

第27卷

ISSN 1348-5261

Vol.27

帯 広 畜 産 大 学
学 術 研 究 報 告

RESEARCH BULLETIN

OF

OBIHIRO UNIVERSITY

平成 18 年 10 月

October 2006

国立大学法人 帯 広 畜 産 大 学

NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION
OBIHIRO UNIVERSITY
OF AGRICULTURE AND VETERINARY MEDICINE
OBIHIRO, HOKKAIDO, JAPAN

目 次

自然科学分野

畜産学

フェストロリウムとペレニアルライグラスの葉身の引張りとせん断特性
 本江昭夫・デヴィ エンヒュー 1

揮発性脂肪酸により評価したダチョウ成鳥における腸管内発酵の場所と速度
 本江昭夫・石井友紀子・鈴木英隆・デヴィ エンヒュー・藤倉雄司・花田正明・
 日高 智・三好俊三 9

農学

中等農業教育分野における青年海外協力隊員の派遣実績に関する調査—平成3年度1次隊より平成13年度2次隊まで—
 門平陸代・林 義明 15

8種類の食用豆類に含まれるポリフェノールと抗酸化活性
 小嶋道之・森田武志・齋藤優介・西 繁典 23

アズキ品種のアスコルビン酸ペルオキシダーゼの比較
 小嶋道之・齋藤優介・山下慎司 29

昆虫寄生菌 *Verticillium lecanii* (*Lecanicillium* spp.) によるダイコンパーティシリウム黒点病の生物防除
 楠木 芳・川井彩子・相内大吾・小池正徳・谷 昌幸・倉持勝久 39

*Bacillus*属菌によるダイコン黒点病の生物防除と抗生物質耐性マーカーを付与した分離菌の遺伝的特徴
 川井彩子・楠木 芳・相内大吾・小池正徳・谷 昌幸・倉持勝久 49

環境科学

森林リター分解物を添加・培養した土壌における低分子脂肪族カルボン酸 (英文)
 谷 昌幸・小池正徳・倉持勝久・東 照雄 59

大規模牧場が野生動植物の保全に果たす役割についての予備調査—ケニア高原の事例から—
 平田昌弘・門平陸代・水谷文美・松本 葉・小嶋 浩・佐藤雅俊 69

人文・社会科学分野

文学

江馬修『山の民』研究序説〔三〕—改稿過程の検討(三)・初稿から学会版へ(後の上)—
 柴口順一 77

人文地理学

アフリカ大陸東部の乳加工体系
 平田昌弘・門平陸代・水谷文美・松本 葉・小嶋 浩・内田健治・元島英雅 105

平成17年度帯広畜産大学研究業績 113

平成17年度帯広畜産大学大学院畜産学研究科修士学位論文題目 130

平成17年度岐阜大学大学院連合獣医学研究科博士学位論文題目 135

平成17年度岩手大学大学院連合農学研究科博士学位論文題目 135

Tensile and shearing properties of leaves in festulolium and perennial ryegrass

Akio Hongo and Devee Enkhee

(Received: April 28, 2006)

フェストロリウムとペレニアルライグラスの葉身の引張りとせん断特性

本江昭夫・デヴィ エンヒュー

ABSTRACT

The study was carried out to determine tensile and shearing properties of leaves in cultivars (Ba11356 and Ba11358) of festulolium (*Festulolium loliaceum*), compared with those of diploid (Ba11353 and Aurora) and tetraploid (Ba10855 and Prospero) cultivars of perennial ryegrass (*Lolium perenne*). Four successive samples of grass leaves were taken from pure stands of third-year swards during July to September, 2004 in Obihiro, Japan. Tensile strength was measured using a 100 N load cell of the breaking test machine. Shear strength was measured about 5 mm apart from a broken point in the tensile test using a pair of the scissors.

Cross-sectional area, DM weight and width of leaves were significantly higher in tetraploid perennial and festulolium than in diploid perennial. Shearing strength reached a peak at the central deflection, coinciding with shearing point of main vein. In shearing fracture pattern, a multi-ridged outline of leaf cross section at the adaxial side corresponded to each small peak. Tensile strength, shearing strength and work of fracture were significantly higher in tetraploid perennial and festulolium than in diploid perennial, but tensile stress and stiffness were significantly lower in tetraploid perennial and festulolium than in diploid perennial. Narrower or thinner leaves with lower cross-sectional area tend to have higher longitudinal stiffness. Thus, the morphology and biomechanical behaviour of festulolium leaves were quite similar to those of tetraploid perennial ryegrass.

Key words: Festulolium, Grass leaves, Perennial ryegrass, Shearing, Tensile

INTRODUCTION

Festulolium (*Festulolium loliaceum*) is a hybrid between meadow fescue (*Festuca pratensis*) and Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) or perennial ryegrass (*L. perenne*). It had been bred for a genetic improvement in freezing tolerance, forage yield or persistence (Casler *et al.* 2001; Casler *et al.* 2002), or drought resistance (Lesniewska *et al.* 2001) in regions with severely cold winter. Festulolium plants are also expected to improve feeding values such as

palatability, voluntary intake and digestibility (Ghesquiere *et al.* 1996).

The diploid perennial ryegrass such as Aurora had been selected for higher concentrations of water-soluble carbohydrates, and for more small tillers than the tetraploid. Palatability was higher in Aurora than in other cultivars under rotational sheep grazing (Jones and Roberts 1991). In addition, total annual sheep production from Aurora swards

帯広畜産大学畜産環境科学専攻 (080-8555 北海道帯広市稲田町)

Course of Agro-Environmental Science, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Inada, Obihiro, Hokkaido, 080-8555 Japan.

E-mail: ahongo@obihiro.ac.jp

was higher than that from other cultivars (Munro *et al.* 1992). Thus, there are many studies on feeding values and chemical compositions of various elements in festulolium and perennial ryegrass. However, few studies were reported with respect to biomechanical properties. In the agronomical field, biomechanical properties affect selective grazing by animals, digestibility of grasses, resistance of grasses to trampling or mowing, and process of hay-making (Vincent 1982: 1983). This information may be of use to the plant breeder who can select for the important characteristics (Wright and Vincent 1996).

The objective of this research was to determine tensile and shearing properties of leaves in festulolium, compared with those of diploid and tetraploid cultivars of perennial ryegrass.

MATERIALS AND METHODS

Grass swards

The swards of the following cultivars of perennial ryegrass and festulolium from Wales, UK were established as a pure stand in June 2002 and had been managed by regular fertilization and harvest for two years: two diploid cultivars (Ba11353 and Aurora) and two tetraploid cultivars (Ba10855 and Prospero) of perennial ryegrass, and two cultivars (Ba11356 and Ba11358) of festulolium. In 2004, the swards at the flowering stage were harvested at 5 cm height on 16 June and applied by a compound fertilizer equivalent to 65-49-65 kg ha⁻¹ of N-P₂O₅-K₂O. Then, four successive samples of grass leaves were taken on 7 July, 29 July, 27 August and 22 September. The swards were harvested at 5 cm height immediately after taking samples. An additive compound fertilizer equivalent to 65-49-65 kg ha⁻¹ of N-P₂O₅-K₂O was applied after the third sampling time.

Measurements of length, width and weight of leaves

The experiments were conducted in Obihiro, Japan. During the trials, leaves of a similar size were chosen and clipped at a ligule side with scissors. Leaves were sprayed with water and stored in a polyethylene bag in a refrigerator.

Total length of a leaf was measured. The leaves were cut into 10 cm length from a ligule side with scissors and had a midpoint marked. The weight was determined using a digital balance (± 0.0001 g) after absorbing water on leaf surface with paper towel. The width at midpoint was measured with scaled magnifier (± 0.01 mm) under light pressure. Then, leaves were immersed in distilled water for at least 10 min before measurement, so that full turgor within leaves could

be achieved (Chan *et al.* 1999). Twenty leaves were tested in each cultivar.

Tensile tests

Tensile strength was measured using a 100 N loadcell of the breaking test machine (Aikoh Engineering Co.; M1334). Both ends of a leaf were seized with the original jaw clamps (Hongo *et al.* 2006). One clamp was connected with a loadcell and another clamp was moved downward at 10 mm min⁻¹ for a low rate of deformation (Vincent 1992). The initial length of a sample between two clamps in the test machine was 27 mm. Tensile strength from a loadcell and elongation length from displacement transducer (NEC Sanei; 9E08-D3) were digitally recorded in a memory card (smart media) of the memory recorder (Hioki; 8807) at a speed of 5 sec⁻¹⁰⁰⁰. A graph of applied force versus deflection was produced from the saved data. After the measurement, leaves were again immersed in distilled water.

The stiffness of leaves was estimated by the following equation:

$$E = \text{stress/strain,}$$

where stress is the force per unit area and strain is the relative extension to produce that stress. The stiffness was estimated at the first linear portion of the stress-strain curve (Vincent, 1983).

Shearing test

Shear strength was measured about 5 mm apart from a broken point in the tensile test using a pair of the scissors (Plus Co.; No.135) with sharp stainless blades. The principle structure was the same as the previous reports (Pereira *et al.* 1997: Lucas and Pereira 1990: Vincent 1992). Before a measurement, the surface of blades was rubbed with a swab including a lubricant oil to reduce friction (Vincent 1992). The travel rate of intersection points of the two blades was 20 mmmin⁻¹. In each test, two passes were made: cutting of the specimen and an empty pass (Lucas and Pereira 1991). The work of fracture done was calculated deducting the work in the empty pass from the work done in the piece (Wright and Vincent 1996).

Cross-sectional area

For a measurement of cross-sectional area, leaves were transversely sliced 3 mm in length using a razor blade. The section was vertically kept in touch with the side wall of a

Tensile and shearing properties of grass leaves

plastic block. A cross section of leaf was photographed under a stereo-microscope (Nikon; SMZ-U) and the pictures were digitally saved in a memory card (smart media). Each picture was projected onto a monitor screen at a length magnification of 50-80 times. The contour line of cross-section was delineated with a cursor on a monitor screen using the commercial software of the computer graphics (Arcsoft Japan; Photo studio). The area inside this

contour line was measured using the commercial software (Nagoya Daigaku; Lia32).

Statistical analysis

Variables of biomechanical properties were analyzed using a paired t-test and an analysis of variance (Snedecor and Cochran 1967). The regression analysis was also carried out.

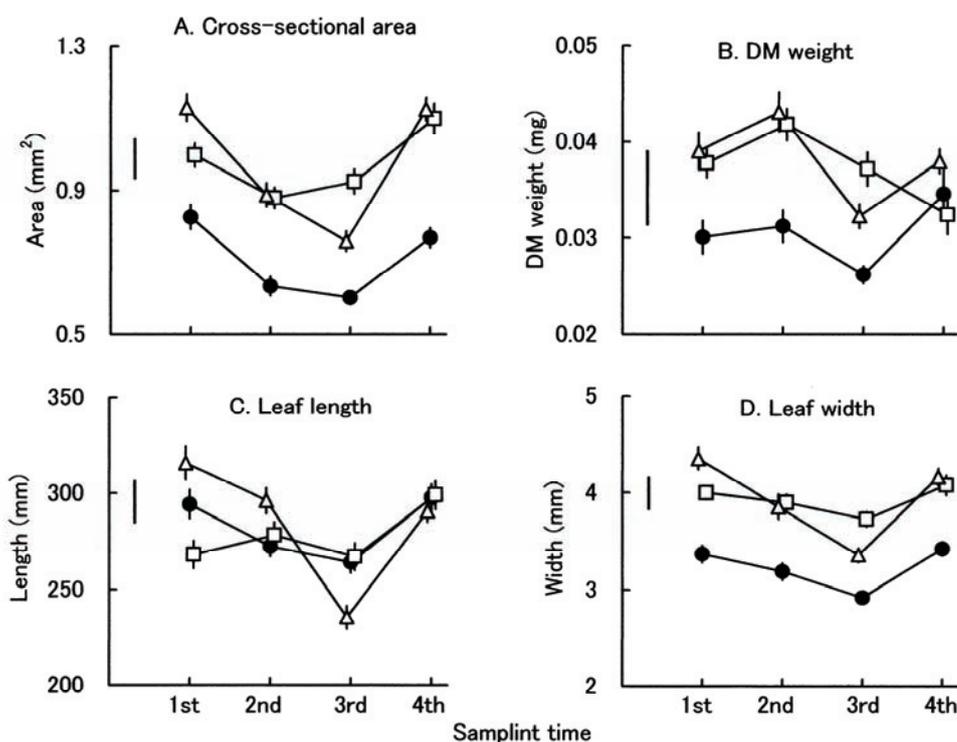


Fig. 1 Cross-sectional area, DM weight, leaf length and leaf width at four sampling times in diploid (●) and tetraploid (□) cultivars of perennial ryegrass and festulolium (△). Attached lines with symbols show s.e. of mean and vertical lines show s.e.d. of the mean differences.

RESULTS

There were no significant differences between two cultivars in each of three species with respect to morphological and biomechanical properties. Therefore, two cultivars in each of three species were included into replication.

Cross-sectional area, DM weight and length of whole leaves

Cross-sectional area was significantly higher ($p < 0.001$) in tetraploid perennial ryegrass and festulolium than in diploid perennial ryegrass at all four sampling times (Fig. 1). Mean values of four samples were $0.70 \pm 0.016 \text{ mm}^2$, $0.98 \pm 0.019 \text{ mm}^2$ and $0.97 \pm 0.021 \text{ mm}^2$ in diploid and tetraploid cultivars of perennial ryegrass and festulolium, respectively.

DM weight was significantly higher ($p < 0.020$) in

tetraploid perennial ryegrass and festulolium than in diploid perennial ryegrass from the 1st to 3rd samples, but not significantly different ($p < 0.179$) at the 4th sample.

Leaf length was not significantly different ($p < 0.438$) between three cultivars, although there were seasonal variations. Leaf width showed constant values at all four sampling times. Tetraploid perennial ryegrass and festulolium had significantly higher ($p < 0.001$) leaf width than diploid perennial ryegrass. Mean values of four samples were $3.2 \pm 0.04 \text{ mm}$, $3.9 \pm 0.04 \text{ mm}$ and $3.9 \pm 0.06 \text{ mm}$ in diploid and tetraploid cultivars of perennial ryegrass and festulolium, respectively.

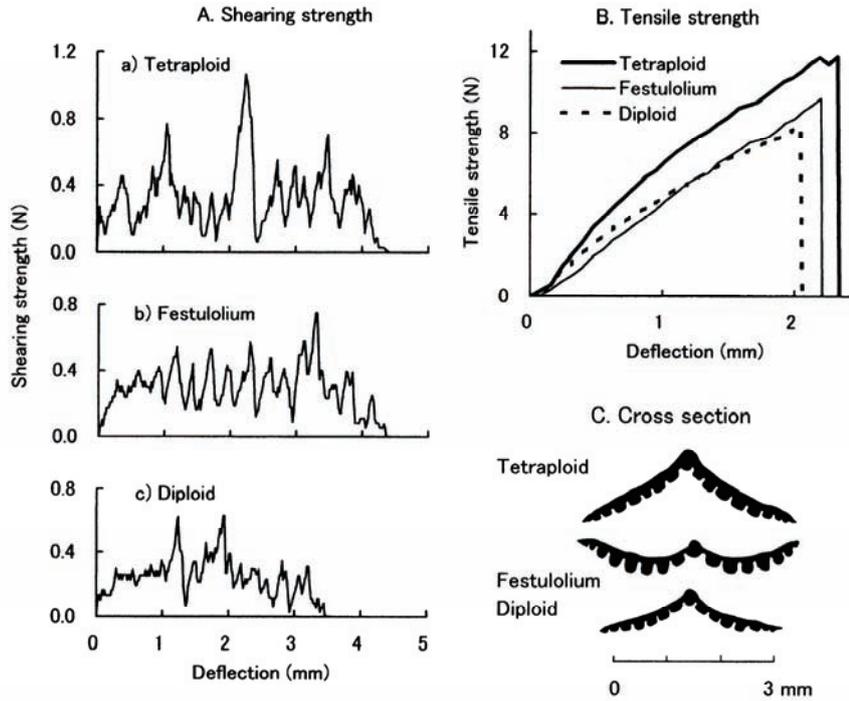


Fig. 2 Shearing and tensile fracture patterns and cross sections of diploid (Aurora) and tetraploid (Prospero) cultivars of perennial ryegrass and festulolium. Each measurement was obtained from the same leaf.

