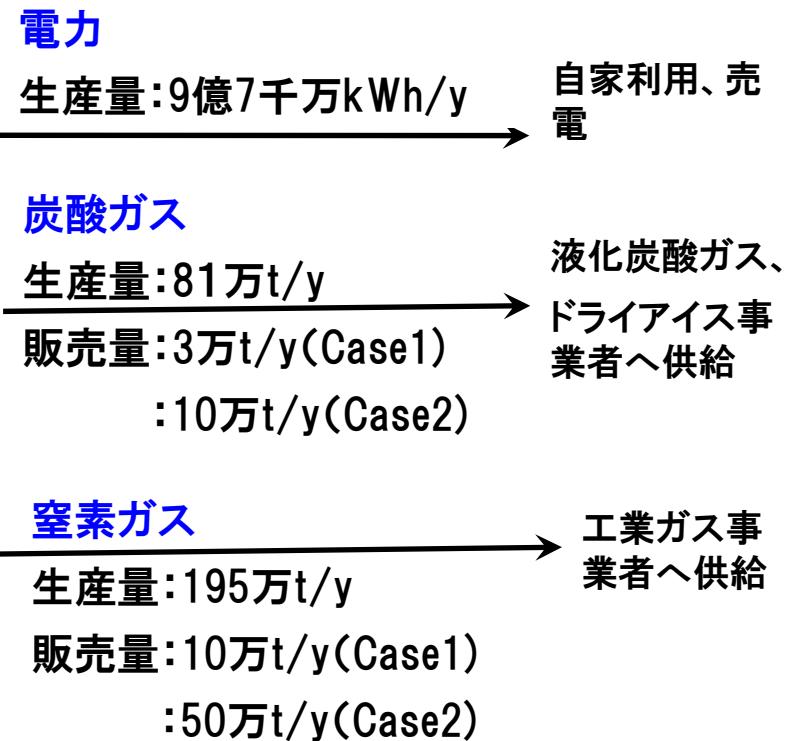
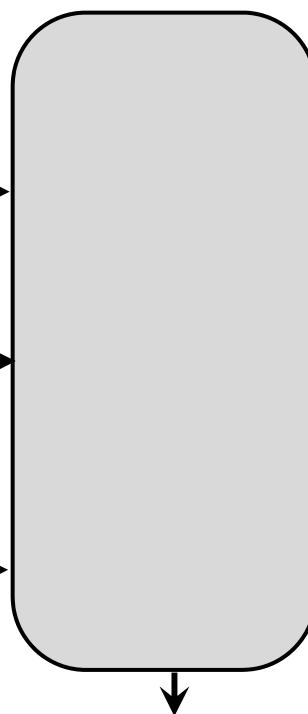
化学工業統計年報

YEARBOOK OF
CHEMICAL INDUSTRY STATISTICS

基本仕様

- ・発電容量:15万kW
- ・発電効率:42%(HHV)、所内率:8%
- ・生産ガス:炭酸ガス及び窒素ガス
- ・年間設備利用率:80%

石炭:408千t/y
キャリア粒子(チタン鉄鉱石):
18百t/y(初年:23百t/y)
石灰石 :63百t/y
工業用水:146百t/y



・建設費:236億円

リプレースベース(冷却水設備、石炭ヤード、灰処理、建屋、その他インフラ設
備は既設流用)、CLC本体部はCFBC市場価格の1.2倍とした。

モデル地区を想定したケミカルルーピング ビジネスの経済性:検討結果

計算条件

初期投資額： 236億円、15年定率償却

投資回収期間：20年（但し10年目で改修）

生産品価格、燃料・副資材などは現在価格で評価

結果

Case1：現状の炭酸ガス事業者の処理能力勘案ケース IRR(税引後) 11.6%
(炭酸ガス：30,000t/y、窒素ガス：100,000t/y)

Case2：ガス需要拡大期待ケース IRR(税引後) 13.8%
(炭酸ガス：100,000t/y、窒素ガス：500,000t/y)

Case2
経済性計
算シート

年	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
利益																					
電力	9216.5	9216.5	9216.5	9216.5	9216.5	9216.5	9216.5	9216.5	9216.5	9179.6	9216.5	9216.5	9216.5	9216.5	9216.5	9216.5	9216.5	9216.5	9216.5	9216.5	
粗ガス(CO ₂)	500.0	500.0	500.0	500.0	500.0	500.0	500.0	500.0	500.0	500.0	500.0	500.0	500.0	500.0	500.0	500.0	500.0	500.0	500.0	500.0	
粗ガス(N ₂)	500.0	500.0	500.0	500.0	500.0	500.0	500.0	500.0	500.0	500.0	500.0	500.0	500.0	500.0	500.0	500.0	500.0	500.0	500.0	500.0	
計	10217	10217	10217	10217	10217	10217	10217	10217	10217	9179.6	10217	10217	10217	10217	10217	10217	10217	10217	10217	10217	
設備	23583																				
償却(25%定率、15年)	5895.8	1473.9	368.48	92.121	23.03	5.7576	1.4394	0.3598	0.09	0.0225	0.0056	0.0014	0.0004	9E-05	9E-05						
簿価	17687	4421.8	1105.5	276.36	69.091	17.273	4.3182	1.0795	0.2699	0.0675	0.0169	0.0042	0.0011	0.0003	0						
コスト																					
燃料	3255.2	3255.2	3255.2	3255.2	3255.2	3255.2	3255.2	3255.2	3255.2	2889.0	3255.2	3255.2	3255.2	3255.2	3255.2	3255.2	3255.2	3255.2	3255.2	3255.2	
副資材(チタン)	21.0	21.0	21.0	21.0	21.0	21.0	21.0	21.0	21.0	18.7	21.0	21.0	21.0	21.0	21.0	21.0	21.0	21.0	21.0	21.0	
副資材(石灰石)	6.3	6.3	6.3	6.3	6.3	6.3	6.3	6.3	6.3	5.6	6.3	6.3	6.3	6.3	6.3	6.3	6.3	6.3	6.3	6.3	
灰燼分費	200.1	200.1	200.1	200.1	200.1	200.1	200.1	200.1	200.1	177.6	200.1	200.1	200.1	200.1	200.1	200.1	200.1	200.1	200.1	200.1	
光熱費(水)	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.5	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	
補修費(設備×2.3%)	542.4	542.4	542.4	542.4	542.4	542.4	542.4	542.4	542.4	2358.3	542.4	542.4	542.4	542.4	542.4	542.4	542.4	542.4	542.4	542.4	
労務費	97.5	97.5	97.5	97.5	97.5	97.5	97.5	97.5	97.5	97.5	97.5	97.5	97.5	97.5	97.5	97.5	97.5	97.5	97.5	97.5	
間接費(直接費×2%)	82.5	82.5	82.5	82.5	82.5	82.5	82.5	82.5	82.5	82.5	110.9	82.5	82.5	82.5	82.5	82.5	82.5	82.5	82.5	82.5	
計	4205.6	4205.6	4205.6	4205.6	4205.6	4205.6	4205.6	4205.6	4205.6	5658.1	4205.6	4205.6	4205.6	4205.6	4205.6	4205.6	4205.6	4205.6	4205.6	4205.6	
固定資産税(簿価×1.4%)	247.6	61.9	15.5	3.9	1.0	0.2	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
収支	5768.3	5949.0	5995.4	6007.0	6009.9	6010.7	6010.9	6010.9	6010.9	3521.5	6010.9	6010.9	6010.9	6010.9	6010.9	6010.9	6010.9	6010.9	6010.9	6010.9	
法人税(40%)引き後	3458.0	3569.4	3597.3	3604.2	3606.0	3606.4	3606.5	3606.5	3606.5	2112.9	3606.5	3606.5	3606.5	3606.5	3606.5	3606.5	3606.5	3606.5	3606.5	3606.5	
キャッシュフロー	-23583	3458.0	3569.4	3597.3	3604.2	3606.0	3606.4	3606.5	3606.5	2112.9	3606.5	3606.5	3606.5	3606.5	3606.5	3606.5	3606.5	3606.5	3606.5	3606.5	
IRR=	13.8%																				

↑10年目に大規模改修として補修費を10%とする

開発課題 ('13~'14)

・技術

- (1) 反応性、経済性を備えた酸素キャリアの開発
- (2) 反応塔(燃料、空気)構造と反応率の検討
- (3) プラント目標値の設定

・マーケット

- (1) プレーヤーの発掘
CO₂分離、CO₂利用、N₂利用、水素利用ニーズのヒアリング
- (2) マーケットの基盤構築
既存プラントへの導入
電力分野への拡大

技術開発ロードマップ

項目	'12～'14	'15～	'20～	'25～	'30～
技術	酸素キャリアの開発 反応塔構造検討	反応率検証▽ プラント目標値検証▽			
マーケット	ニーズの調査と発掘	客先との共同実証		リプレース市場へ導入	新設市場へ
設備規模	PDU	5MW _{th} ベンチ	30MWe級実証機	100MWe級～	3～5百MWe級

調査結果まとめ

調査研究内容	調査結果
(1)国内外の技術開発動向調査	
国内外の技術開発動向	1～3MWth級パイロット試験で熱自立運転実証中
海外及び国内技術の評価、選定	熱用2塔式を選定、ガス化への展開を検討
石炭とキャリアの基礎反応性	安価で高い反応性を持つFe系キャリアが有望
(2)プロセス基礎検討 (FS, マーケット調査)	
システム検討及びFS	CO ₂ 回収単価は、先行CCS技術より安価
国内外のマーケット	小型発電分野、化学原料等の産業用分野
ビジネスモデル	CCUS、CO ₂ とN ₂ の有効利用で、経済性あり
(3)技術開発ロードマップ作成	
開発ロードマップ	2025年実用化ロードマップを作成

補足資料

CLC技術開発におけるCCUSの検討

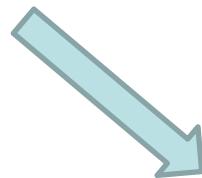
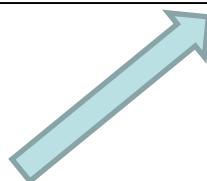
ドライアイス、今夏はピンチ CO₂供給不足 化学工場閉鎖響く

炭酸ガス(CO₂)の需要と用途

CO₂の需要 : 100万トン/年(横ばい)
CO₂の用途 : ドライアイスなどの冷却向け: 35%
 金属の溶接向け: 35%
 炭酸飲料向け: 15%
 その他: 15%

【用途詳細】

溶接用シールドガス、食品ガス封入、鑄物、パージガス、清涼飲料、ドライアイス、冷媒、消火剤、製鋼、超臨界抽出、柿脱渋、排水中和処理装置、促進販売、殺菌ガスベースガス、鶏卵鮮度保持など



炭酸ガス(CO₂)の供給量不足

炭酸ガス(CO₂)の供給不足対応

2012.3.旭化成水島製造所 アンモニア等生産停止
2013.7.コスモ石油坂出製油所 閉鎖
2014.3.宇部興産堺工場 アンモニア工場停止
2014.3.JX日鉱日石室蘭製油所 石油精製停止

・韓国からドライアイス輸入
・東日本から西日本への長距離輸送増
・火力発電所 低濃度CO₂ガスの精製も検討
・CLC導入によるCO₂/CCUSの活用

経済性計算条件

FSインプット条件

機材 設備	CASE1		CASE2	
	建設費(リプレースベース、主機のみ) 年間利用率	236 年間 80%	236 億円 80%	
石炭				
低質亜瑟青炭 全水分38% HHV=5300kcal/kg	単価 使用量 使用量 購入量	7,980 1,397 407,924 3,255.2	7,980 円/t 1,397 t/d 407,924 t 3,255.2 百万円	
副資材:チタン鉄鉱石				
キャリア粒子用 初期量 スタートアップ年	単価 使用量 使用量 購入量	12,000 6.00 1,752 21.0	12,000 円/t 6.00 t/d 1,752 t 21.0 百万円	
副資材:石灰石				
脱流用	単価 使用量 使用量 購入量	1,000 21.60 6,306 6.3	1,000 円/t 21.60 t/d 6,306 t 6.3 百万円	
灰処理費				
(内訳) 灰 チタン 硫黄 石灰石	単価 使用量 使用量 購入量	55.29 6.00 2.76 21.60	8,000 85.65 25,009 200.1	8,000 円/t 85.65 t/d 25,009 t 200.1 百万円
光熱費:水				
北九州地区単価	単価 使用量 使用量 購入量	40 50 14,600 0.6	40 円/t 50 t/d 14,600 t 0.6 百万円	
労務費				
3直4交	単価 日勤 直 計 労務費	6.5 3 12 15 97.5	6.5 百万円/人 3 人 12 人 15 97.5 百万円	

アウトプット

炭酸ガス				
生産量 815,848 t/y	2,794 t/d ⇒ % 3.7%	単価 販売量 販売額	5000 30,000 150	5000 円/t 100,000 t/y 500 百万円/年
窒素ガス				
生産量 1,952,896 t/y	6,688 t/d ⇒ % 5.1%	単価 販売量 販売額	1000 100,000 100	1000 円/t 500,000 t/y 500 百万円/年
電力				
送電端容量	15 万kW 13.8 万kW	単価	9.53	9.53 円/kWh 東電IPP入札上限
年間発電量	98,710 万kWh	発電量 売電額	96,710 9,216.5	96,710 万kWh 9,216.5 百万円/年

10年目は大規模定修1ヶ月として稼働率を80%から71%とする
発電量は稼働率見合いで削減、ガス販売量は生産量より少ないため定修年も変更なしとする
法人税率: 40%

石炭性状

Items	PT Energi Batubara Lestari
Moisture (ar)	38%
Inherent Moisture (adb)	Approx 14%
ASH (adb)	6 %
Volatile Matter (adb)	Approx 43%
Fixed Carbon (adb)	By difference
Sulfur (adb)	0,3%
Gross Calorific Value (adb)	5,400 – 5,200 Kcal/Kg
Hard Grove Grind ability index	Approx 55
Size 0-50 mm	>85%

Case1 経済性計算シート

年	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
利益																					
電力	9216.5	9216.5	9216.5	9216.5	9216.5	9216.5	9216.5	9216.5	9216.5	9216.5	8179.6	9216.5	9216.5	9216.5	9216.5	9216.5	9216.5	9216.5	9216.5	9216.5	
粗ガス(CO ₂)	150.0	150.0	150.0	150.0	150.0	150.0	150.0	150.0	150.0	150.0	150.0	150.0	150.0	150.0	150.0	150.0	150.0	150.0	150.0	150.0	
粗ガス(N ₂)	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	
計	9466.5	9466.5	9466.5	9466.5	9466.5	9466.5	9466.5	9466.5	9466.5	9466.5	8429.6	9466.5	9466.5	9466.5	9466.5	9466.5	9466.5	9466.5	9466.5	9466.5	
設備	23583																				
償却(25%定率、15年)	5895.8	1473.9	368.48	92.121	23.03	5.7576	1.4394	0.3598	0.09	0.0225	0.0056	0.0014	0.0004	9E-05	9E-05						
簿価	17687	4421.8	1105.5	276.36	69.091	17.273	4.3182	1.0795	0.2699	0.0675	0.0169	0.0042	0.0011	0.0003	0						
コスト																					
燃料	3255.2	3255.2	3255.2	3255.2	3255.2	3255.2	3255.2	3255.2	3255.2	3255.2	2889.0	3255.2	3255.2	3255.2	3255.2	3255.2	3255.2	3255.2	3255.2	3255.2	
副資材(チタン)	21.0	21.0	21.0	21.0	21.0	21.0	21.0	21.0	21.0	21.0	18.7	21.0	21.0	21.0	21.0	21.0	21.0	21.0	21.0	21.0	
副資材(石灰石)	6.3	6.3	6.3	6.3	6.3	6.3	6.3	6.3	6.3	6.3	5.6	6.3	6.3	6.3	6.3	6.3	6.3	6.3	6.3	6.3	
灰処分費	200.1	200.1	200.1	200.1	200.1	200.1	200.1	200.1	200.1	200.1	177.6	200.1	200.1	200.1	200.1	200.1	200.1	200.1	200.1	200.1	
光熱費(水)	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.5	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	
補修費(設備×2.8%)	542.4	542.4	542.4	542.4	542.4	542.4	542.4	542.4	542.4	542.4	2358.3	542.4	542.4	542.4	542.4	542.4	542.4	542.4	542.4	542.4	
労務費	97.5	97.5	97.5	97.5	97.5	97.5	97.5	97.5	97.5	97.5	97.5	97.5	97.5	97.5	97.5	97.5	97.5	97.5	97.5	97.5	
間接費(直接費×2%)	82.5	82.5	82.5	82.5	82.5	82.5	82.5	82.5	82.5	82.5	110.9	82.5	82.5	82.5	82.5	82.5	82.5	82.5	82.5	82.5	
計	4205.6	4205.6	4205.6	4205.6	4205.6	4205.6	4205.6	4205.6	4205.6	4205.6	5658.1	4205.6	4205.6	4205.6	4205.6	4205.6	4205.6	4205.6	4205.6	4205.6	
固定資産税(簿価×1.4%)	247.6	61.9	15.5	3.9	1.0	0.2	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
収支	5013.3	5199.0	5245.4	5257.0	5259.9	5260.7	5260.9	5260.9	5260.9	5271.5	5260.9	5260.9	5260.9	5260.9	5260.9	5260.9	5260.9	5260.9	5260.9	5260.9	
法人税(40%)引き後	3008.0	3119.4	3147.3	3154.2	3156.0	3156.4	3156.5	3156.5	3156.5	3156.5	1662.9	3156.5	3156.5	3156.5	3156.5	3156.5	3156.5	3156.5	3156.5	3156.5	
キャッシュフロー	-23583	3008.0	3119.4	3147.3	3154.2	3156.0	3156.4	3156.5	3156.5	3156.5	1662.9	3156.5	3156.5	3156.5	3156.5	3156.5	3156.5	3156.5	3156.5	3156.5	
IRR=	11.6%																				

↑10年目に大規模改修として補修費を10%とする

Case2 経済性計算シート

単位(百万円)		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
年																						
利益																						
電力		9216.5	9216.5	9216.5	9216.5	9216.5	9216.5	9216.5	9216.5	9216.5	9216.5	92179.6	9216.5	9216.5	9216.5	9216.5	9216.5	9216.5	9216.5	9216.5	9216.5	
粗ガス(CO ₂)		500.0	500.0	500.0	500.0	500.0	500.0	500.0	500.0	500.0	500.0	500.0	500.0	500.0	500.0	500.0	500.0	500.0	500.0	500.0	500.0	
粗ガス(N ₂)		500.0	500.0	500.0	500.0	500.0	500.0	500.0	500.0	500.0	500.0	500.0	500.0	500.0	500.0	500.0	500.0	500.0	500.0	500.0	500.0	
計		10217	10217	10217	10217	10217	10217	10217	10217	10217	10217	9179.6	10217	10217	10217	10217	10217	10217	10217	10217	10217	
設備	23583																					
償却(25%定率、15年)		5895.8	1473.9	368.48	92.121	23.03	5.7576	1.4394	0.3598	0.09	0.0225	0.0056	0.0014	0.0004	9E-05	9E-05						
簿価		17687	4421.8	1105.5	276.36	69.091	17.273	4.3182	1.0795	0.2699	0.0675	0.0169	0.0042	0.0011	0.0003	0						
コスト																						
燃料		3255.2	3255.2	3255.2	3255.2	3255.2	3255.2	3255.2	3255.2	3255.2	3255.2	2889.0	3255.2	3255.2	3255.2	3255.2	3255.2	3255.2	3255.2	3255.2	3255.2	
副資材(チタン)		21.0	21.0	21.0	21.0	21.0	21.0	21.0	21.0	21.0	21.0	18.7	21.0	21.0	21.0	21.0	21.0	21.0	21.0	21.0	21.0	
副資材(石灰石)		6.3	6.3	6.3	6.3	6.3	6.3	6.3	6.3	6.3	6.3	5.6	6.3	6.3	6.3	6.3	6.3	6.3	6.3	6.3	6.3	
灰処分費		200.1	200.1	200.1	200.1	200.1	200.1	200.1	200.1	200.1	200.1	177.6	200.1	200.1	200.1	200.1	200.1	200.1	200.1	200.1	200.1	
光熱費(水)		0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.5	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	
補修費(設備×2.3%)		542.4	542.4	542.4	542.4	542.4	542.4	542.4	542.4	542.4	542.4	2358.3	542.4	542.4	542.4	542.4	542.4	542.4	542.4	542.4	542.4	
労務費		97.5	97.5	97.5	97.5	97.5	97.5	97.5	97.5	97.5	97.5	97.5	97.5	97.5	97.5	97.5	97.5	97.5	97.5	97.5	97.5	
間接費(直接費×2%)		82.5	82.5	82.5	82.5	82.5	82.5	82.5	82.5	82.5	82.5	110.9	82.5	82.5	82.5	82.5	82.5	82.5	82.5	82.5	82.5	
計		4205.6	4205.6	4205.6	4205.6	4205.6	4205.6	4205.6	4205.6	4205.6	4205.6	5658.1	4205.6	4205.6	4205.6	4205.6	4205.6	4205.6	4205.6	4205.6	4205.6	
固定資産税(簿価×1.4%)		247.6	61.9	15.5	3.9	1.0	0.2	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
収支		5763.3	5949.0	5995.4	6007.0	6009.9	6010.7	6010.9	6010.9	6010.9	6010.9	3521.5	6010.9	6010.9	6010.9	6010.9	6010.9	6010.9	6010.9	6010.9	6010.9	
法人税(40%)引き後		3458.0	3569.4	3597.3	3604.2	3606.0	3606.4	3606.5	3606.5	3606.5	3606.5	2112.9	3606.5	3606.5	3606.5	3606.5	3606.5	3606.5	3606.5	3606.5	3606.5	
キャッシュロー	-23583	3458.0	3569.4	3597.3	3604.2	3606.0	3606.4	3606.5	3606.5	3606.5	3606.5	↑10年目に大規模改修として補修費を10%とする	3606.5	3606.5	3606.5	3606.5	3606.5	3606.5	3606.5	3606.5	3606.5	3606.5
IRR-	13.6%																					

炭酸ガス市場規模



平成 23 年
— 2011 —

化学工業統計年報

YEARBOOK OF
CHEMICAL INDUSTRY STATISTICS

④ 高圧ガス High Pressure Gas

炭酸ガス (11) Carbon dioxide

年 月	生 産(t) Production Quantity	受 入(t) Receipt Quantity	消 費(t) Consumption Quantity	出 荷 Shipments			在 庫(t) Inventory Quantity	Year and Month
				販 売 Sales	その 他(t) Others Quantity			
平成 19 年	877,605	95,346	151,841	811,381	19,525	3,934	8,875	C. Y. 2007
	887,046	117,627	118,407	877,515	19,592	4,435	9,566	2008
	905,716	97,436	119,035	875,783	20,169	5,157	9,575	2009
	917,952	47,207	119,437	836,487	19,463	5,265	9,451	2010
	888,061	50,898	129,556	799,061	19,102	6,123	9,183	2011
平成 21 年度	914,017	82,715	123,959	864,440	19,720	5,196	10,077	F. Y. 2009
	905,902	48,119	115,368	828,935	19,379	5,354	10,276	2010
23 年 1~3 月	176,327	10,268	18,609	165,379	3,660	918	10,276	Q1 2011
	236,201	12,389	42,270	204,830	5,116	2,054	8,717	Q2
	253,125	13,722	42,747	221,347	5,598	1,731	8,310	Q3
	222,408	14,519	25,930	207,505	4,727	1,420	9,183	Q4
23 年 1 月	63,872	3,098	7,948	57,136	1,307	396	10,654	Jan. 2011
	53,289	2,955	2,152	55,514	1,098	60	8,906	Feb.
	59,166	4,215	8,509	52,729	1,255	462	10,276	Mar.
	68,272	3,646	14,273	57,341	1,574	692	9,554	Apr.
	83,445	4,587	13,078	73,917	1,756	756	9,450	May
	84,484	4,156	14,919	73,572	1,787	606	8,717	Jun.
	88,982	4,800	16,221	77,132	1,992	522	7,998	Jul.
	83,201	4,281	13,815	71,396	1,876	650	9,269	Aug.
	80,942	4,641	12,711	72,819	1,730	559	8,310	Sep.
	76,434	4,346	10,366	69,801	1,593	419	8,102	Oct.
	68,460	4,863	4,388	68,155	1,502	390	8,077	Nov.
	77,514	5,310	11,176	69,549	1,633	611	9,183	Dec.