Fracture patterns

The force-deflection patterns of shearing and tensile fractures are shown in Fig. 2. Shearing strength reached a peak at the central deflection, coinciding with a shearing point of main vein. Mean values of four samples of tensile strain were 0.068 ± 0.0013 , 0.062 ± 0.0011 and 0.069 ± 0.0010 in diploid and tetraploid cultivars of perennial ryegrass and festulolium, respectively.

Tensile stiffness and shearing toughness

Maximum tensile strength was significantly higher ($p < 0.001$) in tetraploid perennial ryegrass and festulolium than in diploid perennial ryegrass, but tensile stress and stiffness were significantly lower ($p < 0.001$) in tetraploid perennial ryegrass and festulolium than in diploid perennial ryegrass (Fig. 3).

Shearing strength and work of fracture were significantly higher ($p < 0.001$) in tetraploid perennial ryegrass and festulolium than in diploid perennial ryegrass. Shearing toughness showed significant differences between three cultivars ($p < 0.001$) and between four sampling times ($p < 0.002$), but there were seasonally wide variations.

Density-specific stiffness and density-specific strength

There was the significant relationship ($p < 0.007$) between density-specific stiffness and density-specific strength in a tensile property (Fig. 4). The grand mean was 1.40 ± 0.023 MNmkg^{-1} in density-specific stiffness and 0.080 ± 0.0013 MNmkg^{-1} in density-specific strength.

Tensile and shearing properties of grass leaves

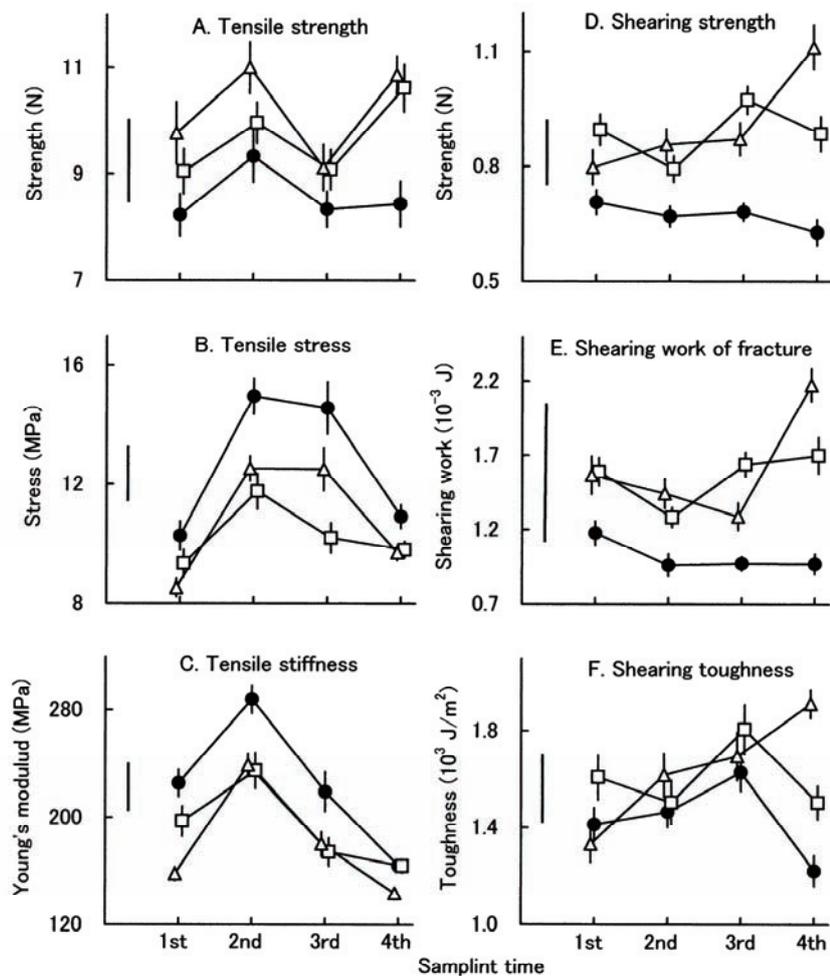


Fig. 3 Tensile and shearing properties at four sampling times in diploid (●) and tetraploid (□) cultivars of perennial ryegrass and festulolium (Δ). Attached lines with symbols show s.e. of mean and vertical lines show s.e.d. of the mean differences.

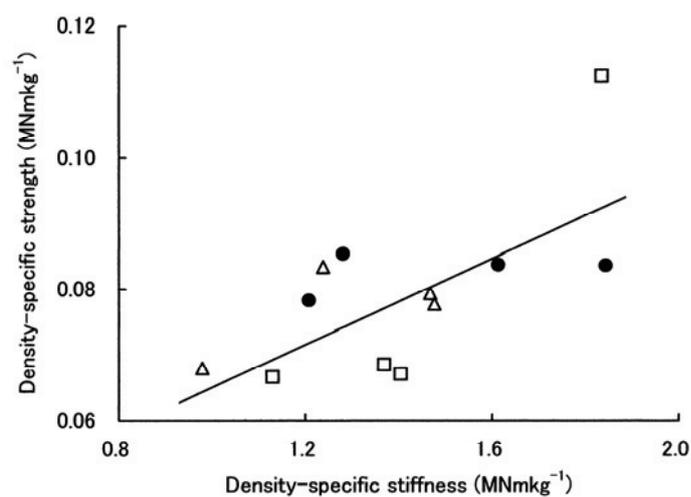


Fig. 4 Relationship between density-specific stiffness and density-specific strength at four sampling times in diploid (●) and tetraploid (□) cultivars of perennial ryegrass and festulolium (Δ).
 $Y = 0.032 X + 0.035$ ($r = 0.666$, $p < 0.007$).

DISCUSSION

Grass leaves are probably the simplest of all plants from the mechanical point of view (Vincent 1982). The leaf itself must mechanically sustain its own weight against the influence of gravity. It must also be sufficiently stiff and strong to resist bending and avoid breaking when subjected to large externally applied mechanical forces (Niklas 1993). In this study, leaves of all cultivars were vertically kept straight. The grand mean was 282 ± 2.2 mm in total leaf length and 3.7 ± 0.03 mm in leaf width. Thus, long and narrow leaves may keep straight vertically by increased bending strength, which is maintained by interior angles of leaves in a cross section. This maintenance method seems to be very effective for grass species to minimize metabolic investments in leaf-supporting structures (Chazdon 1986). The shape of cross section suggests that inherent angles as shown in transverse sections (Fig. 2), which may be maintained under high turgor (Moullia 2000), especially in the motor cells.

The major chemical constituent of plants is cellulose, a high molecular weight polysaccharide which is directly responsible for stiffness and strength (Atkins and Mai 1985). Usually, a behaviour under a tensile load depends only on material properties whereas a shearing load depends on structural properties as well (Vincent 1990). Brittle materials show more frequent and higher peaks with the downwards side of the curve (Vincent 1992). Shearing fracture pattern (Fig. 2) suggests that a multi-ridged outline of leaf cross section at the adaxial side may correspond to each small peak.

Two cultivars of festulolium used in this study were bred by back cross between tetraploid perennial ryegrass and F1 hybrid (meadow fescue x tetraploid perennial ryegrass). Therefore, the morphology and biomechanical behaviour of festulolium leaves were quite similar to those of tetraploid perennial ryegrass.

Longitudinal stiffness was significantly lower in tetraploid perennial ryegrass and festulolium than in diploid perennial ryegrass (192 ± 5.7 and 180 ± 4.5 versus 224 ± 6.4 MPa). Reversely, cross-sectional area was significantly higher in tetraploid perennial ryegrass and festulolium than in diploid perennial ryegrass (0.98 ± 0.019 and 0.97 ± 0.021 versus 0.70 ± 0.016 mm²). Thus, narrower or thinner leaves with lower cross-sectional area tend to have higher longitudinal stiffness in other grass species too. The longitudinal stiffness of grass leaf is directly and linearly proportional to the total

cross-sectional area of sclerenchyma in the leaf (Vincent 1990). Further studies are needed on this subject.

Acknowledgments

The authors are grateful to M. Nitta and T. Fukuda for invaluable assistance in conducting the experiments. This work was partly supported by a grant-in-aid for scientific research from the Ministry of Education, Science and Culture of Japan (No. 13371010).

REFERENCES

- Atkins, A.G. and Mai, Y.W. (1985) *Elastic and Plastic Fracture – Metals, Polymers, Ceramics, Composites, Biological Materials*. pp. 51-56. Chichester: Ellis Horwood Limited.
- Casler, M.D., Pitts, P.G., Rose-Fricke, C., Bilkey, P.C. and Wipff, J.K. (2001) Registration of 'Spring Green' festulolium. *Crop Science* **41**, 1365-1366.
- Casler, M.D., Peterson, P.R., Hoffman, L.D., Ehlke, N.J., Brummer, E.C., Hansen, J.L., Mlynarek, M.J., Sulc, M.R., Henning, J.C., Undersander, D.J., Pitts, P.G., Bilkey, P.C., Rose-Fricke, C.A. (2002) Natural selection for survival improves freezing tolerance, forage yield, and persistence of festulolium. *Crop Science* **42**, 1421-1426.
- Chan, T.K., Lim, S.H., Tan, H.T.W. and Lim, C.P. (1999) Variation of bending capacity along the lamina length of a grass, *Imperata cylindrica* var. major (Gramineae). *Annals of Botany* **84**, 703-708.
- Chazdon, R.L. (1986) The costs of leaf support in understory palms: economy versus safety. *The American Naturalist* **127**, 9-30.
- Davies, D.A., Fothergill, M. and Jones, D. (1991) Assessment of contrasting perennial ryegrasses, with and without white clover, under continuous sheep stocking in the uplands. 3. Herbage production, quality and intake. *Grass and Forage Science* **46**, 39-49.
- Ghesquiere, M., Emile, J.C., Jadas-Hecart, J., Mousset, C., Traineau, R. and Poisson, C. (1996) First in vivo assessment of feeding value of *Festulolium* hybrids derived from *Festuca arundinacea* var. glaucescens and selection for palatability. *Plant Breeding* **115**, 238-244.
- Jones, E.L. and Roberts, J.E. (1991) A note on the relationship between palatability and water-soluble carbohydrates content in perennial ryegrass. *Irish*

- Tensile and shearing properties of grass leaves
Journal of Agricultural Research 30, 163-167.
- Lesniewska, A., Ponitka, A., Slusarkiewicz-Jarzina, A., Zwierzykowska, E., Zwierzykowski, Z., James, A.R., Thomas, H. and Humphreys, M.W. (2001) Androgenesis from *Festuca pratensis* x *Lolium multiflorum* amphidiploid cultivars in order to select and stabilize rare gene combinations for grass breeding. *Heredity* 86, 167-176.
- Hongo, A., Toukura, Y., Choque, J.L., Aro, J.A. and Yamamoto, N. (2006) The role of a cleft upper lip of alpacas in foraging extremely short grasses evaluated by grazing impulse. *Small Ruminant Research*, In printing, Online 8 February 2006.
- Lucas, P.W. and Pereira, B. (1990) Estimation of the fracture toughness of leaves. *Functional Ecology* 4, 819-822.
- Lucas, P.W. and Pereira, B. (1991) Thickness effect in cutting systems. *Journal of Material Science Letter* 10, 235-236.
- Moulija, B. (2000) Leaves as shell structures: double curvature, auto-stresses, and minimal mechanical energy constraints on leaf rolling in grasses. *Journal of Plant Growth Regulation* 19, 19-30.
- Munro, J.M.M., Davies, D.A., Evans, W.B. and Scurlock, R.V. (1992) Animal production evaluation of herbage varieties. 1. Comparison of Aurora with Frances, Talbot and Melle perennial ryegrass when grown alone and with clover. *Grass and Forage Science* 47, 259-273.
- Niklas, K.J. (1993) Influence of tissue density-specific mechanical properties on the scaling of plant height. *Annals of Botany* 72, 173-179.
- Pereira, B.P., Lucas, P.W. and Teoh, S. (1997) Ranking the fracture toughness of thin mammalian soft tissues using the scissors cutting test. *Journal of Biomechanics* 30, 91-94.
- Smith, K.F., Simpson, R.J., Culvenor, R.A., Humphreys, M.O., Prud-Homme, M.P. and Oram, R.N. (2001) The effects of ploidy and a phenotype conferring a high water-soluble carbohydrate concentration on carbohydrate accumulation, nutritive value and morphology of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Journal of Agricultural Science* 136, 65-74.
- Snedecor, G.W. and Cochran, W.G. (1967) *Statistical Methods*. 6th edn. Ames: Iowa State University Press.
- Vincent, J.F.V. (1982) The mechanical design of grass. *Journal of Materials Science* 17, 856-860
- Vincent, J.F.V. (1983): The influence of water content on the stiffness and fracture properties of grass leaves. *Grass and Forage Science* 38, 107-114.
- Vincent, J.F.V. (1990) Fracture properties of plants. *Advances in Botanical Research* 17, 235-287.
- Vincent, J.F.V. (1992) Plants. In: Vincent, J.F.V. (ed) *Biomechanics – Materials- A Practical Approach*. pp. 165-191. Oxford: Oxford University Press.
- Wright, W. and Vincent, J.F.V. (1996) Herbivory and the mechanics of fracture in plants. *Biological Reviews of the Cambridge philosophical Society* 71, 401-413.

要 約

フェストロリウム(*Festulolium loliaceum*)の 2 品種 (Ba11356 and Ba11358)、ペレニアルライグラス (*Lolium perenne*)の 2 倍体の 2 品種(Ba11353 and Aurora)と 4 倍体の 2 品種(Ba10855 and Prospero)を用いて、葉身の引張りとせん断特性を調査した。帯広市にある造成後 3 年目の牧草地から 2004 年 7 月から 9 月までの間に 4 回の牧草サンプルを採取した。引張り強度は専用試験器にとりつけた 100 N ロードセルを用いて測定した。せん断強度は、引張り強度を測定した部位より約 5 mm 離れたところで、ハサミ型試験器で測定した。

葉身の断面積、DM 重、幅はペレニアルライグラス 4 倍体とフェストロリウムの方がペレニアルライグラス 2 倍体より有意に高かった。せん断強度は変位のほぼ中央でピークに到達したが、これは主脈のせん断に一致した。せん断による破断パターンで、葉身断面の内側にある小隆起をせん断する時に多数の小さいピークを観察した。引張り強度、せん断強度、せん断による仕事量はペレニアルライグラス 4 倍体とフェストロリウムの方がペレニアルライグラス 2 倍体より有意に高かったが、引張り応力と耐変形性は逆にペレニアルライグラス 4 倍体とフェストロリウムの方がペレニアルライグラス 2 倍体より有意に低かった。断面積の小さい細い薄葉は、縦方向の耐変形性が高くなる傾向を認めた。以上のように、フェストロリウムの形態と生体力学的特性はペレニアルライグラス 4 倍体と極めて類似していた。

キーワード: フェストロリウム、イネ科葉身、ペレニアルライグラス、せん断、引張り

Position and rate of intestinal fermentation in adult ostrich evaluated by volatile fatty acid

Akio Hongo, Yukiko Ishii, Hidetaka Suzuta, Deveen Enkhee, Yuji Toukura, Masaaki Hanada, Satoshi

Hidaka and Shunzo Miyoshi

(Received: April 28, 2006)

揮発性脂肪酸により評価したダチョウ成鳥における腸管内醗酵の場所と速度

本江昭夫・石井友紀子・鈴木英隆・デヴィ エンヒュー・藤倉雄司・花田正明・日高智・三好俊三

ABSTRACT

The study was conducted in Obihiro, Japan to examine the position and rate of intestinal fermentation in three adult ostriches (*Struthio camelus*) with mean liveweight of 103±4.7 kg. The ostriches were fed fresh leaves of orchardgrass (*Dactylis glomerata*). At twenty five hours before the slaughter, they ingested 100 g fresh leaves mixed with 20 g oblong strips (2mm wide and 30 mm long) of a filter paper, in which chromium oxide was absorbed at a rate of 40 %. After the slaughter, small intestine, cecum and large intestine were cut into 3, 2 and 7 pieces, respectively, with the same length in each organ.