窒素市場規模



平成 23 年
— 2011 —

化学工業統計年報

YEARBOOK OF
CHEMICAL INDUSTRY STATISTICS

窒素 Nitrogen
計 (5~6) Total

年 月	生 産 (10 ³ m ³) Production Quantity	受 入 (10 ³ m ³) Receipt Quantity	消 費 (10 ³ m ³) Consumption Quantity	出 荷 Shipments			在 庫 (10 ³ m ³) Inventory Quantity	Year and Month
				販 売 Sales 数 量 (10 ³ m ³) Quantity	金額(百万円) Amount (¥ million)	その他の (10 ³ m ³) Others Quantity		
平成 19 年	12,696,234	902,149	4,293,062	8,987,166	64,975	315,230	33,204	C. Y. 2007
	13,213,837	872,328	4,250,028	9,499,484	67,133	326,471	38,761	2008
	11,686,062	714,649	3,559,370	8,477,793	60,805	318,997	36,908	2009
	13,612,175	582,264	4,110,954	9,793,548	62,803	284,768	36,109	2010
	13,670,088	646,334	4,090,857	9,935,179	63,820	285,471	37,082	2011
平成 21 年度	12,286,401	723,024	3,750,661	8,904,276	60,782	311,100	32,253	F. Y. 2009
	13,724,016	580,615	4,134,403	9,881,313	62,747	284,497	33,286	2010
23 年 1~3 月	3,404,993	170,156	1,029,709	2,477,205	14,822	70,671	33,286	Q1 2011
	3,338,903	167,946	1,003,079	2,427,079	15,729	75,670	33,016	Q2
	3,484,042	145,514	1,052,075	2,505,327	16,449	74,270	29,927	Q3
	3,442,150	162,718	1,005,994	2,525,568	16,820	64,860	37,082	Q4
23 年 1~12 月	1,173,633	56,714	360,322	850,162	5,089	24,271	31,548	Jan. 2011
	1,090,963	52,312	322,313	794,787	4,926	22,511	35,156	Feb.
	1,140,397	61,130	347,074	832,256	4,808	23,889	33,286	Mar.
	1,069,474	58,905	331,759	775,353	5,160	24,109	29,818	Apr.
	1,135,688	56,406	339,545	826,216	5,256	26,792	29,053	May
	1,133,741	52,635	331,775	825,510	5,313	24,769	33,016	Jun.
	1,164,063	44,968	349,007	839,166	5,474	24,088	29,610	Jul.
	1,180,764	52,125	358,054	848,423	5,479	23,120	32,312	Aug.
	1,139,215	48,421	345,014	817,738	5,496	27,062	29,927	Sep.
	1,170,668	54,379	341,724	856,768	5,682	22,036	34,100	Oct.
	1,130,269	53,999	334,633	828,087	5,592	21,263	33,852	Nov.
	1,141,213	54,340	329,637	840,713	5,545	21,561	37,082	Dec.

Relation between surface orientation and photocatalytic activity of rutile TiO₂ single crystal

Seiya Ogoe, Yousuke Watanabe, Koichi Niwa, and Yasuro Ikuma*

Kanagawa Institute of Technology, Shimoogino, Atsugi, Kanagawa 243-0292, Japan

* Corresponding author: ikuma@chem.kanagawa.ac.jp

Photocatalytic decomposition reaction of linoleic acid and oleic acid on rutile TiO₂ single crystals were studied by measuring the weight of acid. UV light with maximum intensity at the wavelength of 366 nm was used as light source. Single crystals were oriented at (100), (114), (101) and (001) surfaces. For both acids, decomposition at (001) surface was the fastest and the decomposition at (114) surface was the slowest. The difference might be related to unstableness of (001) surface. The decomposition of linoleic acid was faster than that of oleic acid. This difference in reaction rate is related to the number of unsaturated bond in the acid molecule.

Key words: Rutile TiO₂ (001) surface, Linoleic acid, Oleic acid, Coordination number, Decomposition

1. INTRODUCTION

Titanium dioxide (TiO₂) is known to exhibit photocatalytic activity under ultra violet (UV) light irradiation. The first study [1] of the photocatalytic activity of TiO₂ was performed on rutile TiO₂ (001) surface. Since this discovery, many studies on TiO₂ have been reported. In most of the studies, the photocatalytic activity is mainly discussed in terms of band gap energy of the oxide, because UV light of certain energy activates electrons in TiO₂ from valence band to conduction band and resultant electron-hole pairs are used to reduce and oxidize chemicals on the surface of photocatalyst. However, there is other aspect of the photocatalytic activity, especially when oxygen is involved in the photocatalytic reaction. Since photocatalytic reaction takes place at the surface of oxide, orientation and/or structure of the surface could be important for the performance of photocatalytic reaction.

Wilson and Idriss [2, 3] have shown that the oxygen of TiO₂ participates in the decomposition reaction of acetic acid. Lowekamp *et al.* [4] have reported the orientation dependence of photocatalytic reactions on TiO₂ film surfaces. They used the reduction of Ag⁺ to Ag with the help of photocatalyst. Recently we [5] demonstrated that for the oxidation of salad oil by photocatalytic activity, the orientation of rutile TiO₂ surface plays an important role. The photocatalytic activity of (100) and (114) surfaces was little or almost non-existence. However, (101) surface showed higher activity and (001) surface was the best surface among the crystalline surfaces studied in the report.

Salad oil increases its weight in normal oxidation. However it loses its weight during the decomposition by photocatalytic activity of TiO₂. It is relatively stable at room temperature. These are the reasons why we have chosen salad oil as a material to be decomposed by photocatalytic activity [5]. Salad oil is a mixture of several organic acids. Therefore details of

decomposition are not known. In this study, we studied the decomposition of two components of salad oil in order to understand more about the decomposition reaction on the surface of TiO₂.

2. EXPERIMENTAL

The crystallographic orientation effect of rutile TiO₂ single crystals on the photocatalytic activity of TiO₂ was studied by investigating the decomposition (or oxidation) of linoleic acid and oleic acid. The crystals used in this study were TiO₂ single crystals with (001), (100), (101) and (114) surfaces (Shinkosha Co., Yokohama, Japan). These crystals were polished by the supplier to have a flat surface with a difference of 633 nm (the difference between the highest and lowest points) within an area of 10 mm × 10 mm. The crystals were first submerged in 1 mol/L hydrochloric acid solution. They were placed in ethanol and subsequently in water. Finally, they were dried by exposing to UV light. These treatments ensured that the surface was not reconstructed.

First, the weight of single crystal was measured. For the decomposition (or oxidation) experiment, approximately 3.0×10^{-3} g of linoleic acid and oleic acid were placed on the surface of TiO₂ single crystals. The combined weight was measured. The sample was placed in an UV light apparatus (Ushio, SP9-250, maximum intensity at the wavelength of 366 nm) for 60 min to expose the surface of single crystal TiO₂ to UV light, and then the combined weight was measured again. The crystal was subsequently placed in the UV light apparatus for UV irradiation. This process was repeated for different radiation durations.

Optical microscopic observation and IR spectroscopic analysis of the linoleic acid and oleic acid before and after UV irradiation on the TiO₂ crystals were conducted. For this experiment, the (001) and (101) surfaces were chosen, respectively.

3. RESULTS AND DISCUSSION

The results of linoleic acid weight measurement are shown in Figure 1. The results obtained on the different surfaces of rutile TiO_2 are included in the figure. Mass ratio of linoleic acid is the mass of linoleic acid at time, t , divided by the same quantity at $t=0$. The weight of the linoleic acid on the (114) surface is almost constant. The weight of the linoleic acid on the (100) surface decreases slightly. The weight of the linoleic acid on the (101) surface changes almost in the same way as the weight of linoleic acid on (100) surface. The weight of the linoleic acid on (001) surface decreases significantly.

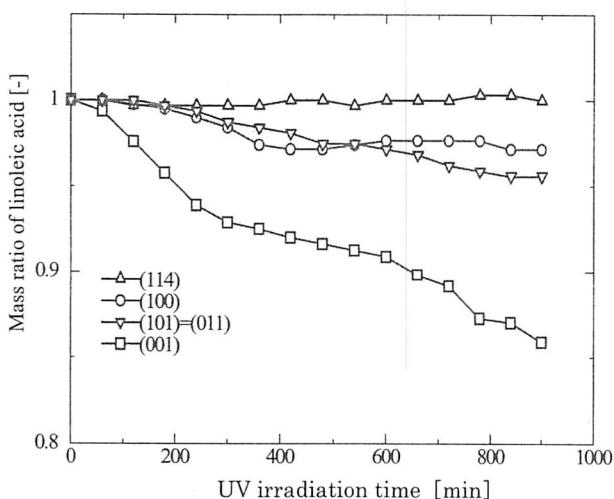


Figure 1. Weight change of linoleic acid expressed by the mass ratio as a function of UV irradiation time. The linoleic acid was on the surfaces of rutile TiO_2 (114), (100), (101) and (001) surfaces.

The optical microscopic observations of linoleic acid on (001) surface are shown in Figure 2. Figure 2 (a) shows a droplet of linoleic acid (round darker part) on the surface of TiO_2 (001) surface (brighter part) before UV irradiation. At this moment, nothing has happened to linoleic acid yet and the edge of linoleic acid droplet is very distinct. The edge of the linoleic acid on the (001) surface after UV irradiation for 22 hrs is shown in Figure 2 (b). It is obvious that the edge of linoleic acid droplet has changed. The edge of linoleic acid is not clear. The edge forms a band where the darkness is not uniform. The existence of bubble may be noticed. This indicates that some kind of gas has formed and trapped in this region.

Combining the results shown in Figure 1 and 2, it is safe to say that linoleic acid has decomposed to form some kind of gas or low boiling point liquid and evaporated. This resulted in the weight loss of linoleic acid and the formation of bubbles at the edge of linoleic acid.

In order to see the effect of different kind of fatty acid, oleic acid was also studied. The results of oleic acid weight measurement are shown in Figure 3, in which the results obtained on the four different surfaces of rutile TiO_2 are included. In this case, the weights of

oleic acid on both (114) and (100) surfaces are almost constant. The weight of the oleic acid on the (101) surface decreased slightly and the weight of the oleic acid on (001) surface decreased most.

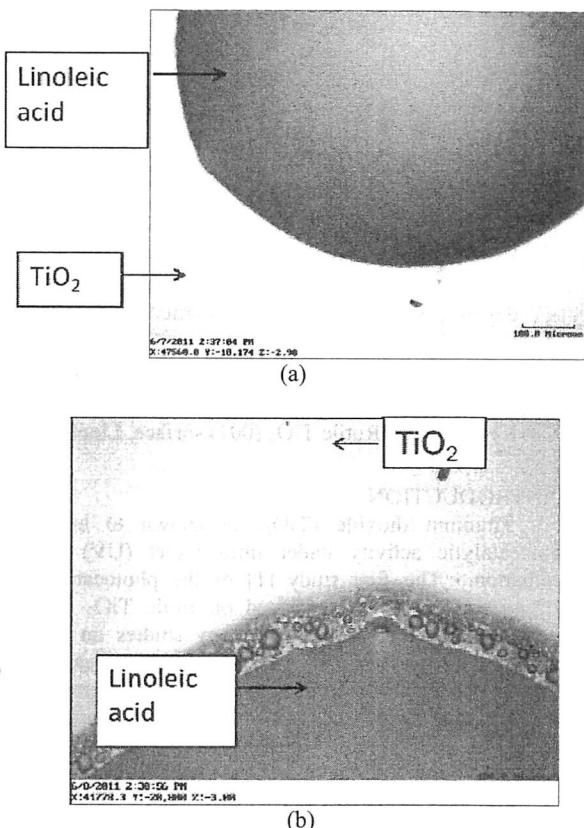


Figure 2. Optical microscopic images of linoleic acid on the surfaces of rutile TiO_2 (001). (a) Before UV irradiation and (b) after UV irradiation for 22 hrs.

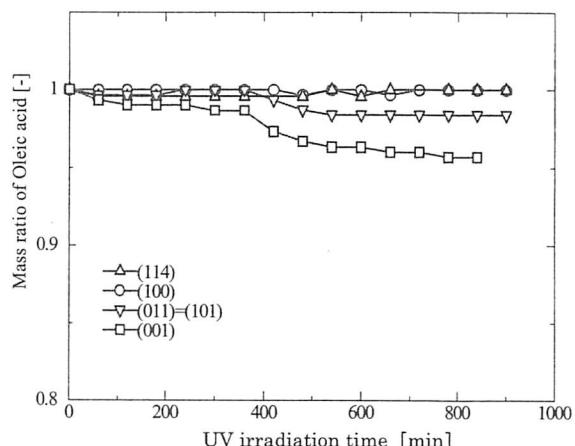


Figure 3. Weight change of oleic acid expressed by the mass ratio as a function of UV irradiation time. The oleic acid was on the surfaces of rutile TiO_2 (114), (100), (101) and (001) surfaces.

Comparing Figures 1 and 3, we notice several features. (1) Decomposition curve is not smooth. In these experiments, we measured a standard weight and TiO_2 with fatty acid. The value of standard weight did not change very much. It changed only at the last digit (0.02×10^{-3} g). Therefore we believe that most of the fluctuation of the data in Figure 1 and 3 are not experimental error. As we discuss later, oxidation of fatty acid involves addition of oxygen and loss of gas. The process might not be continuously progressed. (2) In both acids, the (001) surface is the most effective surface as photocatalyst among the crystal surfaces studied. (3) Decomposition of linoleic acid is faster than decomposition of oleic acid on (001) and (101) surface. (2) and (3) will be discussed later.

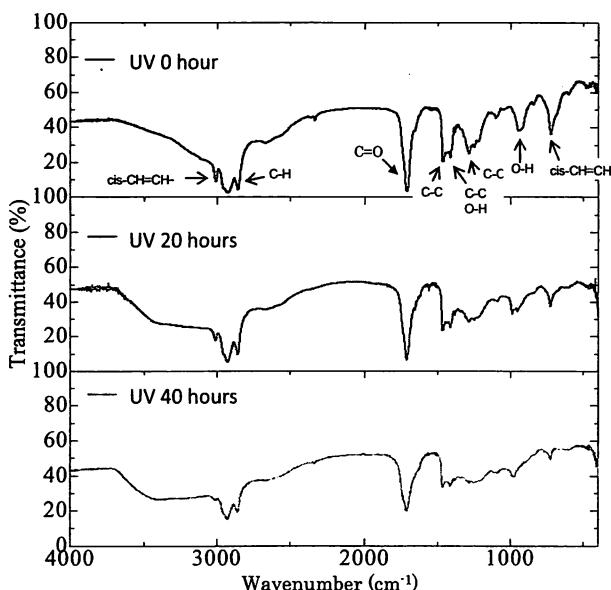


Figure 4. IR spectrum of linoleic acid before and after UV irradiation on the rutile TiO_2 (101) surface.

In Figure 4 and 5 the results of IR study are shown. For both linoleic acid (Figure 4) and oleic acid (Figure 5), absorption peaks due to cis-CH=CH , C=O , etc. are detected before the UV irradiation. IR spectra of oleic acid are almost the same after UV irradiation for 20 hrs and 40 hrs on TiO_2 crystal. However, IR spectra of linoleic acid have changed, especially absorption peak due to cis-CH=CH has decreased. We see fewer changes in other parts, such as C=O , C-H , etc.

Unsaturated fatty acids with two double bonds, such as linoleic acid, generally undergo changes shown in Figure 6 at room temperature in air. In the first step, hydrogen is detached from carbon between two double bonds, forming free radical. In the next step, oxygen is added to this molecule and form peroxide radical (ROO^\cdot). And finally it will change to linoleic acid hydroperoxide. This change in linoleic acid will lead to weight gain but not the weight loss. The change in linoleic acid by normal oxygen involves normal oxygen and is shown in Figure 6. However, the change in linoleic acid by photocatalytic reaction will be different

because radical oxygen may be involved in this case and breaking the chain of carbon might take place. The product of this has short carbon chain and will easily be vaporized.

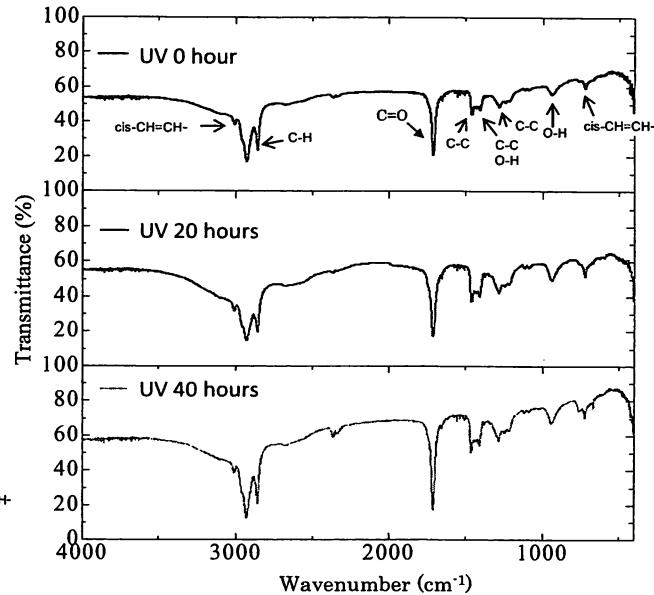


Figure 5. IR spectrum of oleic acid before and after UV irradiation on the rutile TiO_2 (101) surface.

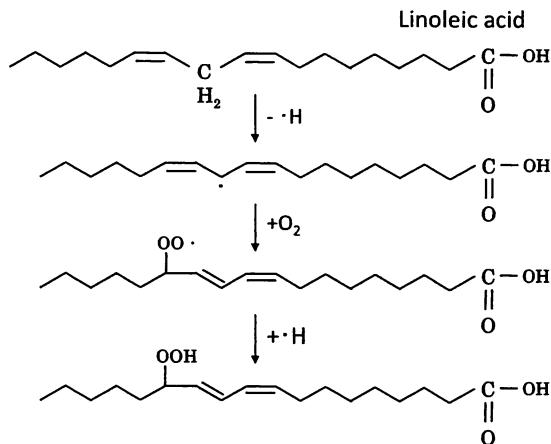


Figure 6. Oxidation reaction of linoleic acid at room temperature in air (without photocatalyst).

Oleic acid, on the other hand, has only one double bond in the carbon chain. Therefore the formation of free radical would be more difficult than the case of linoleic acid. Further investigation is needed to find out the kind of products of these reactions.

The photocatalytic decomposition reaction of linoleic acid and oleic acid involves oxygen on the surface of TiO_2 . The side view of (100), (114), (101) and (001) planes of rutile TiO_2 are shown in Figure 7. Large spheres are oxygen and small spheres are titanium. These figures are made simply by cutting the bulk

crystal at (100), (114), (101) and (001) planes. No reconstruction of surface was made in these figures. If we just count the number of surface titanium, n_{Ti} , and the number of surface oxygen, n_O , then we can calculate oxygen concentration at the surface, $n_O/(n_{Ti} + n_O)$. The results are shown in Table 1. Obviously oxygen concentration at surface, $n_O/(n_{Ti} + n_O)$, does not correlate with the photocatalytic activity of these surfaces.

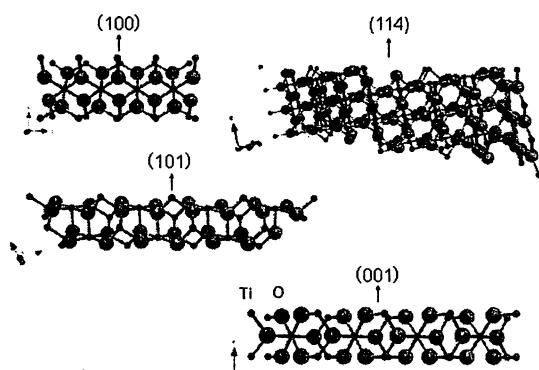


Figure 7. Side views of rutile (100), (114), (101) and (001) surfaces. Large spheres are oxygen and small spheres are titanium.

Table 1. Oxygen concentration at rutile surfaces and coordination number of Ti at the surface.

Rutile surface	(100)	(114)	(101)	(001)
$(n_O/(n_{Ti} + n_O)) \times 100$	50	67	50	67
Coordination number of Ti at surface	5	4, 6	5	4

Coordination numbers of Ti at (100), (114), (101) and (001) surfaces are shown in Table 1. The data were obtained from literature [6, 7]. Ti on the (001) surface has the lowest coordination number, four. This is very low compared with the coordination number of Ti in the bulk which is six. This implies that Ti at (001) surface is unstable. The unstableness of rutile TiO_2 (001) surface is probably responsible for the high activity of the surface.

4. CONCLUSIONS

Studying the decomposition reaction of linoleic acid and oleic acid on rutile TiO_2 surface with several different crystallographic orientations, we found:

- (1) Rutile TiO_2 (001) surface showed the highest photocatalytic activity among the crystal surfaces studied in this work. Unstability of rutile TiO_2 (001) surface might be responsible for the high activity of the surface.
- (2) The photocatalytic decomposition of linoleic acid is faster than that of oleic acid. The difference is related to the number of unsaturated bonds in the acid molecule.

Acknowledgement

This work was supported in part by a Grant-in-Aid for Scientific Research (C) No. 23560807 from the Japan Society for the Promotion of Science.

References

- [1] A. Fujishima and K. Honda, *Nature*, **238**, 37-38 (1972).
- [2] J. N. Wilson and H. Idriss, *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 11284-11285 (2002).
- [3] J. N. Wilson and H. Idriss, *J. Catalysis*, **214**, 46-52 (2003).
- [4] J. B. Lowekamp, G. S. Rohrer, P. A. Morris Hotsenpiller, J. D. Bolt, and W. E. Farneth, *J. Phys. Chem. B*, **102** [38], 7323-7327 (1998).
- [5] Y. Ikuma, S. Ogoe, Y. Watanabe, and K. Niwa, H. Tajiri and O. Sakata, *J. Ceram. Soc. Japan*, **121** [2] 254-257 (2013).
- [6] U. Diebold, *Surface Science Reports*, **48**, 53-229 (2003).
- [7] J. B. Lowekamp, Ph. D. thesis, Carnegie Institute of Technology, Pittsburgh, PA, U. S. A. (1999).