Crude ash content in digesta samples was the highest in muscular stomach (90.1±1.17 %), compared with 27-51 % in other organs of glandular stomach, small intestine and cecum. The percentages of both dry matter and organic matter were significantly higher in colon. The peak of chromium content was observed at the final position of large intestine, suggesting passage rate of grass leaves through all digestive organs being about 24 hours. A small peak of total content of volatile fatty acids was observed at middle part of small intestine, suggesting the commencement of volatile fatty acid forming in small intestine. The peaks of both total content of volatile fatty acids and acetic acid content were observed in colon, being 24.5±7.25 % and 15.5±5.75 %, respectively. Acetic acid content rapidly decreased at the following sites of large intestine, suggesting active absorption of acetic acid in colon.

Key words: Adult ostrich, Chromium, Colon, Fermentation, Volatile fatty acid,

INTRODUCTION

The ostrich is an important animal in many livestock industries, especially in developing countries, because of meat and skin productions (Cooper *et al.* 2004). The ostrich has a large potential to utilize the more fibrous energy sources such as various kinds of low-quality straws or silage

(Cilliers *et al.* 1997; Glatz *et al.* 2003). The ostrich is polygastric herbivores and relies on its hindgut as the primary site of fermentation and water absorption, especially bacteria inhabit (Salih *et al.* 1998; Swart *et al.* 1993). There are many studies on a close coupling between production and absorption of volatile fatty acid (VFA) in the hindgut (Musara *et al.* 2002; 2003). It is estimated that VFA

帯広畜産大学畜産環境科学専攻 (080-8555 北海道帯広市稲田町)

Course of Agro-Environmental Science, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Inada, Obihiro, Hokkaido, 080-8555 Japan.

E-mail: ahongo@obihiro.ac.jp

production in the hindgut provides more than 57 % of maintenance requirements (Fievez *et al.* 2001).

Factors influencing the successful growth of ostriches include the provision of proper housing, adequate ventilation, exemplary hygiene and correct dietary requirements (Cooper 2000). Feed comprises over 60% of the cost of growing ostriches to slaughter weight (Glatz *et al.* 2003). To produce quality products, it is essential to collect information on feed utilization efficiency and nutrient requirements of ostriches at different maturity stages (Miao *et al.* 2003).

This study was conducted to examine the position and rate of intestinal fermentation in adult ostrich in order to improve the utilization of plant resources.

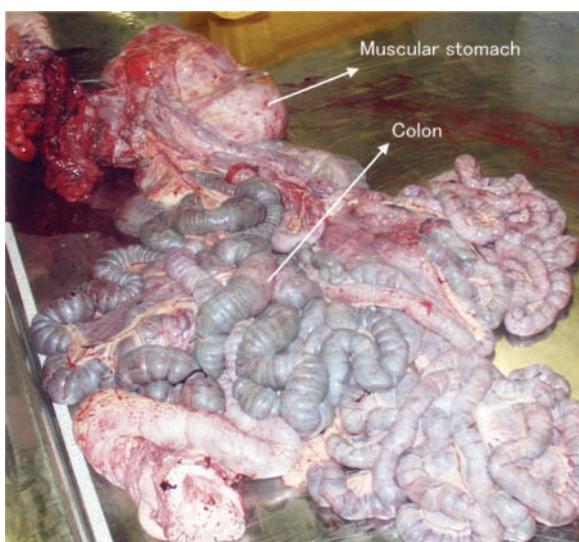


Fig. 1 Photograph of digestive organ of ostrich.



Fig. 2 Digested process of ingested grass leaves along digestive organs of ostrich.
1: Grass leaves, 2: In glandular stomach, 3-4: In muscular stomach and
5: In small intestine.

MATERIALS AND METHODS

The experiment was conducted in Obihiro, Japan.

Ostriches

Every ostrich (*Struthio camelus*) was born on 9 July 2003. They were fed chopped dry diet mostly composed of grass leaves.

Intake of chromium oxide

For previous three days, ostriches had been fed fresh leaves (6 kg/day) of orchardgrass (*Dactylis glomerata*) chopped 5 cm length. At nine of the clock on the day before the slaughter, they were fed 100 g fresh leaves and 20 g oblong strips (2mm wide and 30 mm long) of a filter paper, in which chromium oxide was absorbed at a rate of 40 % solution. Every diet offered was eaten by ostriches for two hours. Then, 3 kg fresh leaves were given, and another 3 kg in the evening.

Body measurement

Before the slaughter, body measurement was carried out by ordinary methods with respect to body weight, body height, body length, chest width and chest girth.

Collecting digesta samples

At 10-11 of the clock on September 28, three ostriches were sacrificed to collect digesta samples within digestive tract (Fig. 1). At first, the weight and length of digestive organs were measured. Small intestine, cecum and large intestine were cut into 3, 2 and 7 pieces, respectively, with the same length in each organ. Each piece was weighed. Then, digesta samples included in each of pieces or digestive organs were collected and weighed (Fig. 2). All digesta samples were kept in plastic bags and stored in a freezer.

Measurement of water and ash contents

Defrost samples of 3-20g were taken into the crucibles and dried at 60°C for 48 hours. The moisture content was obtained after 2 hours drought at 135°C. Then, crude ash content was obtained after 2 hours heat treatment at 600°C.

Intestinal fermentation in adult ostrich

Measurement of chromium

Chromium contents in digesta samples were determined by colorimetric method. Samples were added to alkaline reagent including tri-potassium and potassium hydroxide and were baked 800°C for 30 minutes. Then, the ash was diluted with distilled water and chromium content in the solution was measured its absorbance at 360 nm using spectrophotometer (U-2001, Hitachi, Japan).

acids were analyzed by gas chromatograph (GC-2010, Shimadzu, Japan) equipped with a flame-ionization detector and a capillary column (ULBON HR-52, 0.53mm i.d. × 30m × 3.0µm), using 2-ethyl-n-butyric acid as the internal standard.

Statistical analysis

Variables of observed properties were analyzed using a

Table 1 Body measurement, and weight and length of digestive organs.

A. Body measurement		B. Fresh weight of digestive organs (kg)	
Body weight (kg)	103±4.7	Glandular stomach	2.9±0.34
Body height (cm)	137±0.8	Muscular stomach	4.3±0.27
Chest width (cm)	52±0.3	Small intestine	2.3±0.27
Body length (cm)	85±1.0	Cecum	1.2±0.14
Chest girth (cm)	121±2.8	Large intestine	10.2±0.77
		Sum	20.9±1.55
C. Total weight of digesta samples within all digestive tracts (kg)		D. Total length of intestine (m)	
Fresh matter	13.0±0.81	Small intestine	5.7±0.14
Dry matter	6.8±0.80	Cecum	1.6±0.06
Organic matter	3.2±0.81	Large intestine	13.5±0.22
		Sum	20.8±0.30

* Figures show mean±s.e.

Measurement of volatile fatty acid

Aqueous extracts of digesta samples were used for measuring volatile fatty acid concentration. Volatile fatty

paired t-test and an analysis of variance (Snedecor and Cochran 1967). Three ostriches were included into the replication.

RESULTS AND DISCUSSION

For 25 hours before the slaughter, ostriches had ingested 3.1±0.37 kg fresh grass leaves (0.93±0.111 kg dry matter). The body measurements, and weight and length of digestive organs are shown in Table 1.

Crude ash content

Crude ash content in digesta sample was the highest in muscular stomach (90.1±1.17 %), compared with 27-51 % in other organs of glandular stomach, small intestine and cecum, although significantly not different ($p<0.076$), as shown in Fig. 3. Along large intestine, crude ash content gradually increased and attained the higher value (73.7±2.69 %) at the final position of large intestine. This increasing pattern of crude ash content along large intestine may be due to nutrient absorption.

Distribution pattern of dry matter and organic matter

Total amounts of dry matter and organic matter within all digestive organs were 6.8±0.80 kg and 3.2±0.81 kg, respectively. Distribution pattern of dry matter and organic matter in digesta sample is shown in Fig. 4. The percentages

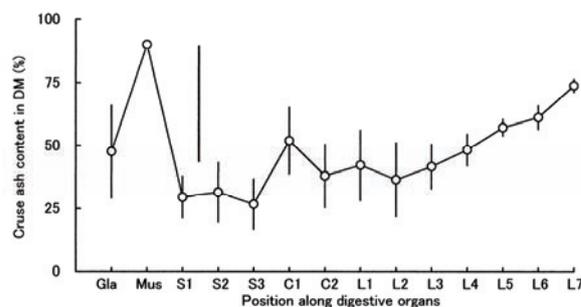


Fig. 3 Crude ash content of digesta samples in dry matter along digestive organs of ostrich. Attached lines with symbols show s.e. of mean and vertical lines show s.e.d. of the mean differences. Gla: Glandular stomach, Mus: Muscular stomach, S1-S3: Small intestine from the first third to the last third, C1-C2: Cecum from the first half to the latter half, and L1-L7: Large intestine from the first seventh to the last seventh.

of both dry matter and organic matter were significantly higher ($p<0.001$) in colon (L2 in Fig. 4), being 18.2±0.21 % and 23.9±1.10 %, respectively. These higher values may be caused by the enlargement of colon, providing a suitable nutritional environment for fermentative microflora (Swart *et al.* 1993).

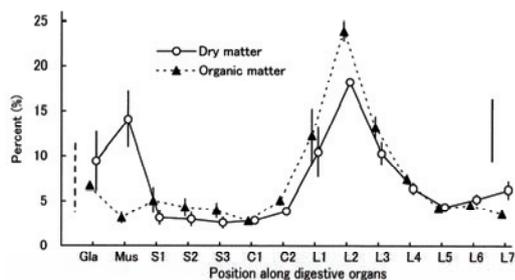


Fig. 4 Distribution patterns of dry matter and organic matter contents in digesta samples along digestive organs of ostrich. The terminology is the same as Fig. 3.

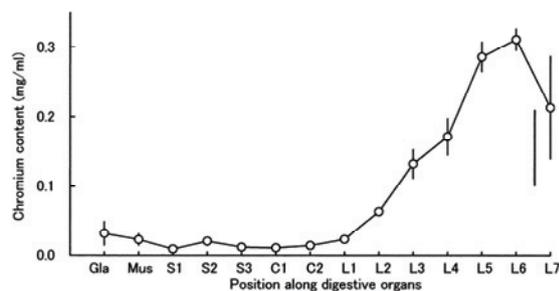


Fig. 5 Chromium content in digesta samples along digestive organs of ostrich. The result was obtained 25 hours after ingestion. The terminology is the same as Fig. 3.

Chromium content

Digesta samples were obtained after 25 hours of chromium oxide ingestion. The peak was observed at the final position of large intestine (Fig. 5), suggesting passage rate of grass leaves through digestive organs being about 24 hours.

Swart *et al.* (1993) reported that passage rate varied considerably (21 - 76 hours) with overall mean of 40.1 hours and was independent of liveweight. This longer term was obtained using young ostriches with liveweight of 5 - 46 kg. In this study, adult ostriches had 103 ± 4.7 kg liveweight. Therefore, it seems that passage rate may be highly influenced by liveweight.

Volatile fatty acid content

Total content of volatile fatty acids and acetic acid content are shown in Fig. 6. With respect to total content of volatile fatty acids, a small peak was observed at middle part of small intestine (S2 in Fig. 6), suggesting the commencement of volatile fatty acid forming in small intestine. The peaks of both total content of volatile fatty acids and acetic acid content were observed in colon (L1 in Fig. 6), being 24.5 ± 7.25 mmol/100 ml and 15.5 ± 5.75 mmol/100 ml, respectively. Rapid decrease of acetic acid content was observed at the following sites of large intestine (3.8 ± 2.83 mmol/100 ml at L2), showing active absorption of acetic acid in colon.

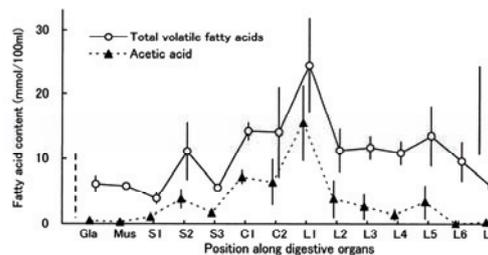


Fig. 6 Acetic acid and total volatile fatty acid contents in digesta samples along digestive organs of ostrich. The terminology is the same as Fig. 3.

REFERENCES

- Cilliers, S.C., Hayes, J.P., Chwalibog, A., Preez, J.J. and Sales, J. (1997) A comparative study between mature ostriches (*Struthio camelus*) and adult cockerels with respect to true and apparent metabolisable energy values for maize, barley, oats and triticales. *British Poultry Science* **38**, 96-100.
- Cooper, R.G. (2000) Management of ostrich (*Struthio camelus*) chicks. *World's Poultry Science Journal* **56**, 33-44.
- Cooper, R.G., Horbanczuk, J.O. and Fujihara, N. (2004) Nutrition and feed management of the ostrich (*Struthio camelus* var. *domesticus*). *Animal Science Journal* **75**, 175-181.
- Fievez, V., Mbanzamihigo, L., Piattoni, F. and Demeyer, D. (2001) Evidence for reductive acetogenesis and its nutritional significance in ostrich hindgut as estimated from in vitro incubations. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* **85**, 271-280.
- Glatz, P.C., Ru, Y.J., Hastings, M.Y., Black, D. and Rayner, B. (2003) On farm assessment of high fibre dietary sources for grower and finisher ostriches. *International Journal of Poultry Science* **2**, 293-299.
- Miao, Z.H., Glatz, P.C. and Ru, Y.J. (2003) The nutrition requirements and foraging behaviour of ostriches. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences* **16**, 773-788.
- Musara, C., Chamunorwa, J., Holtug, K. and Skadhauge, E. (2002) Water absorption in relation to fermentation in the colon of the ostrich (*Struthio camelus*). *Onderstepoort Journal of Veterinary Research, South Africa* **69**, 315-320.
- Musara, C., Chamunorwa, J., Holtug, K. and Skadhauge, E. (2003) Insight into the mechanism of short chain fatty acid absorption in the ostrich (*Struthio camelus*) proximal colon. *British Poultry Science* **44**, 316-326.