(Received February 25, 2013; Accepted April 5, 2013)

いまさら聞けない、こんなこと—第44回
Answers to Questions You Were Afraid to Ask(44)

Q73：スピノーダル分解とは何か、耐火物でも起こるのか。

What is spinodal decomposition?

A73：

スピノーダル分解は2成分系において存在する非平衡固相が2つの平衡固相に分解するときの分解過程の1つである。他の分解過程に核生成・成長過程がある。これらの2分解過程の違いも踏まえて説明しよう。

ここでは、端成分がAとBからなる2成分系を考える。簡単のために、この2成分系は完全固溶型の固溶体 a をつくるとする（図1）。平衡状態図（相図）はギブズ自由エネルギーが最小の状態を示したものである。図1の固溶体領域ではAとBの混合系の自由エネルギー ΔG_m は

$$\Delta G_m = \Delta H_m - T\Delta S_m \quad (1)$$

と書ける。式中の混合エンタルピー ΔH_m は正の値と負の値を取り得る。ここで、 ΔS_m は混合エントロピー、 T は絶対温度である。最初に $\Delta H_m < 0$ となる系を考えよう。これはA原子とB原子が互いに引合う傾向にあることを意味する。 $T > 0$ 、 $\Delta S_m > 0$ なので、 $-T\Delta S_m < 0$ である。よって、 ΔG_m などを図示すると図2となり、 ΔG_m は全領域で常に下に凸となる。数学的には全固溶組成範囲（ $0 < X < 1$ ）で

$$d^2(\Delta G_m)/dX^2 > 0 \quad (2)$$

である。ここで、 X はBのモル分率である。

一方、 $\Delta H_m > 0$ となる系では、A原子とB原子が互いに反発しあう傾向にある。 $\Delta H_m > 0$ 、 $-T\Delta S_m < 0$ なので、状況によっては ΔG_m は図3となる。すなわち、 $d^2(\Delta G_m)/dX^2 < 0$ の領域が現れる。

$\Delta H_m > 0$ の場合をもう少し詳しく見てみよう。高温では、 $| -T\Delta S_m | > |\Delta H_m|$ なので、 ΔG_m は $d^2(\Delta G_m)/dX^2 > 0$ となる。この温度を図4(a)の T_1 で、その温度での ΔG_m を(b)で示

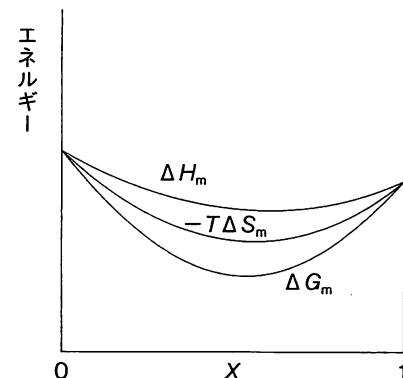


図2 $\Delta H_m < 0$ の固溶体をつくる系の ΔG_m 、 ΔH_m と $-T\Delta S_m$ の組成依存性

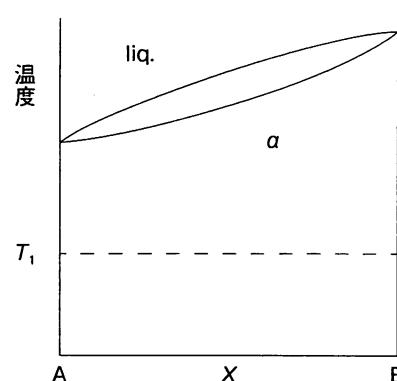


図1 固溶体をつくる2成分系の代表的な状態図

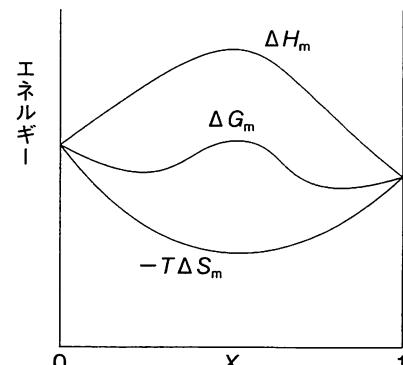


図3 $\Delta H_m > 0$ の固溶体をつくる系の ΔG_m 、 ΔH_m と $-T\Delta S_m$ の組成依存性。2相分離領域が存在する

す。図2と同じで、下に凸である。しかし、低温では $-T\Delta S_m < |\Delta H_m|$ となり、 ΔG_m には $d^2(\Delta G_m)/dX^2 < 0$ の領域が出現する。この温度を図4(a)の T_3 で、その温度での ΔG_m を図4(c)に示す。 $d^2(\Delta G_m)/dX^2 < 0$ の領域が現れるのは、図4(a)の T_2 以下の温度である。

図4(a)のドーム型の領域は2相分離領域であり、溶解

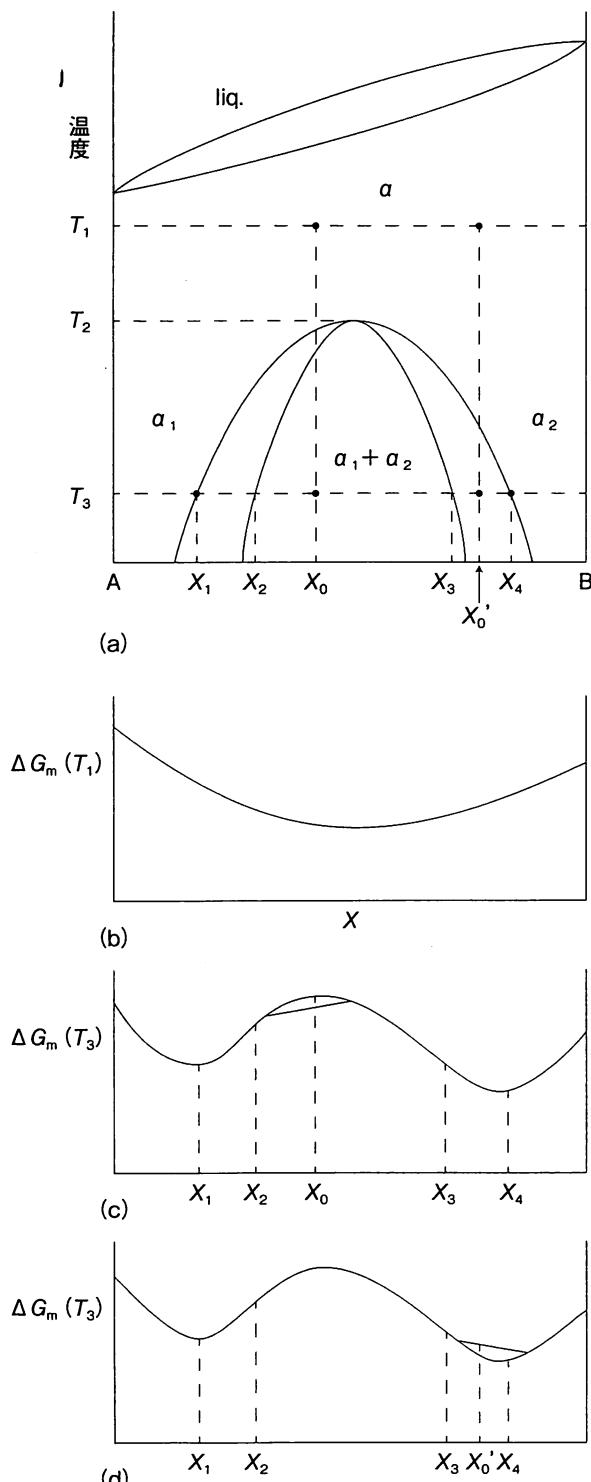


図4 2相分離領域が存在する (a) 状態図と (b) 温度 T_1 、(c) 温度 T_3 、(d) 温度 T_3 における ΔG_m の組成依存性

度ギャップ (miscibility gap) とも呼ばれる。 T_3 では、 $0 < X < X_2$ の間と $X_3 < X < 1$ の間で ΔG_m は下に凸であり、 $X_2 < X < X_3$ の間で ΔG_m は上に凸な曲線となる。

図4(a)のように、平均組成 X_0 の混合物が温度 T_1 に保持され平衡状態になった後、次に温度 T_3 に急冷されたことを考えよう。温度 T_1 では均一な固溶体 a であり、温度 T_3 へ急冷した直後の自由エネルギーは図4(c)の X_0 での値となる。つまり、この混合物は温度 T_3 に急冷されると不安定な状態になる。それは、Aが多い混合物とBが多い混合物を生じるような組成のちょっとした揺らぎにより、系の自

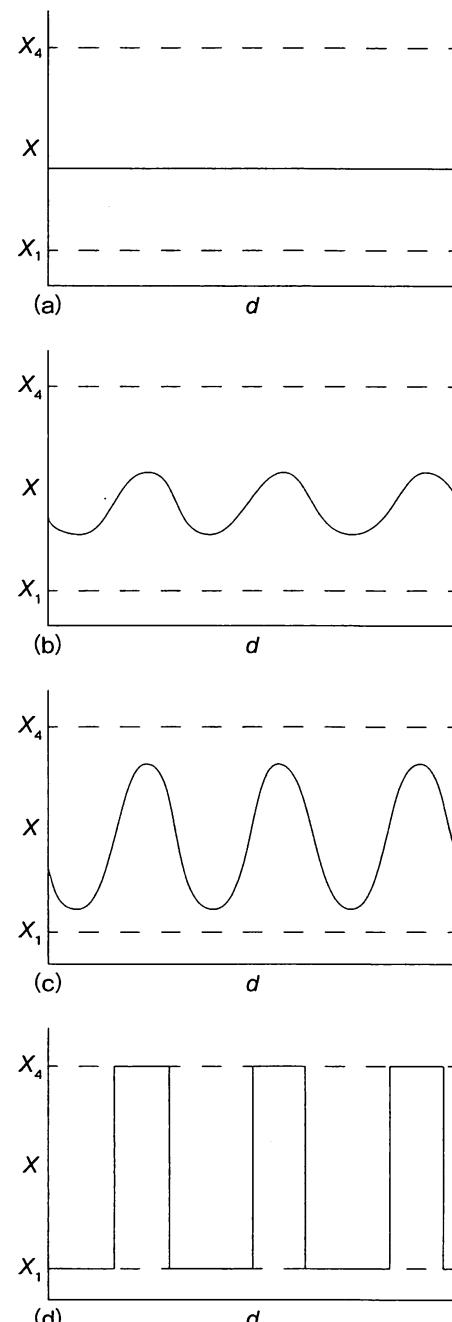


図5 スピノーダル分解における組成変化。時間は (a), (b), (c), (d) の順に経過

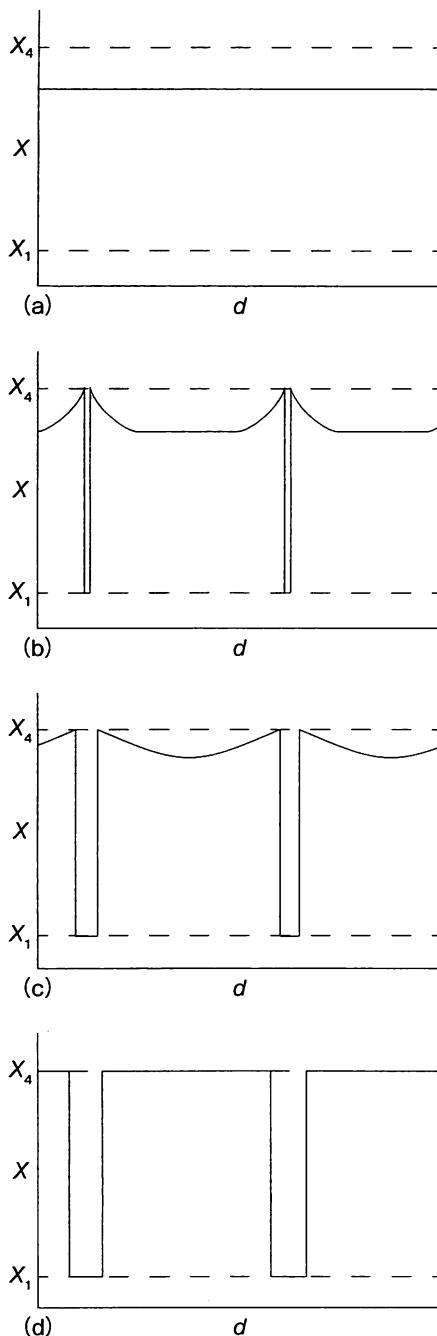


図 6 核生成・成長による分解における組成変化。時間は (a), (b), (c), (d) の順に経過

由エネルギーが低下する(図4(c)の X_0 付近の直線)からである。これに伴い、組成勾配に逆らった拡散(up-hill diffusionという)が生じる(図5)。図中の d は混合物中の位置である。Aが多い混合物とBが多い混合物への分解は温度 T_3 における a_1 相と a_2 相の平衡組成 X_1 , X_4 に達成するまで継続する。この分解をスピノーダル分解(spinodal decomposition)という。スピノーダル分解では、後に述べる核生成のエネルギー障壁がなく、分解は自発的に進行する。