Intestinal fermentation in adult ostrich

- Salih, M.E., Brand, T.S., Schalkwyk, S.J., Blood, J.R., Pfister, B. and Akbay, R. (1998) Number of cellulolytic bacteria in the gastro-intestinal tracts of ostriches fed diets with different fibre levels. *Proceedings of the Second International Scientific Ratite Congress, Oudtshoorn, South Africa* pp. 43-45
- Snedecor, G.W. and Cochran, W.G. (1967) *Statistical Methods*. 6th edn. Ames: Iowa State University Press.
- Swart, D, Siebrits, F.K. and Hayes, J.P. (1993): Utilization of metabolizable energy by ostrich (*Struthio camelus*) chicks at two different concentrations of dietary energy and crude fibre originating from lucerne. *South African Journal of Animal Science* **23**, 136-141

おり、酢酸は結腸において活発に吸収されていることが示唆された。

キーワード： ダチョウ成鳥、クロム、結腸、醗酵、揮発性脂肪酸

要 約

植物資源の利用を改善するために、平均生体重が103 ± 4.7kgの3羽のダチョウ成鳥(*Struthio camelus*)における腸管内醗酵の場所と速度を調査した。ダチョウにオーチャードグラス(*Dactylis glomerata*)の葉身を給与し、屠殺の25時間前に100gの葉身と20gの長方形の口紙(幅2mm、長さ30mm)を採食させた。口紙には40%の酸化クロム水溶液を吸着させておいた。屠殺後、小腸、盲腸、大腸を同じ長さになるようにそれぞれ3、2、7個に分割した。

消化管内容物中の粗灰分の割合は筋胃で最も高く(90.1 ± 1.17%)、腺胃、小腸、盲腸では27-51%であった。乾物と有機物の割合は盲腸で最も高かった。クロム濃度のピークは大腸の最後の部分で認められ、ダチョウ成鳥のすべての消化管を通過する時間は約24時間と推察された。揮発性脂肪酸の総量の小さなピークが小腸の中間部で認められ、ここですでに醗酵が開始されていることを示唆していた。揮発性脂肪酸の総量と酢酸濃度の両方のピークが結腸で認められ、平均値はそれぞれ24.5 ± 7.25 mmol/100ml と 15.5 ± 5.75 mmol/100ml であった。酢酸濃度は大腸を下行するにつれて急速に低下して

中等農業教育分野における青年海外協力隊員の派遣実績に関する調査

—平成3年度1次隊より平成13年度2次隊まで—

門平睦代、林義明

(受理：2006年4月26日)

Survey on the dispatch of Japan Overseas Cooperation Volunteers
in the field of secondary agricultural education
- From 1991 to 2001 -

Mutsuyo Kadohira and Yoshiaki Hayashi

摘 要

中等農業教育を、初等教育と高等教育の中間に位置する農業教育と定義し、同教育分野における青年海外協力隊員の派遣実績を平成3年度1次隊から平成13年2次隊にわたり調査した。中等農業教育に携わる可能性のある派遣を検索した結果204件が選択され、中・高校生と短期大学生を対象とする派遣が80.4%を占めた。調査期間中では中南米へ49.5%、アフリカへ17.2%、大洋州へ16.2%、アジアへ15.7%の隊員が派遣された。職種別では全地域において野菜隊員が最多で、家畜飼育隊員が続いた。家畜飼育隊員の派遣数は、派遣総数では野菜隊員の3分の1程度である一方で、中等農業教育分野においては野菜隊員の派遣数の約半数に及び、家畜飼育隊員が中等農業教育に携わる割合が比較的大きかった。調査結果に基づき、国際協力における中等農業教育分野の役割などについて考察した。

キーワード：国際協力、青年海外協力隊、中等農業教育、派遣実績、人づくり

1. はじめに

中等農業教育は、一般的に小学校等の初等教育と大学等の高等教育の中間に位置する公的・非公的な両面での農業分野における職業教育として位置づけられている。田島(1989)は農業教育をその目的別に、1) 研究者や行政官の養成は主に高等教育、2) 現地での指導者や技術者の養成は中等教育、3) 小農民とその家族に対する職業訓練や短期の実務研修は初等教育と区分している。ま

た、FAO 専門家協議会によると、中等の技術・職業訓練教育は、1) 農村地域の問題解決を目指し、2) 地方部の隠れた人材を教育の場に引き出し、3) 慣習的な教育方法よりも型にはまらない非公的な教育方法を生かすもの、として中等農業教育の重要性を指摘している(田島、2001)。

1999年から2001年に名古屋大学農学国際教育協力研究センターが取り組んだパラグアイ共和国における中

帯広畜産大学

(Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine)

等農業教育研究は、国際協力事業団（当時）（現在、国際協力機構、JICA）によるパラグアイ国の中等農業教育のカリキュラム見直しに関する調査の要請が発端となった。パラグアイでは、国内農業の様々な問題解決のためには、中等教育の充実が高等教育よりも重要であるとの政策を打ち出しており、中学校、高等学校、職業訓練学校（小学校卒業後1年半から3年間の課程）等での農業教育が実施されている（泉ら、2002）。また、この研究活動を通して、パラグアイには多くの青年海外協力隊員が中等農業教育分野に派遣されていることが確認された。

中等農業教育は、貧困緩和につながる地域開発や農業・農村開発、現場での人づくりに貢献するために重要であると認識されている。しかし、農業分野におけるJICAの実績を振り返ると、農業系の大学では高等教育者、農業研究機関では研究者、農業現場では農業・農村開発や普及事業を通じた政府技術者の育成への支援が多く、地域の技術指導者や農民技術者の養成に関する報告は少ない（国際協力事業団、1993；1994a；1995；1996；1997；1998；1999）。また、青年海外協力隊員の派遣数を調査するにあたって、特定の職種であれば、その派遣実績や業務内容を容易に把握できる一方で、中等農業教育としての職種は存在せず、どの地域へ、何名の隊員が、どのような形態で派遣されているのか等の実態が明らかになっていない。そこで本稿では、中等農業教育分野における青年海外協力隊員の派遣実績を調査し、開発途上諸国での中等農業教育分野への国際協力の傾向を明らかにすると共に、今後の農業分野での国際協力における指針を一考した。

2. 調査の目的と方法

2-1. 目的

中等農業教育を、初等教育と高等教育の中間に位置する公的・非公的な両面での農業教育と定義し、この分野における青年海外協力隊員の派遣実績を、地域、国、派遣年度、職種別に調査し、開発途上国での中等農業教育に関する国際協力について考察した。

2-2. 方法

青年海外協力隊事務局において調査の趣旨を説明し、協力への合意を得た。当事務局では青年海外協力隊員の国、派遣年度、職種、隊員の活動内容を記録させた協力隊員データベースを作成しており、中等農業教育に携わる可能性のある職業部門に限定し、下記の職種から最初の選択を行った。

○農業水産部門：すべての職種

○保健衛生部門：公衆衛生、食肉検査、水質検査、食品衛生

○教育文化部門：市場調査、生態学、地質学、自然エネルギー利用、植物学、昆虫学、環境教育、家政、料理、理数科教師、技術科教師

○土木建築部門：土木施工、造園

これらの職種から3278件が検索された後、業務内容より中等農業教育に携わると考えられる派遣を204件選択した（表1）。いくつかの例外^{注1)}を除くと、大部分は中・高校や短期大学で農業分野の授業や実習を担当する隊員の派遣であった。最終の確認作業として、この204件中81件の報告書の内容を確認した^{注2)}。

Dispatch of Jocvs in secondary agricultural education

表1. 中等農業教育分野における青年海外協力隊員の派遣数（平成3年度1次隊より平成13年度2次隊まで）

職種	地域					計	
	アジア	大洋州	アフリカ	中南米	東欧		
作物	食用作物	1	1	3	4	0	9
	稲作	1	0	0	2	0	3
	園芸作物	1	0	1	2	0	4
	花き	1	0	0	4	1	6
	野菜	5	23	4	29	1	62
	果樹	1	0	0	4	0	5
	小計(%)	10	24	8	45	2	89(43.6)
畜産	家畜飼育	5	3	10	12	0	30
	養鶏	0	0	1	0	0	1
	養蜂	0	0	0	1	0	1
	獣医師	8	0	1	2	0	11
	小計(%)	13	3	12	15	0	43(21.1)
食品加工	食品加工	3	0	2	1	0	6
	農産物加工	0	0	1	6	0	7
	乳製品加工	0	0	0	2	0	2
	水産物加工	0	0	1	1	0	2
	小計(%)	3	0	4	10	0	17(8.3)
農業機械 ・土木	農業土木	0	0	1	3	0	4
	農業機械	1	0	4	2	0	7
	小計(%)	1	0	5	5	0	11(5.4)
森林	森林経営	1	0	0	0	0	1
	植林	0	0	0	3	1	4
	小計(%)	1	0	0	3	1	5(2.5)
水産	漁業生産	0	2	3	0	0	5
	養殖	1	1	1	0	0	3
	小計(%)	1	3	4	0	0	8(3.9)
その他	組織培養	0	0	0	4	0	4
	病虫害	0	0	0	2	0	2
	土壌肥料	3	0	0	7	0	10
	村落開発普及員	0	3	2	4	0	9
	家政	0	0	0	6	0	6
	小計(%)	3	3	2	23	0	31(15.2)
合計 (%)	32 (15.7)	33 (16.2)	35 (17.2)	101 (49.5)	3 (1.5)	204	

3. 結果と考察

選択された派遣に携わる隊員の大部分が地方都市に居住し、授業と実習、それに伴う農場・教材管理が主な活動内容で、対象は中・高校生と短期大学生が全体の80.4% (204件中164件) を占めたが (図1)、隊員に求められる資質についての統一された報告は確認されなかった。報告書には十分な情報が報告されていると予想

されたが、記述内容は統一されておらず、記入すべき報告項目も平成3年度から平成13年度の間に変更されたため、必要とする情報が入手できない場合も多くあった。詳細を調査するためには、活動を終了、または活動中の隊員へ直接、聞き取り調査等を行うことが必要であると考えられた。

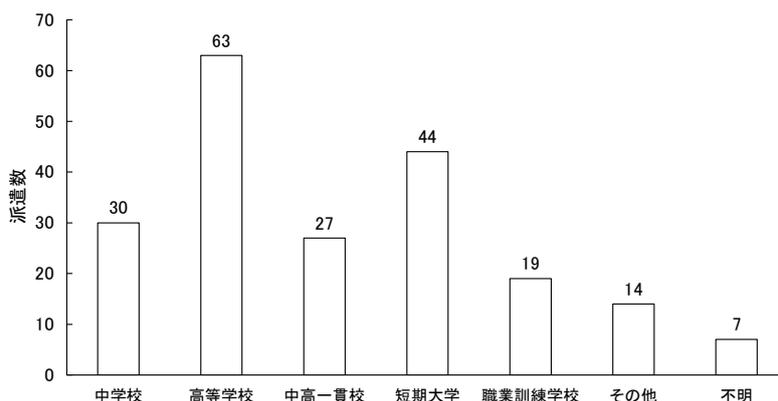


図1. 中等農業教育分野における教育対象別での青年海外協力隊員の派遣数 (平成3年度1次隊から平成13年度2次隊まで)

地域、国別の隊員の派遣数は、平成3年度以降の派遣では中南米が中等農業教育分野において49.5%を占め、次にアフリカ、大洋州、アジアへの派遣数が多く、これらの3地域へは、ほぼ同数の隊員が派遣されていた (各々17.2%、16.2%、15.7%) (表1)。中南米では中等農業教育分野の隊員の派遣数が各国で多いことに加え、派遣された国の数が多いことも同地域での派遣割合が大きい要因であった。国別ではパラグアイ (25件)、エルサルバドル (16件)、グアテマラ (15件) への派遣数が上位を占めた。次に大洋州のパプア・ニューギニア (12件)、アジアのラオス (10件) の派遣数が多かった。東欧への隊員派遣は開始されたばかりであり、3件と最少であった。

田島 (1997) によると東・東南アジア諸国の一部では中・高校等の中等教育機関において「勤労体験学習」や「職業前教育」が1960年代から実施されており、1980年代には農業高校等の中等農業教育機関の増加だけでなく、教育の質の向上を目指す動きが見られた。そのため、現在では関係機関の数と質を自主的に改善する能力

を持つ国も存在する。一方で、未だ農業技術における海外からの協力を必要とする国が存在するのも事実である。また、バングラデシュやパキスタンなどの南アジア諸国では農業高校等、農業における中等の専門教育機関が存在しないため、一般高校の理科学科の職業化によって中等レベルの技術者や指導者を養成している。したがって、アジアにおける中等農業教育は、国ごとの格差が大きいことが特徴であり、一部の国では既に十分な数の指導者が存在するために、海外協力を依存する傾向が低い可能性もある。アフリカのサブサハラ地域では初等学校における農業教育が盛んで、教育科目として指導する学校も存在する。これは基礎の農業知識と技術を習得し、科学や環境について、より実践的に効率良く学ぶことができると考えられるためである。また将来、家庭での主たる食糧生産者になりえる女子学生に利益があると共に、学校で実際に農業生産を行い、それを消費することで、学生に栄養的な支援が可能となる (Husen and Postlethwaite, 1994)。そのため、同地域では中等教育機関よりもむしろ初等教育機関での農業教育が多く実

Dispatch of Jovcs in secondary agricultural education

施されており、中等農業教育への国際協力の要請が少ないのではないだろうか。また豊田（1998）は、中南米やアジアでは農業を含む中等職業訓練システムが古くから存在する一方で、アフリカにおいては未発達であると報告している。さらに、アフリカにおける初等教育純就学率は1999/2000年に平均で60%にも満たない状況で、就学率での課題も存在する（UNESCO、2002）。南米のパラグアイでは中等農業教育機関が多く存在するが、カリ

キュラムが最新の内容でなく、様々な地域の状況に適応していないことが指摘されている（泉ら、2002）。普通科目のみであった中学校が、実学として農業教育を加え農村技術学校に転身する例が増えているが、大学卒業の資格を持つ教員の占める割合が少ない等、教員の資質が問題となっている。そのため国際協力機関を通しての支援を多く要請している可能性がある。

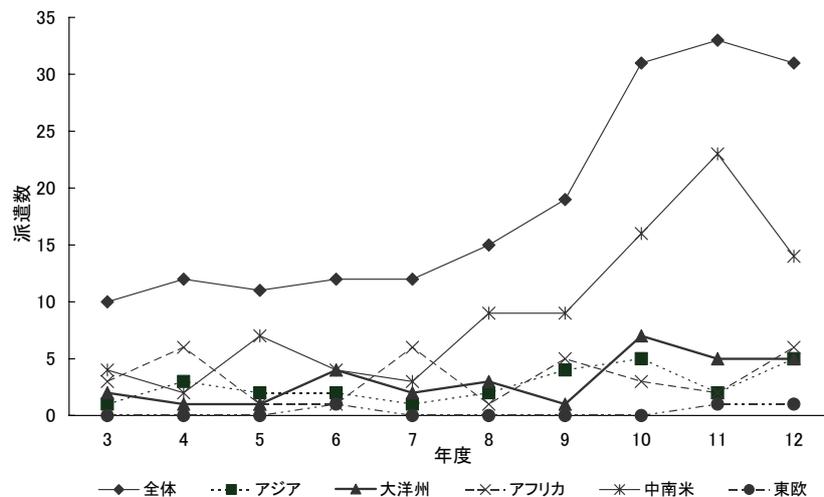


図2. 中等農業教育分野における地域・年度別での青年海外協力隊員の派遣数 (平成3年度から平成12年度まで)

派遣年度別に隊員数の推移をみると、平成8年度より増加が確認され、中南米への派遣数の変化が影響していると考えられる（図2）。中南米以外の地域では、隊員派遣数が年間10件未満で増減していた。中南米のうちパラグアイとグアテマラの派遣年度による推移は、各々平成9年度と平成10年度より派遣数が両国共に前年度の0件から4件と増加し、平成11年度には各々6名及び8名となったが、平成12年度には各々2件及び1件と減少した。これら2カ国への中等農業教育分野以外の隊員も含む派遣総数の変化を調べた結果、両国共に平成7年度から平成10年度にかけて増加し、グアテマラでは平成10年度の26件から平成11年度の68件へと増加した（外務省、2000；2001）。したがって、中南米では隊員の派遣総数の増加が、中等農業分野での派遣数増加にも影響したと考えられた。

職種別の中等農業教育分野での派遣数は、全地域にお

いて野菜隊員が最多で62件（最初に選択された3278件中442件で13.5%を占め、中等農業教育分野では204件中62件で30.4%を占めた）、次に家畜飼育隊員の30件（同様に3278件中157件で4.8%、204件中30件で14.7%）であった。家畜飼育隊員の派遣数は、派遣総数では野菜隊員の3分の1程度（35.5%）である一方で、中等農業教育分野においては野菜隊員の派遣数の約半数（48.4%）に及び、家畜飼育隊員が中等農業教育に関わる割合が比較的大きいと考えられた。中等農業教育分野において、野菜隊員をも含めた作物分野での隊員派遣数は全体の43.6%を占め、次に家畜飼育や獣医師隊員等の畜産分野が21.1%と多かった。職種分野別の分類を地域別に見ると、アジアとアフリカでは畜産分野が最多で（各々40.6%と34.3%）、作物分野が続いた（各々31.3%と22.9%）。大洋州では作物分野が大半で72.7%を占めた。中南米においては作物分野が44.6%、畜産

分野が 14.9%を占める一方で、食品加工やその他の分野での派遣が各々9.9%と 22.8%存在し、作物や畜産分野以外での中等農業教育に携わる隊員の派遣が多いことも特徴であった。作物分野での隊員派遣割合が高い要因は、同分野での現地のニーズが高いことに加えて、隊員の派遣前での技術習得が比較的早期に行えるために、日本側の人材が多いということも理由ではないかと考えられた。

中等農業教育は開発途上国における農業・農村開発に強く影響を与えることが可能で、時には参加型手法を用いることで人づくり教育にも大いに貢献できる。また、農業の生産現場や農村レベルでの知識や農業技術の能力を持つ指導者を養成することにより、持続的な農業・農村開発が実現するのかもしれない。開発途上国における生活向上・改善を目指す開発手段の取り組みとして、中等職業教育の充実が今後さらに求められるし、特に、地域開発を目的とした地方での職業訓練等に焦点を置くことが重要である。

JICA や世界銀行も基礎教育、職業技術教育、高等教育の3つの領域のバランスを考え、被援助国の教育開発全体を視野に入れ、各国の教育開発の段階に応じた援助を実施すべきと指摘しているように（国際協力事業団、1994b ; World Bank、1999）、初等教育や高等教育が注目されやすい昨今の状況ではあるが、現地での指導者や技術者の養成を目的とした中等教育機関への協力も考慮していくべきであろう。一方、協力事業を実施するうえで、援助国の経験に学ぶだけでなく、途上国側の自主性、意見を尊重し、文化に配慮し、相手国から学ぶ姿勢も重要と指摘されている（国際協力事業団、1994b ; World Bank、1999）。現在、本学にて実施されている現代的教育ニーズ取組支援プログラムや青年海外協力隊の短期派遣事業においても、大学や研究機関等の高等教育機関との協力事業のみならず、開発途上国の中・高校での農業勤労体験学習等、地域のリーダー養成事業など、新たな国際協力活動の展開も可能であろう。社会発展に寄与する基礎の知識や技術の習得だけでなく、日本の学生が開発途上国における様々なレベルでの人材育成の仕組みを理解することも国際協力教育にはなくてはならない要素である。

4. おわりに

平成3年度1次隊から平成13年度2次隊に及ぶ青年海外協力隊員の全派遣数の10%に満たないものの、中等農業教育に携わる隊員の存在が確認できた。今後の取り組みとしては、派遣中や帰国後の個々の隊員を対象に、1) 派遣前に知っておけば有効である情報、2) 現場での問題・改善点などについての調査、を実施することが望まれる。調査結果によって、派遣前の隊員を対象に、中等農業教育の意義や目的、地域での人づくりの重要性についての講義や参加型教育形式で情報を提供することは、隊員の能力向上だけでなく、活動現場での実践的効果に有効であると考えられる。

謝辞

この報告を終えるにあたり、国際協力事業団・青年海外協力隊事務局・帰国隊員支援室・筒井室長（現在、JICA二本松所長）とデータベース管理担当者の方々の協力に対して深謝いたします。また、田平由希子さん（青年海外協力隊シニア隊員、インドネシア在住）には資料収集などのお手伝いをいただいたことに感謝いたします。

注釈

注1) 「その他」の分類で含めた例としては、1) 義務教育の一部として、小・中学校の生徒を対象に野菜栽培を主とした農業の授業と実習を行う、2) 刑務所で社会復帰の近い受刑員を対象に野菜栽培技術の指導を行う、3) 身体障害者を対象に生活手段のための野菜栽培を指導する、4) 村落普及員として地域住民を対象の協力活動を行う、5) 農業担当教師の教育を実施する、等の隊員が存在した。

注2) 調査時に平成3年1次隊より平成10年3次隊までの報告書の閲覧は可能で、122件が対象となった。しかし、同じ配属先に派遣された後続隊員の報告書41件は省略したため、総数は81件であった。

引用文献

- 外務省、2000. 我が国の政府開発援助 下巻. 経済協力局. 東京. pp671.
- 外務省、2001. 我が国の政府開発援助 下巻. 経済協力局. 東京. pp699.
- Husen, T. and Postlethwaite T. N., 1994. *The International encyclopedia of education, 2nd edn.* Elsevier Science, New York. pp4681-4682.
- 泉 泰弘・横田浩臣・門平睦代・三輪千明・谷澤隆、2002. 「パラグアイ共和国における中等農業教育」、『熱帯農業』、46(2):114-120.
- 国際協力事業団、1993. 「国際協力事業団年報 資料編」、国際協力事業団、東京. pp2-523.
- 国際協力事業団、1994a. 「国際協力事業団年報 資料編」、国際協力事業団、東京. pp3-344.
- 国際協力事業団、1994b. 「開発と教育 分野別援助研究会報告書」、国際協力事業団、東京. pp29-37.
- 国際協力事業団、1995. 「国際協力事業団年報 資料編」、国際協力事業団、東京. pp3-401.
- 国際協力事業団、1996. 「国際協力事業団年報 資料編」、国際協力事業団、東京. pp3-430.
- 国際協力事業団、1997. 「国際協力事業団年報 資料編」、国際協力事業団、東京. pp3-407.
- 国際協力事業団、1998. 「国際協力事業団年報 資料編」、国際協力事業団、東京. pp10-406.
- 国際協力事業団、1999. 「国際協力事業団年報 資料編」(CD-ROM)、国際協力事業団、東京.
- 田島重雄、1989. 「世界の農業教育—中等農業教育を中心として—」、神谷慶治監修、農村更正協会編、『農業教育の課題』、pp83-113.
- 田島重雄、1997. アジア諸国農業教育の発展と協力の在り方、1997年度 海外農業教育研究開発協会 (SAEDA) シンポジウム資料、pp94-128.
- 田島重雄、2001. 「最近の欧州における農業教育事情 (1) FAO、オランダを中心に」、『農業』、平成 13 年 6 月号、pp48-65.
- 豊田俊雄、1998. 発展途上国の教育と学校、明石書店、東京、pp35-181.
- UNESCO, 2002. *EFA Global Monitoring Report: Is the World on Track?* Paris. pp97.
- World Bank, 1999. *Education Sector Strategy.* Washington, D.C. pp23-36.

Summary

The secondary agricultural education was defined as “agricultural vocational training” situated between the primary and tertiary educational level. In this paper, the dispatch outcome of Japan Overseas Cooperation Volunteers (JOCVs) in the field of the secondary agricultural education was examined from the time of the first batch in 1991 till the second batch of 2001. Two hundred and four cases were selected as ones possibly related to the secondary agricultural education. The majority (80.4%) was posted to the junior high school, high school and junior college. The half (49.5%) was dispatched to the Middle/South America, followed by Africa (17.2%), Oceania (16.2%) and Asia (15.7%). At any continent, dispatch proportions were the highest in vegetable production, followed by animal husbandry. Although a number of cases in animal husbandry

was one third of its vegetable production, proportions became almost the half in the field of secondary agricultural education. It is considered that animal husbandry could play an important role in such an education level. Based on these results, effective roles of secondary agricultural education in international cooperation were discussed.

Key words: international cooperation, Japan Overseas Cooperation Volunteers, secondary agricultural education, dispatch outcome, capacity build

8種類の食用豆類に含まれるポリフェノールと抗酸化活性

小嶋道之、森田武志、齋藤優介、西繁典

(受理：2006年4月28日)

Polyphenols and their antioxidative activities in 8 kinds of edible beans

Michiyuki Kojima, Takeshi Morita, Yusuke Saito and Shigenori Nishi

摘要

8種類の食用豆類に含まれるポリフェノールと抗酸化活性を比較した。豆類からの連続的な3段階の抽出法は、実験室で次のようにして行った。豆類に温水(50℃)を加え、5時間浸漬(抽出液1)し、その後種皮のみを採取して水を加え、1時間、加熱抽出した(抽出液2)。最後に、加熱抽出後の種皮に5%トリフルオロ酢酸含有のエタノールを加えてさらに1時間、種皮に強く結合しているポリフェノールを加熱抽出した(抽出液3)。全ての抽出液にポリフェノールを含んでいたが、含まれるポリフェノール量は、豆類種実の大小や種皮色との間で相関関係は認められなかった。アズキおよび赤インゲンマメの抽出液1には、ポリフェノールが多く溶出され、特にアズキの抗酸化活性が最も高かった。抽出液2にポリフェノールが多く溶出された豆類は、コクリョクトウ、リョクトウ、ソラマメ、赤インゲンマメであり、エンドウやダイズのそれはごく微量であった。また、抽出液3にポリフェノールを多く含んでいたのは、コクリョクトウ、リョクトウ、クロダイズ、赤インゲンマメ、ソラマメで、種皮に強く結合したポリフェノールを多く含有する豆類といえる。抽出液1に含まれるポリフェノールの熱安定性とpH安定性を検討したところ、4時間の加熱を続けても、豆類抽出液の活性低下はほとんど認められなかった。また、ダイズ、エンドウ、アズキ、コクリョクトウ抽出液1(pH6.5)の抗酸化活性は、pH2.0では同じ~若干上昇したが、pH10.0では低下した。塩基性条件でのアズキとエンドウの活性低下は、特に顕著であった。また、ダイズ、クロダイズおよびリョクトウ抽出液1のβ-カロチン退色抑制能は低かったが、赤インゲンマメ、コクリョクトウ、エンドウ、アズキのそれは高かった。

キーワード：ポリフェノール、抗酸化活性、熱安定性、pH安定性、豆類

緒言

植物の二次代謝成分であるポリフェノール類は、天然の抗酸化剤として注目されている成分の一つである。ポリフェノールには多くの種類があり、低分子化合物と高分子化合物が存在する。前者の代表である茶カテキンは

多様な用途に使われている¹⁾が、高分子化合物の代表であるタンニン渋味成分で、消化にも影響を与えるなど負のイメージがある²⁻⁵⁾。また植物側からすると、ポリフェノール類は外敵である昆虫類に対して毒性や摂食阻害を与えたり、微生物の感染を防ぐなど植物にとって

帯広畜産大学畜産科学科食料生産科学講座食品栄養科学

Laboratory of Food Nutritional Science, Department of Food Production Science, School of Agriculture, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, (Hokkaido, 080-8555,) Japan

の生体防衛的な役割をしている化合物でもある⁶⁾。食品加工物の保存には抗酸化剤が添加されるが、合成抗酸化剤は肺や肝臓などに発癌の危険性が指摘されており⁷⁾、食品の用途に適した新たな天然抗酸化剤の探索が活発に研究されている⁸⁻¹²⁾。しかし、野菜類などは、栽培適性による品種改良が進み、野生種のポリフェノール量に比べて低いものが増えてきている。また、食用の豆類には、多種多様なポリフェノール；フラボノイド（フラボン類とアントシアニン類）や縮合タンニン（プロシアニジン類等）などが多く含まれていて¹³⁻¹⁶⁾、それらは種皮に多く存在している。これらのポリフェノール類は渋味やエグ味成分であることから、調理・加工の過程で量を調節する工夫が行われてきた¹⁷⁾。最近、豆類ポリフェノールにも注目が集まっているが、浸漬水や煮汁など、同一加工条件で調製された抽出液を用いてポリフェノール含量やその特性に関する比較は行われていない。今回は、食用の8種類の豆類について、浸漬・加熱の工程で生じる各抽出液に含まれるポリフェノール含量や抗酸化活性の比較を行い、加熱やpHによる抗酸化活性への影響についても明らかにすることを目的とした。

実験方法

1. 実験材料

市販の8種の食用豆類；コクリョクトウ（毛蔓小豆, black matpe, *Vigna mungo* (L.) Hepper），エンドウ（豌豆, pea bean, *Pisum sativum* L.），アズキ（小豆, Adzuki bean, *Vigna angularis* (Willd.) Ohwi et H. Ohashi），リョクトウ（緑豆, green gram, *Vigna radiata* (L.) R. Wilez.），クロダイズ（黒大豆, black soybean, *Glycine max* (L.) Merr.），赤インゲンマメ（赤隠元豆, red kidney bean, *Phaseolus vulgaris* L.），ダイズ（大豆, soybean, *Glycine max* (L.) Merr.），ソラマメ（空豆, broad bean, *Vicia faba* L.）は、実験材料として用いた。

2. 豆類種子に含まれるポリフェノールの抽出

市販の完熟種子は、水を加えて50℃で5時間静置して得られた浸漬水（Ex-1），続いて種皮のみとした後に新しい蒸留水を加えて100℃で1時間加熱して抽出液

（Ex-2）を調製した。また、種皮に強固に結合しているポリフェノールは、5%トリフルオロ酢酸（TFA）含有エタノールを加えて100℃で1時間加熱して抽出液（Ex-3）を調製した。得られた各抽出液は、それぞれ濃縮乾固もしくは凍結乾燥後に蒸留水で10mg/ml濃度に調製して分析に用いた。また、標品の抗酸化物質も同様の濃度で使用した。

3. 抗酸化・ラジカル消去活性の測定

抗酸化・ラジカル消去活性は、1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジルのラジカル消去活性（DPPH法¹⁸⁾）とニトロブルーテトラゾリウム法（NBT法¹⁹⁾）で行った。各豆類の抽出液は、凍結乾燥して一定量（10mg/ml）に溶解して、抗酸化活性を測定した。DPPHラジカル消去活性の測定には抽出物250 μ g（25 μ l）を用い、スーパーオキシド消去活性の測定には抽出物50 μ g（5 μ l）を使用した。すなわち、DPPH法は各抽出液25 μ l（コントロールでは蒸留水を使用）に2mlの0.5mM DPPHエタノール溶液と2mlの100mMトリス塩酸バッファー（pH7.4）を加えて混和15分後に520nmの吸光度を求め、対照（抗酸化物質無添加）の吸光度を100とする割合で表示した。また、NBT法は、各抽出物50 μ lを用い、スーパーオキシド生成系を用いた時の反応阻害から抗酸化活性を求めた。生じたスーパーオキシドとNBTとの反応により生じたホルマゼン（560nm）を測定（560nm）して、抗酸化物質を加えなかったものを対照（100）として表示した。キサントキシダーゼ懸濁液は、和光純薬工業社製を使用した。 β -カロチン退色抑制能は、リノール酸/ β -カロチン系での470nmの変動値より割合で求めた²⁰⁾。全ポリフェノール量はFolin-Ciocalteu法²¹⁾により求め、検量線は（+）-カテキンを用いて作成した。

4. 豆類抽出液の熱安定性およびpH安定性の測定

熱安定性およびpH安定性は、各種子抽出液のEx-1を用いた。Ex-1の熱安定性は、密閉系チューブに移したEx-1を、105℃のオーブンで保持し、経時的に取り出した反応液の抗酸化・ラジカル消去活性より求めた。また、pH安定性は、Ex-1に1N HClを加えてpH2.0、

Polyphenols and their antioxidative activities in 8 kinds of edible beans

1 N NaOH を加えて pH10.0 に調整して、それぞれ直ちに抗酸化活性を測定して求めた。

実験結果および考察

1. 食用豆類に含まれるポリフェノール量

種子に含まれるポリフェノールを抽出する方法としては、粉碎してアルコール類で抽出する方法がよく用いられる^{15, 17, 22)}。しかし、一般に豆類は、加熱して利用される食材であることから、本実験では浸漬・吸水および加熱した時に溶出してくるポリフェノール量およびそれらの抗酸化活性について検討した。全抽出物の凍結乾燥重量は、種子重に対して 2.4~7.7% の範囲であったが、量の多少は種実の大小には関係なく、クロダイズやエンドウの抽出物が多かった（クロダイズ 7.7% およびエンドウ 6.2%）。全ポリフェノール量の多い順に、ソラマメ、アズキ、インゲンマメ、リョクトウ、コクリョクトウ、クロダイズ、エンドウおよびダイズであった。ダイズやエンドウの全ポリフェノール量は、種子に対して 0.06% と低かったが、他の豆類のそれは約 4~10 倍であった（Table 1）。各豆類抽出物に含まれるポリフェノール含量は豆類の大小や種皮色の色調、濃淡には関係がなく、豆類の種類により相違のあることから、各豆類の特徴であると判断した。