一方、混合物の平均組成がスピノーダル分解領域の外側にある場合(例えば図4(a)の組成 X_0' が T_1 で平衡状態にされた後、 T_3 の温度になったとき)、 T_3 での自由エネルギー曲線は X_0' において下に凸であるから、組成の揺らぎ(つまり分解)は系の自由エネルギーを上げてしまう(図4(d)の X_0' 付近の直線)。このような分解では、大きく組成の異なる2つの領域に分かれる必要があり、これは核生成・成長(nucleation and growth)過程によって生じる。この場合には、図6に示すように、通常のdown-hill diffusionが生じる。核生成・成長過程による分解では、分解による自由エネルギー変化が大きくないと、駆動力が充分でなく、分解は進行しにくい。

材料科学の分野で知られている理論では、実験結果を説明するために後から理論が考え出された例が多い。しかし、スピノーダル分解は例外で、マサチューセッツ工科大学の学生が核生成・成長以外の分解が可能であることを理論的に見いだし、その後実験的にその存在が確認されたものである。

耐火物でも上で述べた条件が満たされれば、スピノーダル分解が起こる可能性はある。固溶体を形成するが、両端の成分が互いに反発しあう傾向にある($\Delta H_m > 0$)と、2相分離領域が出来る可能性がある。セラミックスでは、 $\text{SnO}_2\text{-TiO}_2$ 系、 $\text{Y}_2\text{O}_3\text{-UO}_2$ 系などで固溶体に2相分離領域があることが知られている。また、ガラスを形成する系、例えば、 $\text{SiO}_2\text{-BaO}$ 系、 $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ などで、液相の2相分離領域があることは良く知られている。

(回答者：神奈川工科大学／伊熊泰郎)

「いまさら聞けない、こんなこと」の疑問や質問を受け付けています。

耐火物技術協会、事務局、小林 宛

FAX : 03-3572-0175 E-mail : kobayashi@tarj.org Web : <http://www.tarj.org/>



Copyright © 2014 American Scientific Publishers
All rights reserved
Printed in the United States of America

Article

Journal of
Nanoscience and Nanotechnology
Vol. 14, 3181–3186, 2014
www.aspbs.com/jnn

Fabrication of Visible-Light-Driven N-Doped Ordered Mesoporous TiO₂ Photocatalysts and Their Photocatalytic Applications

S. Anandan^{1,*}, T. N. Rao¹, R. Gopalan², and Y. Ikuma³

¹Centre for Nano Materials, International Advanced Research Centre for Powder Metallurgy and New Materials, Hyderabad 500005, India

²Centre for Automotive Energy Materials, International Advanced Research Centre for Powder Metallurgy and New Materials, Chennai 600113, India

³Department of Applied Chemistry, Kanagawa Institute of Technology,
1030 Shimoogino, Atsugi, Kanagawa 243-0292, Japan

Herein we report a facile method for the synthesis of N-doped crystalline mesoporous titanium dioxide (NMT) with ordered structure. Structural characterization and HR-TEM studies revealed that NMT exhibits pure anatase phase with highly crystalline ordered mesoporous structure in NMT. The N₂ isotherms are of type IV with an H1 hysteresis loop and a pronounced capillary condensation step at high relative pressure for NMT. The presence of NMT in the presence of KCl showed a well-ordered mesoporous structure. The reflection peaks at 220, 410, 1150, 2021 cm⁻¹ on XRD patterns and absorption at 365, 541, 565 nm in visible region above 400 nm, owing to the substitution of nitrogen in the TiO₂ lattice, which confirmed by the presence of peak at 401 eV for N1s. The efficiency of photocatalyst was evaluated by the degradation of Rhodamine-B and anti-bacterial activity against *E. coli* under visible-light irradiation. N-doped mesoporous TiO₂ shows superior photocatalytic and anti-bacterial activity compared to pure TiO₂ under visible-light irradiation. The enhanced photocatalytic activity of NMT is attributed to synergistic effect of NMT that is N-doping and well ordered crystalline mesoporous structure with high surface area of NMT. These findings suggest that N-doped mesoporous TiO₂ has potential application in many areas such as degradation of hazardous pollutants, anti-bacterial agents, fuel cells, battery electrode, sensors, opto electronic devices, photo active self-cleaning surfaces.

Keywords: Nitrogen Doped TiO₂, Photocatalysis, Degradation, Anti-Bacterial Activity.

1. INTRODUCTION

Semiconductors are a popular topic because it has various functionalities and application in the field of photocatalysts and photo-electricity. Among them, titanium dioxide (TiO₂) possessed the highest reported photocatalytic efficiency to date, has been used in various practical applications such as air purification and self-cleaning building materials^{1–4} due to its extraordinary physico-chemical characteristics. However, the photocatalytic efficiency of pure TiO₂ is quite limited, mainly due to lack of visible-light absorption, and rapid recombination of photo-generated electron–hole pairs within TiO₂ particles.

However, its use is limited due to its wide band-gap (~3.2 eV), which means that it can only utilize ultraviolet light ($\lambda < 385$ nm). Doping of cations (transition metals) and anions (nitrogen, sulfur, carbon, or boron) into semiconductors have been extensively studied to enhance the activity of photocatalysts under visible-light irradiation. Transition metal ion doping has proved to be partially successful because it may induce the thermal instability of TiO₂, and the dopant sites, also serving as carrier recombination centers, led to reduce the photocatalytic efficiency.⁵ It has been reported that doping with anion elements such as N, S and C in to TiO₂ extended the light absorption of TiO₂ in to visible-light region. A considerable number of materials have been reported^{6–9} on the

*Author to whom correspondence should be addressed.

basis of this strategy. Especially, Asahi et al.⁶ reported that the photocatalytic activity and the hydrophilicity of TiO₂ could be enhanced by nitrogen doping into TiO₂. However, in spite of such extensive studies, most systems are still not satisfactory from the viewpoint of practical purposes. This is because, for example in the cation-doped semiconductors, the metal dopants introduced deep impurity levels in the forbidden band of the photocatalysts, which act as recombination centres, and thus impair the photocatalytic activity.¹⁰ The efficiency of visible-light photocatalysts are not satisfactory compared to the performance demanded by the practical application, and hence the preparation of more efficient visible-light photocatalyst is anticipated. On the other hand mesoporous materials have been paid much attention in both scientific and various practical applications. Very recently, Ariga et al.¹¹ reported the recent developments of various mesoporous materials including mesoporous metal oxides and their related functions for sensing and controlled release of target molecules. Mesoporous metal oxides with regular geometries have found application in catalysis, medical diagnosis, environmental remediation, sensor application, separation technology, Li-ion battery, hydrogen storage and bio-materials engineering.^{12–21} Among these metal oxides, mesoporous TiO₂ is particular interest as it can be used as an efficient photocatalyst for various photocatalytic applications including pollutant degradation²² and hydrogen production efficiency.^{23,24} Herein, we report the synthesis of N-doped mesoporous TiO₂ (NMT) and its photocatalytic properties. The synthesis of NMT was carried out by a simple template method using SBA-15 as the template, ethylenediamine as the nitrogen source and titanium tetra-isopropoxide as the source for Ti. The N-doping induced visible-light absorption in mesoporous TiO₂ by the formation of N 2p impurity state above the valence band of TiO₂. The enhanced photocatalytic activity of NMT can be elucidated on the account of synergistic effect of N-doping and highly crystalline mesoporous structure of NMT.

2. EXPERIMENTAL DETAILS

2.1. Materials

Titanium (IV) isopropoxide (97%, Sigma-Aldrich) and ethylenediamine (99%, Wako Pure Chemical Industries Ltd.) were used as the sources for Ti and N respectively. 1-propanol (99.5%, Wako Pure Chemical Industries Ltd.) was used to disperse titanium (IV) isopropoxide before it adds into ethylenediamine. All the reagents and chemicals were analytical grade and used as such without further purification. Rhodamine-B (99.5%, Wako Pure Chemical

Industries Ltd.) was used as the model pollutant for degradation study.

2.2. Preparation of N-Doped Mesoporous TiO₂ Photocatalysts

The synthesis of N-doped mesoporous TiO₂ (NMT) was carried out as reported previously,²⁴ with the silica source as SBA-15 instead KIT-6. In a typical synthesis of NMT, 0.5 g of calcined SBA-15 was added to 1.757 g of ethylenediamine and mixed thoroughly. To this mixture, 4 g of titanium tetra-isopropoxide dissolved in 1-propanol was added and the resultant mixture was heated in an oil bath at 90 °C for 5 h. The obtained solid mixture was dried at 150 °C and ground into a fine powder. Then, the materials were heat-treated in the presence of nitrogen/oxygen flow at various temperatures to obtain N-doped crystalline highly ordered mesoporous TiO₂. After calcinations, the silica was completely removed from N-doped mesoporous TiO₂/silica composite nanoparticles as reported previously²⁵ by dispersing the composites in aqueous NaOH solution (2 M) at 80 °C for 24 h continuous stirring, since TiO₂ is highly stable under alkaline condition. The particles were collected by filtration and washed three times with ethanol–water mixture. The XRD results reveal that the pattern of silica removed N-doped TiO₂ is similar to standard TiO₂, suggesting that TiO₂ is stable during the removal. Pure TiO₂ was prepared under the same conditions without the addition of ethylenediamine.

2.3. Characterisation

The powder X-ray diffraction (XRD) pattern of NMT was collected using a Rigaku diffractometer with Cu K α ($\lambda = 0.154$ nm) radiation. The diffractograms were recorded in the 2 θ range of 0.8° to 10° with a 2 θ step size of 0.01° and a step time of 10 s. Specific surface area, pore volume and pore size distributions of materials were determined from N₂ adsorption–desorption isotherms at 77 K using a Belsorb mini II sorption analyzer. The sample morphology was observed using a high-resolution transmission electron microscope (HRTEM-JEOLJEM2000EX2). To determine the presence of elements such as Ti, O and N on NMT, X-ray photoelectron spectroscopy analysis (XPS) was carried out. X-ray photoelectron spectroscopic (XPS—Thermo Electron Corporation Theta Probe) instrument equipped with ultrahigh vacuum chambers was used to evaluate the presence of elements in NMT. Mg K-alpha X-rays (100 W) was used as the source at a takeoff angle of 5–75° and vacuum pressure of 10⁻⁶–10⁻⁷ Torr. The energy of monochromatic Mg K-alpha X-rays used for analysis is 1486.6 eV.