実験方法 1. に記した 3 段階の抽出法で得られた抽出物に含まれるポリフェノールは、ソラマメを除き、浸漬水；Ex-1 に最も多く含まれていた。また、加熱抽出液；Ex-2 のポリフェノール量が多かったのは、ソラマメ、コクリョクトウおよびリョクトウなどで、物理的に種皮をはがすことで種皮から多くのポリフェノールが溶出されたと判断した。Ex-1 と Ex-2 の合計は、豆から溶出可能なポリフェノールであり、煮汁全体のポリフェノール量に相当する。全ポリフェノール量が多い豆類は、順

にソラマメ、アズキ、コクリョクトウ、インゲンマメ、リョクトウで、次いでクロダイズ、エンドウおよびダイズであった。種皮残査を酸含有エタノールで加熱抽出して得られた種皮に強固に結合したポリフェノール（種皮結合型ポリフェノール）は、ダイズやエンドウで全ポリフェノールの 6~7%、アズキでは 15%、それら以外の豆では 22~28% であることが示された。

豆類から抽出したポリフェノール成分は、ダイズ類 2 種、リョクトウ類 2 種の間では類似していたが、他の豆類間では顕著に異なっていた。ダイズ類の主要なポリフェノールはゲニステイン、エンドウではケルセチン配糖体、アズキではカテキングリコシドとルチン、インゲンマメではシアニジングリコシドなどであった^{2, 12, 13)}。

2. 豆類抽出液 Ex-1 の熱安定性および pH 安定性

各豆類抽出液；Ex-1 の抗酸化活性の熱安定性について検討したところ、1 時間の加熱では調べた全ての豆類抽出液の抗酸化活性に顕著な変動は認められなかった。しかし、2~4 時間の継続した加熱により、ダイズ、リョクトウ、コクリョクトウ、エンドウ種子抽出液の抗酸化活性は、非加熱のものよりも値が若干高くなった（Table 2）。その理由として、加熱による重合体の生成が考えられるが、それらの構造解析などは今後の課題である。

各豆類抽出液；Ex-1 の pH は、全て pH6.5 前後であった。各抽出液 Ex-1 の pH を 2.0 あるいは 10.0 に調整後、抗酸化・ラジカル消去活性を測定したところ、ダイズ、コクリョクトウ、エンドウおよびアズキ種子抽出液は、pH2.0 の酸性側の方が中性域よりも若干活性が高かった（Table 3）。しかし、pH10.0 の塩基性側に調整した Ex-1 では、全ての抽出液の抗酸化活性が低下した。特にアズキやエンドウの活性低下は顕著であった

Table 1 Polyphenol contents in each extract (mg) from 100g beans.

Extracts	Black	Pea	Adzuki bean	Green gram	Black	Red kidney		Broad bean
	matpe				soy bean	bean	Soybean	
	(Black) ¹⁾	(Light yellow)	(Red)	(Green)	(Black)	(Red)	(Light yellow)	(Brown)
Ex-1	130.6±0.4	56.8±0.2	247.4±0.4	130.8±0.4	122.8±1.8	190.6±0.4	50.0±0.2	12.9±0.4
Ex-2	114.8±4.0	2.4±0.4	20.4±0.8	70.0±1.0	33.6±1.4	47.2±1.0	3.4±0.2	450.1±14.2
Ex-3	93.2±4.0	4.4±1.0	45.0±0.8	71.2±2.2	62.0±1.6	67.0±4.0	3.0±0.4	136.1±0.7
Total	338.6±2.8	63.6±0.6	313.0±0.8	272.0±1.2	218.4±1.6	305.6±1.8	56.2±0.2	599.0±5.1

¹⁾ Seed coat color is shown in the parenthesis.

Table 2 The thermal stability of Ex-1 for the heating.

Species	Heating time (min)		
	60	120	240
Black matpe	0.99±0.02	1.08±0.02	ND
Pea	0.86±0.01	1.02±0.02	2.19±0.04
Adzuki bean	0.99±0.02	0.94±0.08	0.94±0.06
Green gram	2.44±0.10	2.46±0.05	ND
Black soybean	0.98±0.01	0.95±0.03	0.95±0.02
Red kidney bean	0.97±0.02	1.32±0.03	0.87±0.04
Soybean	1.86±0.09	10.42±0.13	13.53±0.14
Broad bean	0.92±0.02	0.90±0.02	1.38±0.02

Each value is expressed as a relative activity value for DPPH radical scavenging activity at heating time 0. Values are means± standard deviation (SD), n=3. ND: not determined.

Table 3 The pH stability of Ex-1 in acidity and alkalinity.

Species	pH 2.0	pH 10.0
Black matpe	1.13±0.05	0.71±0.07
Pea	1.57±0.07	0.43±0.03
Adzuki bean	1.19±0.01	0.14±0.03
Green gram	0.94±0.05	0.59±0.07
Black soybean	0.89±0.07	0.69±0.02
Red kidney bean	0.86±0.03	0.86±0.01
Soybean	1.67±0.40	0.95±0.07
Broad bean	1.07±0.01	0.49±0.04

Each value is expressed as a relative activity value for DPPH radical scavenging activity in pH6.5. Values are means± standard deviation (SD), n=3.

(Table 3)。これらの結果は、pHの変動は活性構造に影響を与える可能性を示している。また、酸性域でのポリフェノール抽出が有効であることも示唆している。一般に色素成分は、pHにより色調変動することが知られている^{12,13)}。今回得られた抽出液のpHを酸性や塩基性に変えた時の色調は、豆の種類により顕著に異なったが、含まれるポリフェノール成分により色調変化が起きていると考えられる。今後、pHにより変化するポリフェノール・色素成分の構造変換の解析が期待される。

3. 豆類抽出液の抗酸化活性

8種類の豆から3段階の方法で得られた抽出物の抗酸化活性を比較する目的で、10mg/ml (w/v)とした水溶液の抗酸化活性を比較したところ、浸漬水；Ex-1ではアズキ抽出液の活性が最も高かった (Fig. 1)。抽出液；Ex-2では、コクリョクトウ、リョクトウ、赤インゲンマメ、ソラマメの抗酸化活性が高かったが、クロダイズやアズキのそれは約半分程度の活性、エンドウやダイズ

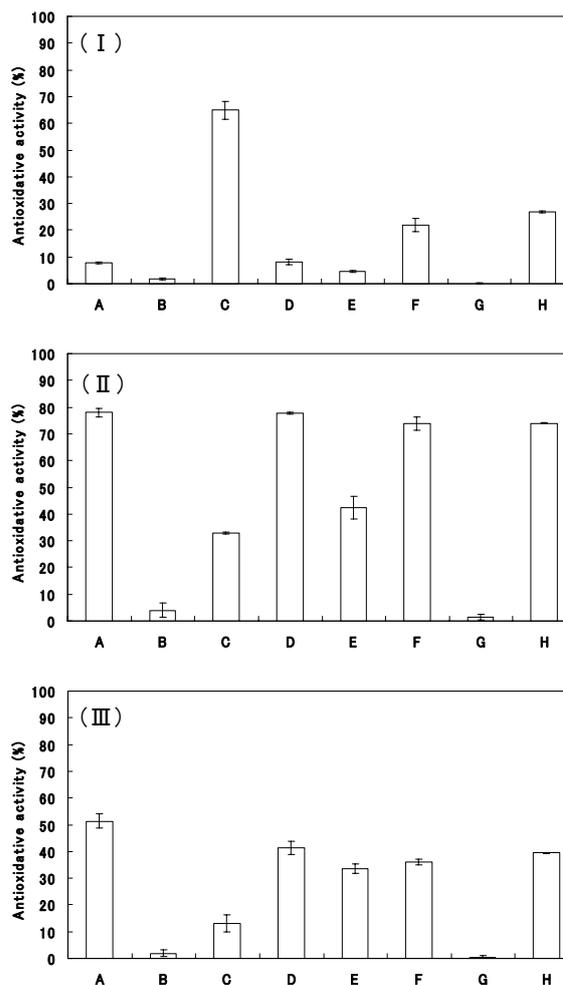


Fig. 1 The comparison of the antioxidative activity of pulse extraction liquid. 8 kinds of beans, A; Black matpe, B; Pea, C; Adzuki bean, D; Green gram, E; Black soybean, F; Red kidney bean, G; Soybean, H; Broad bean were used. By describing method, 3 kinds of extraction, (I) Ex-1 (II) Ex-2, (III) Ex-3 were prepared from each pulse.

のそれはごくわずかであった。また、Ex-2の活性が高かった豆類は、種皮に強固に結合して酸含有の熱エタノールで溶出された抽出液；Ex-3も高い抗酸化活性が認められた。また、8種類の豆類抽出液；Ex-1, Ex-2, Ex-3に含まれるポリフェノール含量とDPPHラジカル消去活性との相関係数を求めたところ、 $r^2=0.824$ を示した。また、NBT法におけるスーパーオキシド消去活性とポリフェノール含量との相関係数は、 $r^2=0.851$ を示した。すなわち、両者ともに顕著な正の相関関係が認められた。これらの結果は、ダイズやエンドウ抽出液の抗酸化活性は低いけれど、それ以外の6種の豆類抽出液には高い抗酸化活性を示す化合物が存在すること、加熱抽出だけでは種皮から溶出しない抗酸化化合物が種皮に結

Polyphenols and their antioxidative activities in 8 kinds of edible beans

合して存在することを示唆している。また、利用しやすく抗酸化活性の高いポリフェノールを多く含む豆類抽出液は、アズキ浸漬液；Ex-1 であると判断した。 β -カロチンは脂溶性ビタミンの一種類で、橙黄色の水溶液は非常に不安定で、光条件下では数時間で顕著に退色する²⁰⁾。この β -カロチン色素の退色抑制能を豆類抽出液；Ex-1 を用いて検討したところ、アズキ、キントキおよび

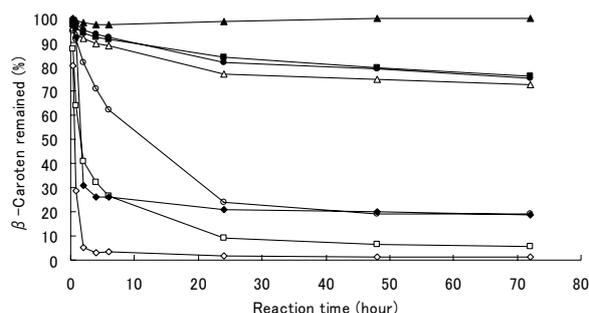


Fig.2 The discoloration inhibiting of β -caroten by addition of the Ex-1 from 7 species of bean. Distilled water(□), black matpe(●), pea bean(△), Adzuki bean(▲), green gram(○), black soybean(◆), red kidney bean(■), and soybean(◇).

びコクリョクトウ抽出液は、光条件下で24時間後の β -カロチン量は80%以上が残存している、高い β -カロチン退色抑制能が認められた (Fig. 2)。ソラマメ抽出液の効果については検討していないが、ダイズ、クロダイズおよびリョクトウ抽出液の β -カロチン退色抑制能は低かった。これらの活性成分の候補は、カテキン誘導体やケルセチン誘導体などのポリフェノールと推定しているが、活性と化合物との構造相関を明確にするためには物質の分離精製が必要であり、今後の課題である。

謝辞：この研究は日本豆類基金協会の資金援助を受け、帯広畜産大学21世紀COEプログラム研究の一環として行った。

引用文献

- 1) 村松敬一郎, 小国伊太郎, 伊勢村護, 杉山公男, 山本(前田)万里, 茶の機能-生体機能の新たな可能性-, 学会出版センター (2002) .
- 2) Nakabayashi, T., Chemistry of tannine in tropical crops., *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **35**, 790-801 (1988).
- 3) Ariga, T. and Asano, Y., Occurrence of astringent

oligomeric proanthocyanidins in legume seeds., *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 2705-2708 (1981).

4) Ariga, T. and Asano, Y., Isolation, identification and organoleptic astringency of dimeric proanthocyanidins occurring in Adzuki beans., *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 2709-2712 (1981).

5) Aw, T-L. and Swanson, B.G., Influence of tannin on *Phaseolus vulgaris* protein digestibility and quality., *J. Food Sci.*, **50**, 67-71 (1985).

6) Nomura, M. and Itioka, T., Effects of synthesized tannin on the growth and survival of a generalist herbivorous insect, the common cutworm, *Spodoptera litura* Fabricius (Lepidoptera: Noctuidae)., *Applied Entomology and Zoology*, **37**, 285-289 (2002).

7) Ito, N., Fukushima, S., Hagiwara, A., and Ogino, T., Carcinogenicity of butylated hydroxyanisole in F344 rats., *J. Natl. Cancer Inst.*, **70**, 343-352 (1983).

8) McMurrough, I., Loughrey, M.J., and Hennigan, G.P., Content of (+)-catechin and proanthocyanidins in barley and malt grain., *J. Sci Food Agric.*, **34**, 62-72 (1981).

9) Ariga, T., Koshiyama, I., and Fukushima, D., Antioxidative properties of procyanidins B-1 and B-3 from Adzuki beans in aqueous systems., *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 2717-2722 (1988).

10) Jorge, M., Silvia, R.D., Darmon, N., Fernandez, Y., Mitjavila, S., Oxygen free radical scavenger capacity in aqueous models of different procyanidins from grape seeds., *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 1549-1552 (1991).

11) Mitscher, L.A., Jung, M., Shankel, D., Dou, J.H., Steele, L., Pillai, S.P., Chemoprotection : a review of the potential therapeutic antioxidant properties of green tea (*Camellia sinensis*) and certain of its constituents., *Med. Res. Rev.*, **17**, 327-365 (1997).

12) Tsuda, T., Ohshima, K., Kawakishi, S., Osawa, T., Antioxidative pigments isolated from the seeds of *Phaseolus vulgaris* L., *J Agric Food Chem.*, **42**, 248-251 (1994).

13) Yoshida, K., Sato, Y., Okuno, R., Kameda, K., Isobe, M. and Kondo, T., Structural analysis and measurement of

anthocyanins from colored seed coats of *Vigna*, *Phaseolus*, and *Glycine legments*, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**, 589-593 (1996).

14) Kojima, M., Suzuki, N., Ohnishi, M., Ito, S., Changes in antioxidative activity and tocopherol contents during germination of Adzuki beans., *J. Jap. Society Food Science and Technology*, **44**, 144-148 (1997).

15) Martin, L.P., Hagerman, A.E. and Butler, L.G., Tannin content of cowpeas, chickpeas, pigeon peas, and mung beans., *J. Agric. Food Chem.*, **28**, 459-461 (1980).

16) Ariga, T., Hamano, M., Radical scavenging action and its model in procyanidins B-1 and B-3 from Adzuki beans to peroxy radicals., *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 2499-2504 (1990).

17) Hatai, A., Okuse, I., Saga, K., Nagaoka, Y., Comparative studies on the extraction methods of phenolic compounds by methanol and the compositional differences within the seed coat and the cotyledon in Adzuki beans., *J. Cookery Sci. Japan*, **29**, 109-114 (1996).

18) Blois, M.S., Antioxidant determinations by the use of a stable free radical., *Nature*, **181**, 1199-1200 (1958).

19) De-Rosa, G., Duncan, D.C., Keen, C.L. and Hurley, L., Evaluation of negative staining technique for determination of CN-insensitive superoxide dismutase activity., *Biochem. Biophys. Acta.*, **566**, 32-39 (1979).

20) 津志田藤二郎, 鈴木雅博, 黒木柁吉, 各種野菜類の抗酸化性の評価および数種の抗酸化成分の同定, *食科工*, **41**, 611-618 (1994).

21) Singleton, V.L., Rossi, J.A.Jr., Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic -phosphotungstic acid reagents., *Am. J. Enol. Vitic.*, **15**, 144-158 (1965).

22) 福場博保, 小豆のタンニンについて, *豆類加工技術研究会報*, **11**, 1-31 (1987).

small quantity of bean was soaked in hot water (50°C) for 5h, and the hot water fraction was collected (Extract 1). Then, the seed coats were separated, fresh water added to the seed coats, and the mixture boiled for 1h. The water fraction was collected (Extract 2). The boiled seed coats were heated for 1h with 5% trifluoroacetic acid containing ethanol in order to extract the polyphenols that were tightly bound to the seed coats (Extract 3). All extracts contained polyphenols. There was no correlation between the amount of polyphenol in a bean type and bean size or seed coat colour. Extract 1 from Adzuki and red kidney beans contained large amounts of polyphenols. In particular, Extract 1 from Adzuki beans had the highest antioxidative activity. Extract 2 from black matpe, green gram, broad bean, and red kidney bean also contained large amounts of polyphenols, whereas those from pea and soybean contained only small amounts. Large amounts of polyphenols were stripped from the seed coats (Extract 3) from black matpe, green gram, black soybean, red kidney bean, and broad bean. The activities of polyphenols in Extract 1 from all beans hardly decreased even though they had been heated for 4h. Antioxidative activities of Extract 1 from soybean, pea, black soybean, and black matpe at pH 2.0 were identical to or slightly higher than those at pH 6.5, whereas those at pH 10.0 were lower than those at pH 6.5. The activities of Extract 1 from Adzuki beans and peas decreased markedly at high alkalinity. However, β -caroten discoloration was poorly suppressed in Extract 1 from soybeans, black soybeans, and green grams, whereas discoloration suppression was high for Extract 1 from red kidney beans, black matpes, peas, and Adzuki beans.

Keyword : polyphenol, antioxidative activity, thermal stability, pH stability, pulse

ABSTRACT

The antioxidative activities of polyphenols found in 8 kinds of edible bean seeds were compared. Three extracts were successively prepared from each kind of bean as follows. A

Res. Bull. Obihiro.,27(2006):23~28

アズキ品種のアスコルビン酸ペルオキシダーゼの比較

小嶋道之、齋藤優介、山下慎司

(受理：2006年4月28日)

A comparison of ascorbate peroxidases from varieties of Adzuki bean

Michiyuki Kojima, Yusuke Saito and Shinji Yamashita

摘要

アズキ (*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi et H. Ohashi : 品種はエリモシヨウズ) に含まれるアスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX) をコードする cDNA の塩基配列を決定した。APX はアスコルビン酸を基質として細胞毒である過酸化水素を水に無毒化する酵素である。アズキ APX 遺伝子の塩基数は 1,076bp で、予想されるタンパク質のアミノ酸数は 250、分子量は約 27,000Da であった。アズキ APX のアミノ酸配列は、ササゲ、ダイズおよびエンドウのそれらと高い相同性を示し、順に 98%、95% および 92% であった。また、アズキ 5 品種の初生葉から APX をコードする cDNA を調製して、塩基配列を比較した。その結果として、(1) エリモシヨウズの APX 遺伝子 ORF から 6-10 番目の塩基配列は “TGCTA” であったが、他の 4 品種のそれは “AGTAC” であること、(2) APX 遺伝子 ORF から 61 番目の塩基はエリモシヨウズ、斑小粒系-1 およびトヨミダイナゴンでは “T” であったが、アカネダイナゴンおよびサホロシヨウズでは “C” であることを明らかにした。

キーワード：アスコルビン酸ペルオキシダーゼ，アスコルビン酸，cDNA，アズキ

緒言

アズキ (*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi et H. Ohashi) は冷害に弱く、低温障害を受けやすい植物で、種子の品質や収量は、その年の気象および生育環境に大きく左右される¹⁾。北海道におけるアズキ栽培の安定化や市場競争力強化の面から耐冷性品種の育成が強く望まれている。そのためにはアズキ低温障害の発生機構を明らかにする必要があり、育種選抜の指標が求められている。高等植物の多くは 10°C から 35°C の範囲に最適生育温度を持っている。最適生育温度の上限または下限を超える温度環境下では植物細胞の生理機能が損なわれて、著しい細胞障害を受ける²⁾。低温下では、代謝活動の低下にも関わらず太陽エネルギー流入量が同じであればエネルギー過剰となり、それが活性酸素を作り生理障害・構

造障害を引き起こす原因となる^{3, 4)}。しかし、生物は進化の過程でこれらの活性酸素に対する防御機構を獲得しており、アスコルビン酸-グルタチオンサイクル⁵⁻⁹⁾は植物における活性酸素除去機構の一つとして存在する。植物内で発生したスーパーオキシドアニオンは、スーパーオキシドディスムターゼ (SOD) により過酸化水素となり、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX) またはカタラーゼ (CAT) によって水に無毒化される。APX は基質としてアスコルビン酸が必要であり、酸化されたアスコルビン酸はグルタチオンにより、また酸化されたグルタチオンは NADPH により、それぞれ還元されて再利用される。しかし、細胞が持つ活性酸素消去能力以上の過剰な活性酸素が生じたときには、一部の細胞構成成分が酸化され、生理機能の異常が起きる¹⁰⁾。

帯広畜産大学畜産科学科食料生産科学講座食品栄養科学

Laboratory of Food Nutritional Science, Department of Food Production Science, School of Agriculture, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, (Hokkaido, 080-8555,) Japan

アズキはマメ科植物の中でも低温に弱い植物であり、圃場の観察から品種やそれらの生育段階により低温耐性能に差が認められる。例えば、「アカネダイナゴン」は出芽直後の耐冷性が強いが、「斑小粒系-1」は弱い品種であることが報告されている¹⁾。また、インキュベーターを用いた実験室レベルの実験で、アズキ初生葉に顕著な低温ストレスを与えると、葉が黄変したり枯死する「斑小粒系-1」の葉に含まれるAPX、SODおよびCAT活性は、「アカネダイナゴン」のそれらの活性よりも低いことを明らかにした¹¹⁾。また、シンビジウム、サツマイモおよびシロイヌナズナなどの葉は低温ストレスを受けると抗酸化酵素の活性が上昇することや、低温耐性のコムギCAT遺伝子をイネに導入した形質転換体は、非形質転換体イネに比べて耐冷性が増加することが報告されている¹²⁻¹⁵⁾。アズキの耐冷性と抗酸化酵素との関連性を検討する研究の一環として、今回、これまでに明らかにされていないアズキ(エリモショウズ)APX遺伝子の特徴と、圃場において出芽期の耐冷性に差が認められているアズキ5品種のAPX遺伝子5'側の塩基配列の違いを明らかにした。

実験方法

1. アズキの全RNA抽出とcDNA作製

アズキ材料としては、「エリモショウズ」、「アカネダイナゴン」、「斑小粒系-1」、「サホロショウズ」、「トヨミダイナゴン」の5品種を用いた。各種子はバーミキュライトに播種し、25°Cで出芽させた。出芽直後(出芽後1~2日)の初生葉を採取して直ちに用いた。全RNAの抽出は、Plant RNeasy Mini Kit(QIAGEN)を用いて行った。抽出した全RNAはRNase free水で30倍に希釈し、260nmおよび280nmの吸光度を測定して、 $OD_{260}/OD_{280} \geq 1.8$ であるRNA溶液の濃度を求め使用した。cDNAの作製は、3' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends (Invitrogen)を用いて行った。全RNA(1~5 μ g)に、RNase free水を加えて11 μ lとし、1 μ lの10 μ M adapter primerを加えて70°Cで15分間加熱変性させた。氷上で急冷後(1分間)、2 μ lの10 \times PCR buffer、2 μ lの25mM MgCl₂、1 μ lの10mM dNTP mix、2 μ lの0.1M DDTを添加して42°Cで5分間プレインキュベートした。1 μ lの

SuperScript II RTを加え、42°Cで50分間逆転写反応させた後、70°C(15分間)で反応停止させた。氷上で急冷し、1 μ lのRNase Hを加えて37°Cで20分間反応させcDNAを調製した。

2. アズキ APX 遺伝子断片の増幅

PCRチューブに1 μ lのcDNA溶液と、48.75 μ lのPCR溶液(最終濃度は10mM Tris-HCl(pH8.0), 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.2mM dNTP mix, 0.5 μ Mセンスプライマー, 0.5 μ Mアンチセンスプライマー)、および0.25 μ lのEx-Taq polymerase (5U/ μ l, TaKaRa)を加え混合した。プライマーは、報告されている他のマメ類APX配列¹⁶⁻¹⁸⁾を参考に作成した(Table 1.)。PCRの条件は、94°Cで3分間処理後、{(94°C, 30秒) → (45°C, 30秒) → (72°C, 30秒)}を35サイクル行った後、72°Cで7分間維持してPCR産物を調製した。

3. PCR産物の精製

PCR産物は2%アガロースゲル(1 \times TAE)を用いた電気泳動に供した。電気泳動後のゲルはエチジウムブロマイドで染色し、紫外線(312nm)照射により増幅遺伝子断片を切り出した。切り出したゲルは、GENECLEAN KIT(Q-BIOgene)を用い、重量の3倍容のNaIを加え50°Cで完全にゲルを溶かし、よく懸濁したEZ-GLASS MILKを5 μ l加えて5分間攪拌後、10,000rpm(5秒間)の遠心で沈殿を得た。500 μ lのNEW WASHを加えて完全に溶かした後、10,000rpm(5秒間)で遠心した。これを合計3回繰り返して得られた沈殿物は、遠心エバポレータで乾固し、11 μ lの滅菌水を加えて懸濁後、13,000rpm(2分間)で得られた遠心上清を精製PCR産物とした。

4. 形質転換およびスクリーニング

pGEM[®]-T Easy Vector System(Promega)を用いてAPX遺伝子断片をベクタープラスミドに挿入した。すなわち、3 μ lの精製PCR産物をPCRチューブに入れ、最終的に30mM Tris-HCl(pH7.8), 10mM MgCl₂, 10mM DTT, 10% polyethylene glycol(MW8000, ACSgrade), 5ng/ μ l vector, 0.3 Weiss unit/ μ l T4 DNA Ligaseになるように反応液を加え、16°Cで1時間ライゲーション反応を行

A comparison of ascorbate peroxidases from varieties of Adzuki bean

った。反応後、2.5 μ lのベクター溶液を50 μ lのE. coli DH 5 α Competent Cell (TaKaRa)に加え、30分間氷上に静置した。42°Cで45秒間のヒートショックを与え、直ちに氷上で1分間冷却し、500 μ lのSOC溶液を加えて37°Cで1時間振盪培養した。培養菌液は10,000rpm(30秒間)で遠心して集菌し、菌体を再懸濁し、アンピシリン、X-Gal、IPTGを含むLB固体培地に菌液を広げた。37°Cで16時間培養後に白いコロニーを選び、新しいアンピシリン含有のLB固体培地に再び植菌した。

5. サブクローニングとシーケンシング

APX遺伝子断片を含むプラスミドを導入した大腸菌は、50 μ g/mlアンピシリン含有のLB液体培地で37°C、16時間振盪培養した。培養した大腸菌からFlexiPrep Kit (Amersham Pharmacia Biotech)を用いてプラスミドを回収した。すなわち、培養液は13,000rpm(30秒間)で集菌し、菌体に200 μ lのSolution Iを加えて沈殿を溶解した。200 μ lのSolution IIを加えて軽く混和後、200 μ lのSolution IIIを加えて再び混和した。13,000rpmで12分間遠心して得られた上清に400 μ lの2-プロパノールを加え混和後、13,000rpmで25分間遠心して沈殿を得た。沈殿に150 μ lのSepaglas™ FPを加え、1分間vortex後、13,000rpmで20秒間遠心して上清を除去した。沈殿は200 μ lのWash Buffer、300 μ lの70% EtOHを加えて順次洗浄し、得られた沈殿に52 μ lのDNase free水を加えて溶解した。シーケンシングは北海道システム・サイエンス社に依頼して行った(以下同様)。

6. 3' RACE法および5' RACE法による塩基配列の解析

得られた塩基配列より、GSP (Gene specific primer)を設計し(Table 1.)、それを用いてcDNAを調製して3' RACE法によりAPXの3'末端をクローニングした。3' RACE法は3' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends (Invitrogen)を用いた。PCRは、94°Cで3分間加熱後、{(94°C, 30秒) → (63°C, 30秒) → (72°C, 1分)}を35サイクル行い、72°Cで5分間保持の条件で行った。3' RACE法の場合と同様にして、アンチセンスのGSP1を設計した(Table. 1)。まず、全RNAを逆転写してアズ

キAPX遺伝子の5'末端までのcDNAを作製し、精製したcDNAにdC-tail付加を行った。このcDNAを用いAPXの5'末端側のクローニングを行った。続いてGSP2でdC-tailed cDNAのPCRを行い、さらにGSP3を用いてnested PCRを行った。5' RACE法は、5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends (Invitrogen)を用いて行った。PCRは94°Cで3分間加熱後、{(94°C, 30秒) → (55°C, 30秒) → (72°C, 1分)}を35サイクル行い、72°Cで5分間保持の条件で行った。

7. アズキ品種間の遺伝子配列およびアミノ酸配列の解析

アズキ5品種からAPX遺伝子を含むcDNAを調製し、転写開始点より上流の5'側塩基配列を比較検討した。5'側末端の塩基配列はTable 1.に示したプライマーを用いて5' RACE法により求めた。日本DNAデータバンク (DDBJ)が運営するBLASTおよびClustalWや京都大学化学研究所バイオインフォマティクスセンターが運営するMOTIFなどを用いてAPX遺伝子のホモロジー検索やアミノ酸配列の解析を行った。また、ササゲ (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), ダイズ (*Glycine max* (L.) Merr.), エンドウ (*Pisum sativum* L.), イチゴ (*Fragaria \times magna* Thuill.), キュウリ (*Cucumis sativum* L.), トウガラシ (*Capsicum annum* L.), ホウレンソウ (*Spinacia oleracea* L.), ミドリムシ (*Euglena gracilis*), アルカン資化性酵母 (*Yarrowia lipolytica*)のタンパク質の一次構造に基づいて近隣結合法 (NJ法)により分子系統樹を作成した。