2.4. Photocatalytic Degradation Studies and Analysis

The photochemical reactor was made up of quartz glass with dimension of 22 × 5 cm (height × diameter). The

top portion of the reactor was constructed with ports for sampling and water circulation. The photocatalytic degradation was carried out with 100 ml aqueous Rhodamine-B (2×10^{-5} M) solution and 100 mg of pure TiO₂ or NMT. The experiments were performed at room temperature. The halogen lamp emitting wavelengths above 400 nm was used for the irradiation. The reactor was covered in black to avoid light scattering, causing leakage and harmful effects in the neighborhood. Prior to irradiation, the slurry was stirred for 30 min to reach adsorption equilibrium followed by irradiation with halogen lamp for degradation. Aliquots were withdrawn from the suspension at specific time intervals and immediately centrifuged at 1500 rpm. The filtrate was analyzed by UV spectrophotometer to find the extent of degradation of Rhodamine-B.

2.5. Anti-Bacterial Activity

Escherichia coli (*E. coli*, DH5 α) was used for the anti-bacterial activity test of the photocatalysts. A bacterial suspension of *E. coli* was prepared by cultivating the bacteria for one night, and then diluting the solution so that the initial bacterial content was from 1×10^5 to 5×10^5 colony forming units (CFU)/ml. The photocatalytic reactor used for the anti-bacterial activity was sterilized and then dried. 30 ml phosphate buffer solution and 50 mg of either pure TiO₂ or NMT was added to photocatalytic reactor and 0.5 ml of *E. coli* suspension was transferred into the above solution. The sample was kept under 150 W at 120 min under a halogen lamp wavelength above 400 nm. After illumination, the bacterial solutions recovered from the TiO₂ related substrates, and an aliquot of fresh culture medium was used to collect the residual bacteria on the substrates. The samples withdrawn at regular intervals were diluted (6×10^4) and collected on a petri dish to cultivate the bacteria for 24 h at 37 °C, so that the bacterial colonies would form. The percentage of survival bacteria was quantified to determine the efficiency of pure TiO₂ and NMT photocatalysts.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Structural and Morphological Studies

Figure 1 shows the high-angle XRD patterns of pure TiO₂ and NMT photocatalysts. The XRD pattern of as-synthesized NMT is also included in Figure 1. As synthesized NMT (Fig. 1(a)) shows a broad XRD pattern due to amorphous nature, and the material calcined at 400 °C (Fig. 1(b)), and 600 °C (Fig. 1(c)) exhibits a well-defined, crystalline, diffraction peaks corresponding to anatase TiO₂. Impurity peaks for neither Ti-N nor O-Ti-N were detected and the materials mainly showed pure anatase phase. The peaks observed at $2\theta = 25.1^\circ$ (101), 37.6° (004), 47.7° (200), 53.8° (105), 54.6° (211), 62.5° (204), 68.6° (116), 69.8° (220), and 74.75° (215) are assigned to anatase titanium dioxide.²⁶ The XRD patterns of TiO₂ (Fig. 1(d)) is similar to NMT, which indicates that

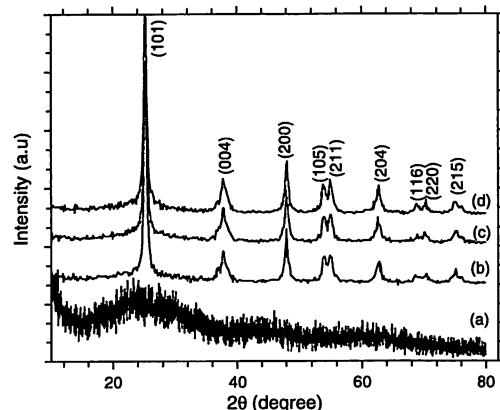


Figure 1. High angle XRD patterns of N-doped mesoporous TiO₂ before calcinations (a) and calcined at 400 °C (b), 600 °C (c), and pure TiO₂ (d).

doping of nitrogen does not influence the crystal structures of TiO₂. Moreover, there is no change in the d space values, which implies that in NMT, nitrogen has been introduced into the lattice without changing the average unit cell dimension.²⁷ The low angle powder X-ray diffraction patterns of NMT along with pure TiO₂ are shown in Figure 2. A well resolved (100) reflection is obtained in calcined NMT (Fig. 2(b)) with $2\theta = 4.5^\circ$ and $d = 5.42$ nm being characteristics of NMT. The peak intensity of calcined NMT (Fig. 2(b)) is higher than as-synthesized NMT (Fig. 2(a)) and lesser than pure TiO₂ (Fig. 2(c)). The decrease in intensity of NMT compared with pure TiO₂ may due to blocking of pores by N-dopants. HR-TEM images of NMT (Fig. 3(a)) and pure TiO₂ (Fig. 3(b)) shows the presence of mesoporous nature (honey comb structure) with well-ordered structure. Figures 3(a) and (b)

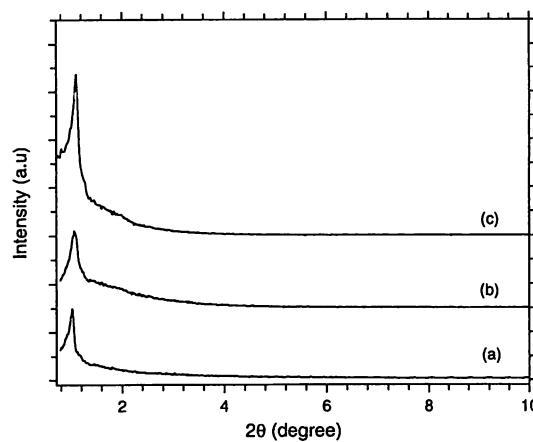


Figure 2. Low angle XRD patterns of mesoporous N-doped mesoporous TiO₂ before calcinations (a) and calcined at 400 °C (b), and pure TiO₂ (c).

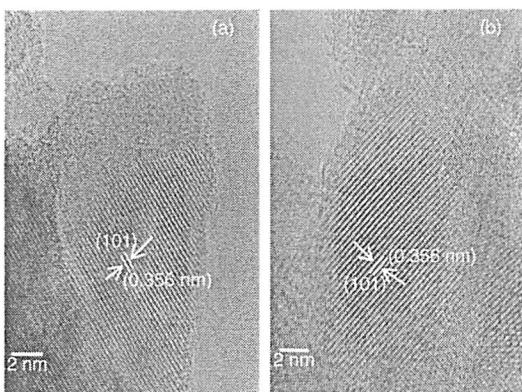


Figure 3. HR-TEM images of (a) N-doped mesoporous TiO₂, and (b) pure TiO₂.

reveal clear lattice fringes with spacing of about 0.35 nm matches that of the (101) crystallographic plane of TiO₂ anatase phase. The N₂ isotherms are of type IV with an H1 hysteresis loop and a pronounced capillary condensation step at high relative pressure for NMT and pure TiO₂, suggesting the presence of well-ordered mesoporous structure. This result is good agreement with low-angle XRD and HR-TEM results. BET measurements were carried out for NMT calcined at different temperature, and the surface areas were 288.32 m²/g for 400 °C, 220.58 m²/g for 500 °C, and 220.58 m²/g for 600 °C respectively. The pore volume and pore diameter were 0.3176 cm³/g, 0.3012 cm³/g, 0.2812 cm³/g and 4.4063 nm, 4.7226 and 5.0993 nm for 400 °C, 500 °C, and 600 °C respectively. Surface area and pore volume decreases with increasing calcination temperature whereas pore diameter increases with increasing temperature. The decrease in surface area with increasing temperature is due to the increase in the crystal size. The high surface area of NMT at 400 °C can be attributed to a lower tendency for agglomeration by the TiO₂ nanoparticles, i.e., TiO₂ nanoparticles possess an inherent homogeneous distribution. The textural parameters of pure TiO₂ are comparable with NMT. The larger surface area, small particle size, and mesoporous nature of NMT could be ideal qualities for the enhancement of photocatalytic activity.

3.2. UV-Vis Spectrum of N-Doped Mesoporous TiO₂ Photocatalysts

Since, anion doping influences the light absorption characteristics of TiO₂, UV-diffuse reflectance spectral measurements were carried out for N-doped mesoporous TiO₂ and the results were compared with pure TiO₂ as shown in Figure 4. The reflectance spectrum of NMT as synthesized (Fig. 4(a)) shows broad visible-light absorption ($\lambda \sim 400$ –800 nm) due to free N-enriched compounds before calcinations process, whereas NMT calcined at 400 °C (Fig. 4(b)) exhibit an absorption shoulder in the

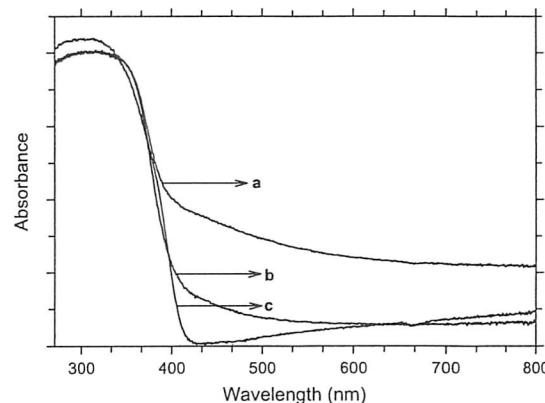


Figure 4. UV-vis spectra of N-doped mesoporous TiO₂ {as-syn (a), calcined at 400 °C (b)}, and pure TiO₂ (c).

visible region ($\lambda \sim 400$ to 600 nm). However, pure TiO₂ (Fig. 4(c)) shows absorption at wavelength below 400 nm. The red shift in NMT attributed to the formation of separate, higher energy isolated narrow band contributed by the localized of N-2p states in the band structure.^{7,27} It was reported that the origin of visible-light absorption in TiO₂ is due to the mixing of N 2p with O 2p states in the valence band.⁶ When TiO₂ is doped by nitrogen, the N 2p states might play a significant role contributing the formation of O 2p state. Such interaction between the N 2p and O 2p states influence the trapping and de-trapping process.²⁸ Though contradiction opinion about origin of visible-light absorption by N-doping, it was concluded from most of the previous studies that visible-light absorption in N-doped TiO₂ is mainly due to the formation of N 2p impurity states above the valence band of TiO₂.

3.3. X-Ray Photoelectron Spectroscopic Analysis

Figure 5(a) illustrates the XPS survey spectra of pure TiO₂ and NMT which shows that materials contain not only Ti, and O but also N elements. The peak at 284.4 eV corresponds to adventitious elemental hydrocarbon from the XPS instrument itself. The high resolution spectrum for N 1s, Ti 2p, and O 1s are shown in Figures 5(b)–(d) respectively. N 1s core level spectrum shows broad peak at 401 eV (Fig. 5(b)) and it is typical of N-doped TiO₂, which can be attributed to the electron binding energy of N atom in the environment of O-Ti-N. It has been reported²⁹ that N 1s feature appears at 401.3 eV corresponds to O-Ti-N linkage and our results attributed the peak at 401 eV is due to the N-anion incorporated in the TiO₂ as O-Ti-N structural feature. This is further confirmed by the shift in the binding energy of Ti 2p (459.5 eV), and O 1s (533.2 eV) of NMT compared to that of Ti 2p (459.9 eV) and O 1s (533.8 eV) of pure TiO₂ as shown in Figures 5(c) and (d). Thus, the observed changes in the XPS provide

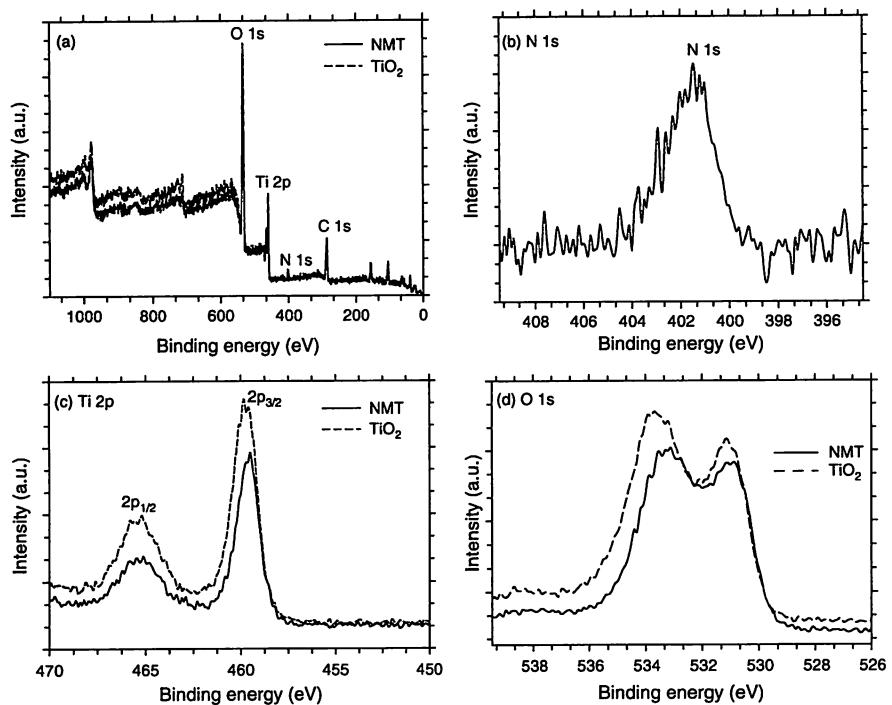


Figure 5. XPS spectrum of N-doped mesoporous TiO₂ and pure TiO₂. (a) Survey spectrum, (b) N 1s, (c) Ti 2p, and (d) O 1s spectrum.
Delivered by Publishing Technology to: Yasuro Ikuma
IP: 220.110.153.202 On: Sat, 31 May 2014 05:54:25
Copyright American Scientific Publishers

consistent structural information for O-H-N formation, and the atomic composition of C, O, T and N elements for NMT is 28.79, 13.21, 56.78 and 1.09 atom.% respectively.

3.4. Photocatalytic Activity

To evaluate the photocatalytic activity of pure TiO₂ and NMT, a set of photocatalytic degradation of Rhodamine-B was carried out in an aqueous suspension having an initial concentration of Rhodamine-B at 2×10^{-5} M under the visible-light illumination. The results are shown in Figure 6. The results demonstrated that NMT showed enhanced adsorption as well as photocatalytic activity for the degradation of Rhodamine-B. However, pure TiO₂ did not show photocatalytic activity under visible-light illumination because of its large band gap. The decrease in concentration of Rhodamine-B by TiO₂ is due to adsorption alone as it having textural parameters similar to NMT. The high photocatalytic activity of NMT is attributed to anion (N) doping on TiO₂. Moreover, the high surface area, well ordered mesoporous structure, and small particle size of NMT are also contributed to high activity of NMT due to high adsorption and diffusion of the Rhodamine-B molecules. Thus, synergistic effect of NMT that is N-doping and excellent textural parameters of NMT are alone reasons for the high photocatalytic activity of NMT under visible-light illumination. To determine the bactericidal activities of testing material, *E. coli* placed on

the reactor along with phosphate buffer solution and TiO₂ or N-doped mesoporous TiO₂ (NMT) photocatalysts. Then the above set up were irradiated with visible light, and the levels of surviving bacteria in terms of colony forming units (CFU) were quantified. Decrease in the number of viable *E. coli* after photocatalytic experiment as a function of irradiation time evaluated and shown in Figure 7. In order to know the effect of UV, only UV irradiated

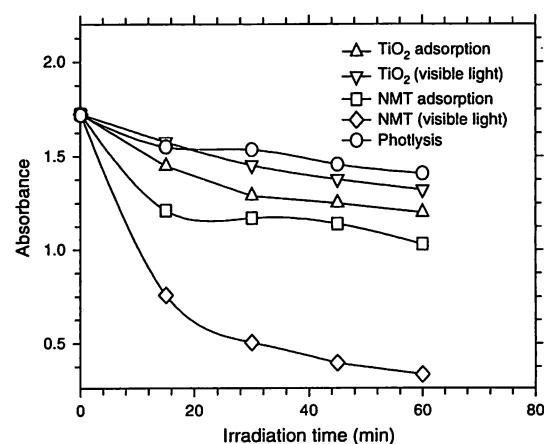


Figure 6. Photocatalytic degradation of Rhodamine-B using TiO₂ and NMT under visible-light illumination.

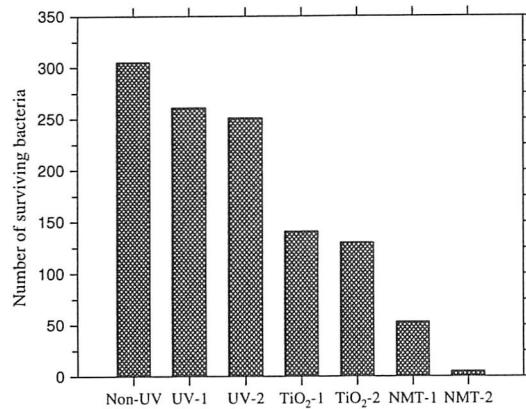


Figure 7. Anti-bacterial activity of TiO₂ and NMT under visible-light illumination.

experiments without photocatalysts were carried out and included in Figure 7. The numerical number 1 and 2 in Figure 7 refers to irradiation time of 60 min and 120 min respectively. The bacterial killing efficiency using NMT is significantly greater than that of pure TiO₂ under visible light (Fig. 7). Bacterial growth was still confluent after 60 min exposure to visible-light illumination and subsequently underwent a slow decrease after 120 min. Conversely, a significant growth reduction was observed after 60 and 120 min of irradiation. In addition to visible-light, Using NMT, a slight trend was observed, but the reduction in CFU numbers appeared three times higher than for pure TiO₂ with the irradiation of 60 min. Under these conditions, a very few numbers bacteria survived after 120 min irradiation using NMT. Although prolonged irradiation seemed to slightly increase the bacterial killing in the case of pure TiO₂ with UV and only UV irradiation without catalyst, the killing efficiency did not match that of NMT, which is due to synergistic effect of N-doping and mesoporosity of TiO₂.

4. CONCLUSION

An efficient visible-light-driven N-doped mesoporous TiO₂ was developed successfully by simple method. The visible-light absorption was induced by the doping of nitrogen into the lattice of TiO₂. Structural characterization implied that NMT having excellent textural parameters such as ordered mesoporosity, small particle size, and large surface area. XPS analysis confirmed the presence of N 1s in addition to Ti 2p, and O 1s of NMT photocatalysts. The results of degradation of Rhodamine-B and anti-bacterial activity towards *E. coli* demonstrated that

N-doped mesoporous TiO₂ showed high photocatalytic activity than pristine TiO₂ under visible-light illumination. The strong visible-light absorption by N-doping, and the excellent textural parameters of NMT are the reasons for the enhanced photocatalytic activity of NMT under visible-light illumination.

References and Notes

1. A. Fujishima and K. Honda, *Nature* 238, 37 (1972).
2. M. R. Hoffmann, S. T. Martin, W. Choi, and D. W. Bahnemann, *Chem. Rev.* 95, 69 (1995).
3. A. Heller, *Acc. Chem. Res.* 28, 503 (1995).
4. A. Fujishima, K. Hashimoto, and T. Watanabe, *TiO₂ Photocatalysis, Fundamentals and Applications*, BKC, Tokyo (1999).
5. W. Choi, A. Termin, and M. R. Hoffmann, *J. Phys. Chem.* 98, 13669 (1994).
6. R. Asahi, T. Morikawa, T. Ohwaki, K. Aoki, and Y. Taga, *Science* 293, 269 (2001).
7. H. Irie, Y. Watanabe, and K. Hashimoto, *J. Phys. Chem. B* 107, 5483 (2003).
8. T. Ohno, T. Mitsui, and M. Matsumura, *Chem. Lett.* 32, 364 (2003).
9. R. Nakamura, T. Tanaka, and Y. Nakato, *J. Phys. Chem. B* 108, 10617 (2004).
10. J. G. Highfield and P. Pichat, *New. J. Chem.* 13, 61 (1989).
11. K. Ariga, A. Vinu, Y. Yamauchi, Q. Ji, and J. P. Hill, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 85, 1 (2012).
12. S. A. Davis, S. L. Burkett, N. H. Mendelson, and S. Mann, *Nature* 385, 420 (1997).
13. S. Inagaki, S. Guan, T. Ohsuna, and O. Terasaki, *Nature* 416, 304 (2002).
14. *Copyright and Material Transfer Agreement*, May 2014, 05:54:25.
15. P. F. Tracy, M. Chibwe, and T. J. Pinnavaia, *Nature* 353, 321 (1994).
16. M. A. Roberts, G. Sankar, J. M. Thomas, R. H. Jones, H. Du, J. Chen, W. Pang, and R. Xu, *Nature* 381, 401 (1996).
17. A. Vinu, K. Ariga, T. Mori, D. Golberg, Y. Bando, T. Nakanishi, and S. Hishita, *Adv. Mater.* 17, 1648 (2005).
18. Q. Ji, M. Miyahara, J. P. Hill, S. Acharya, A. Vinu, S. B. Yoon, J.-S. Yu, K. Sakamoto, and K. Ariga, *J. Am. Chem. Soc.* 130, 2376 (2008).
19. K. Ariga, A. Vinu, Q. Ji, O. Ohmori, J. Hill, S. Acharya, J. Koike, and S. Shiratori, *Angew. Chem. Int. Ed.* 47, 7254 (2008).
20. K. Shiva, S. K. Das, and A. J. Bhattacharyya, *Nanosci. Nanotechnol. Lett.* 4, 720 (2012).
21. S. Sartori, K. D. Knudsen, A. Roth, M. Fichtner, and B. C. Hauback, *Nanosci. Nanotechnol. Lett.* 4, 173 (2012).
22. Y. Huang, W. Ho, S. Lee, L. Zhang, G. Li, and J. C. Yu, *Langmuir* 24, 3510 (2008).
23. T. Sreethawong, Y. Suzuki, and S. Yoshikawa, *Int. J. Hyd. Energy* 30, 1053 (2005).
24. S. Anandan, Y. Ikuma, K. Kakinuma, and K. Niwa, *Nano* 3, 367 (2008).
25. Z. W. Wu and Y. F. Lu, *J. Sol-Gel. Sci. Technol.* 53, 287 (2010).
26. G. Sivalingam, K. Nagaveni, M. S. Hedge, and G. Madras, *Appl. Catal. B Environ.* 45, 23 (2003).
27. M. Sathish, B. Viswanathan, R. P. Viswanath, and C. S. Gopinath, *Chem. Mater.* 17, 6349 (2005).
28. T. Tachikawa, Y. Takai, S. Tojo, M. Fujitsuka, H. Irie, K. Hashimoto, and T. Majima, *J. Phys. Chem. B* 110, 13158 (2006).
29. X. Chen and C. Burda, *J. Phys. Chem.* 108, 15446 (2004).

Received: 1 January 2013. Accepted: 10 February 2013.