結果及び考察

1. アズキAPXの全cDNA塩基配列とタンパク質のアミノ酸配列

RACE法によりアズキAPXの全塩基配列を決定した (Fig. 1)。アズキ (エリモシヨウズ)から調製したAPXの全塩基数は、polyA tailを除いて1,076bpであった。されるアミノ酸数は250、分子量は27,045Daである。APXは、主にシグナル配列の違いから、細胞質型、葉緑体型、ペルオキシソーム型、新型に分類される¹⁹⁾が、

```

1 CTGGGGCTCGTGGTCTGCTCGTGTCTACTAGGGTTAACATTCTATTTCTTCTCCAGTTCCA 60
61 AGGTTTCGTTAGCCGGAATCTTTCTCGAAAAATTGATCGTAAGCCATGGGAAATCTTACC 120
      M G K S Y 5

121 CAACCGTCAGCGCCGATTACCAAAAAGGCCTTTGAGAAGGCAAAGAAGAAGCTTAGAGGTT 180
      6 P T V S A D Y Q K A F E K A K K K L R G 25

181 TCATCGCCGAGAAGAGATGCGCTCCTCTGATGCTCCGTTTGGCATGGCACTCTGCTGGTA 240
      26 F I A E K R C A P L M L R L A W H S A G 45

241 CCTTTGATGTTAGCACCAAGACCGGTGGTCCCTTGGGAACCATCAAGCACTCTGCTGAAC 300
      46 T F D V S T K T G G P F G T I K H S A E 65

301 TCGCTCAGGTGCCAACACGGTCTTGATATTGCTGTCTCAGACTTTTAGAGCCAATCAAAG 360
      66 L A H G A N N G L D I A V R L L E P I K 85

361 CGGAGTTTCTATCTTGAGCTACGCAGATTCTACCAGTTGGTGGGTTGTGCGAGTTG 420
      86 A E F P I L S Y A D F Y Q L A G V V A V 105

421 AGATAACTGGTGGACCCGAAGTTCCTTTTACCCGGGCAGAGAGGACAAGCCAGAACCAC 480
106 E I T G G P E V P F H P G R E D K P E P 125

481 CTCCAGAGGGTCGCTTGCCTGATGCAACCAAGGGTCTGATCACCTTAGGGATGTGTTG 540
126 P P E G R L P D A T K G S D H L R D V F 145

541 GCAAGGCTATGGGCTTAGTGATCAGGATATTGTTGCTCTATCTGGTGGTCACACCATTG 600
146 G K A M G L S D Q D I V A L S G G H T I 165

601 GAGCGGCACACAAGGAGCGATCAGGATTTGAGGGTCCCTGGACCTCAAATCCTTATTT 660
166 G A A H K E R S G F E G P W T S N P L I 185

661 TTGACAACTCATACTTTAAGGAGTTGTTGAGTGGTGAAAAGGAAGTCTCCTTCAGCTGC 720
186 F D N S Y F K E L L S G E K E G L L Q L 205

721 CTTCTGACAAGGCACCTTTTGTGAGATTCCGTATTCCGCCCTCTGTTGAAAAATATGCAG 780
206 P S D K A L L S D S V F R P L V E K Y A 225

781 CGGACGAAGATGCATTTTTTGTGATTACGCAGTTGCTCACAAAAGCTTTCCGAGCTTG 840
226 A D E D A F F A D Y A V A H Q K L S E L 245

841 GGTTCGCTGAAGCCTAATCAACATATAGGCAGTTGGAGATCTAGAAAACAAAAGAAGTGG 900
246 G F A E A *

901 TTTTAAATTCGATGTGAGGATGTGTTTTGTCCCCCTTTATTTTTACCATTTGGCAAGT 960
960 TGGATTGTTTTTCTTTGTTGTGGTTGATCCTTTTGTAAATAACATTGCTAAGATGC 1020
1021 TAAGAGTAAATGGTTGAACTCATTGGGACCTCACGTTTCTTACGTGCCTACTGGTA 1076

```

Fig. 1 アズキ APX をコードする cDNA の塩基配列とアミノ酸配列 (品種: エリモシヨウズ)

A comparison of ascorbate peroxidases from varieties of Adzuki bean

Adzuki bean	1	MGKSYPTVSADYQKAFKAKKLRGFIAEKRCAPLMRLAWHSAGTFDVS	50
Cowpea	1	MGKSYPTVSADYQKAIEKAKKLRGFIAEKRCAPLMRLAWHSAGTFDVS	50
Soybean	1	MGKSYPTVSADYQKAVEKAKKLRGFIAEKRCAPLMRLAWHSAGTYDVS	50
Pea	1	MGKSYPTVSPDYQKAIEKAKKLRGFIAEKRCAPLMRLAWHSAGTFDVS	50
Adzuki bean	51	TKTGGPFGTIKHSAELAHGANGLDIAVRLLEPIKAEFPLSYADFYQLA	100
Cowpea	51	TKTGGPFGTIKHPAELAHGANGLDIAVRLLEPIKAEFPLSYADFYQLA	100
Soybean	51	SKTGGPFGTIKHPSELAHGANGLDIAVRLLEPLKAEFPLTYADFYQLA	100
Pea	51	TKTGGPFGTIKHQAELAHGANGLDIAVRLLEPIKEQFPVSYADFYQLA	100
Adzuki bean	101	GVVAVEITGGPEVPFHPGREDKPEPPPEGRLPDATKGSDDLDRDVFVKAMG	150
Cowpea	101	GVVAVEITGGPEVPFHPGREDKPEPPPEGRLPDATKGSDDLDRDVFVKAMG	150
Soybean	101	GVVAVEITGGPEVPFHPGREDKPEPPPEGRLPDATKGSDDLDRDVFVKAMG	150
Pea	101	GVVAVEITGGPEVPFHPGREDKPEPPPEGRLPDATKGSDDLDRDVFVKAMG	150
Adzuki bean	151	LSDQDIVALSGGHTIGAAHKERSGFEGPWTSNPLIFDINSYFKELLSGEKE	200
Cowpea	151	LSDQDIVALSGGHTIGAAHKERSGFEGPWTSNPLIFDINSYFKELLSGEKE	200
Soybean	151	LSDRDIVALSGGHTIGAAHKERSGFEGPWTSNPLIFDINSYFKELLSGEKE	200
Pea	151	LSDQDIVALSGGHTIGAAHKERSGFEGPWTSNPLIFDINSYFTELLTGEKD	200
Adzuki bean	201	GLLQLPSDKALLSDSVFRPLVEKYAADEDAFFADYAVAHQKLSLGFVFAEA	250
Cowpea	201	GLLQLPSDKALLSDPVFRPLVEKYAADEDAFFADYAVAHQKLSLGFVFAEA	250
Soybean	201	GLLQLPSDKALLSDPVFRPLVEKYASDEDAFFADYAEAHQKLSLGFVFAEA	250
Pea	201	GLLQLPSDKALLTDSVFRPLVEKYAADEDAFFADYAEHLKLSLGFVFAEA	250

Fig. 2 4種類のマメ科植物 APX のアミノ酸配列

Adzuki bean (*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi et H. Ohashi, アズキ), Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp., ササゲ, 16), Soybean (*Glycine max* (L.) Merr., ダイズ, 17), Pea (*Pisum sativum* L., エンドウ, 18)を用いた。

翻訳領域(ORF)は750bpで、非翻訳領域は5'側に105bp, 3'側に222bp含まれていた。アズキAPXの予想アズキAPX遺伝子の一次配列を他の植物のAPXと比較したところ、ササゲ、ダイズおよびエンドウのAPX¹⁶⁻¹⁸⁾とそれぞれ98%, 95%および92%の相同性が見られた(Fig. 2)。これらのAPX遺伝子はすべて細胞質型であることから、アズキAPXも細胞質型と推定している。また、マメ科植物以外では、バラ科のイチゴ、ウリ科のキュウリ、ナス科のトウガラシ、アカザ科のハウレンソウなどのAPX²⁰⁻²³⁾とアズキAPXは80%以上の高い相同性が認められた。さらに単細胞藻類のミドリムシや菌類の酵母のAPX²⁴⁾とは、それぞれ50%および48%の相同性が認められた。これらの生物のAPX遺伝子を使用した進化系統樹をFig.

3に示した。アズキAPXはマメ科植物APXグループに属し、最もササゲに近いことが示された。アズキはササゲと同じササゲ属に属し、遺伝的背景が類似しているが、原産地や生育北限地、種子の臍形状などの違いから区別されている²⁶⁾。また、APX遺伝子の33番目から44番目付近のアミノ酸配列はこれまで報告のある全ての植物においてよく保存された領域で、アズキAPXにもこの保存領域が認められた。この塩基配列部分は、ペルオキシダーゼの活性中心に関連のあることが報告されている^{27, 28)}。また、APXは植物に特有の遺伝子と考えられているが、植物のAPX保存塩基配列部分を持つ動物の遺伝子も見つかっており²⁹⁾、今後の展開に期待される。

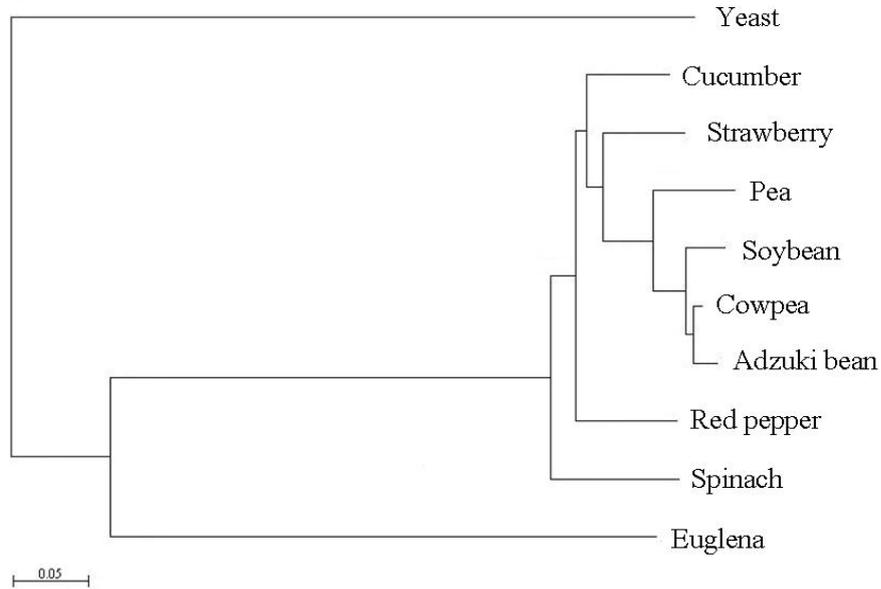


Fig. 3 10種類の植物APXアミノ酸配列に基づく近隣結合法 (NJ法) による分子系統樹

4種類のマメ科植物; Adzuki bean (*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi et H. Ohashi, アズキ), Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp., ササゲ, 16), Soybean (*Glycine max* (L.) Merr, ダイズ, 17), Pea (*Pisum sativum* L., エンドウ, 18), 他は1種類ずつでバラ科; Strawberry (*Fragaria × magna* Thuill., イチゴ, 20), ウリ科; Cucumber (*Cucumis sativum* L., キュウリ, 21), ナス科; Red pepper (*Capsicum annuum* L., トウガラシ, 22), アカザ科; Spinach (*Spinacia oleracea* L., ホウレンソウ, 23), ユーグレノゾア; Euglena (*Euglena gracilis*, ミドリムシ, 24), 真菌類; Yeast (*Yarrowia lipolytica*, アルカン資化性酵母, 25) を用いた。

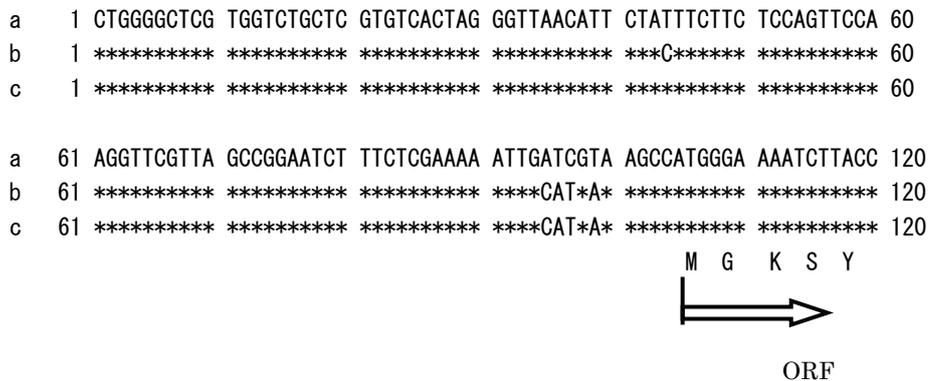


Fig. 4 アズキ 5 品種の APX 遺伝子を含む cDNA5' 上流域の塩基配列

a: エリモシヨウズ, b: アカネダイナゴンおよびサホロシヨウズ, c: 斑小粒系-1 およびトヨミダイナゴン

A comparison of ascorbate peroxidases from varieties of Adzuki bean

2. アズキ品種間の APX 転写制御領域の比較

細胞質型APXにはAPX₁とAPX₂が存在し、シロイヌナズナやイネAPX₁の転写領域にはHSF (heat shock factor) 結合モチーフが存在すること^{30, 31)}や同植物のAPX₂は光ストレスやH₂O₂により誘導される^{32, 33)}ことが報告されている。船附らは、数種類のダイズ品種に含まれるAPXを比較してAPX₁の欠失した品種のあることやその品種の耐冷性が強いことを報告している³⁴⁾。しかし、品種間でのAPX転写領域配列の特徴については調べていない。

現在広く栽培されている「エリモショウズ」、比較的耐冷性の強い品種である「アカネダイナゴン」と「サホロショウズ」、および耐冷性の弱い品種の「斑小粒系-1」、その中間の耐冷性である「トヨミダイナゴン」のアズキ5品種のAPX転写制御領域を含むORF上流側の配列を比較したところ、品種間における転写制御領域の配列は95%以上が相同であった(Fig. 4)。しかし、エリモショウズのAPX遺伝子ORFから5'末端側6-10番目の塩基配列は“TGCTA”であったが、その他の4品種の配列は“AGTAC”で異なっていた。また、エリモショウズ、斑小粒系-1およびトヨミダイナゴンのAPX遺伝子ORFから5'末端側61番目の塩基は“T”であったが、アカネダイナゴンおよびサホロショウズのそれは“C”と異なっていた。エリモショウズとそれ以外の品種間や、出芽期の耐冷性の強い品種とそれ以外の品種間にAPX遺伝子5'末端側塩基の一部に違いが見られたが、この塩基配列の違いはアズキ品種の個性を示すことに関係しているのかもしれない。

今回単離したアズキAPXは、APX₂型と相同性が高く生育環境因子により発現誘導に違いが期待されることから、各品種におけるAPXのmRNA発現量の違いについても今後検討したい。

謝辞：この研究は日本豆類基金協会の資金援助を受け、帯広畜産大学21世紀COEプログラム研究の一環として行った。また、アズキ品種は、北海道立十勝農業試験場小豆・菜豆科より分譲していただき、APX遺伝子の解析は、北海道農業研究センター、地域基盤研究部の船附秀行氏および佐藤裕氏にご教授いただきました。ここに深

く感謝いたします。

引用文献

1. 村田吉平(1997) 小豆の耐冷性育種の成果と展望. *北海道立農業試験場資料* 第27号 48-56.
2. 新免輝夫(1991) 現代植物生理学 環境応答.
3. 寺島一郎(1992) 低温による光合成器官の損傷及び修復. *植物細胞工学会誌* 4 : 311-318.
4. 佐藤直樹(1994) 低温適応の分子機構と耐低温性植物の作出. *植物細胞工学会誌* 6 : 12-17.
5. Foyer, C. H., Halliwell, B. (1976) The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* 133 : 21-25.
6. Nakano, Y., Asada, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 22 : 867-880.
7. Asada, K. (1992) Ascorbate peroxidase — a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiol. Plant.* 85 : 235-241.
8. Jimenez, A., Hernandez, J. A., Del Rio, L. A., Sevilla, F. (1997) Evidence for the Presence of the Ascorbate-Glutathione Cycle in Mitochondria and Peroxisomes of Pea Leaves. *Plant Physiol.* 114 : 275-284.
9. Asada, K. (1999) THE WATER-WATER CYCLE IN CHLOROPLASTS: Scavenging of Active Oxygen and Dissipation of Excess Photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50 : 601-639.
10. Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (1989) *Free Radicals in Biology and Medicine*(Second Edition).
11. 何寧, 太野友和, 小嶋道之 (2005) 低温と光がアズキ実生の抗酸化酵素活性に与える影響. *帯広畜産大学学術研究報告* 26 : 21-25.
12. 李進才, 松井鑄一郎 (2001) 低温処理が *cattleya* と *cymbidium* 葉の抗酸化酵素活性に及ぼす影響. *園学雑誌* 70 : 360-365.
13. 瓜谷郁三 (2001) ストレスの植物生化学・分子生物学.

14. Kudo, A., Aono, M., Nakajima, N., Saji, H., Tanaka, K., Kondo, N. (1999) Differential Responses in Activity of Antioxidant Enzyme to Different Environmental Stress in *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Res.* **112** : 279-290.
15. Matsumura, T., Tabayashi, N., Kamagata, Y., Souma, C., Saruyama, H. (2002) Wheat catalase expressed in transgenic rice can improve tolerance against low temperature stress. *Physiologia Plantarum* **116** : 317-327.
16. Mittler, R., Zilinskas, B. A. (1991) Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of cDNA encoding pea cytosolic ascorbate peroxidase. *FEBS* **289** : 257-259.
17. Ferrari-Iliou, R., Zuily-Fodil, Y., D'Arcy-Lameta, A., Pham Thi, A. T. (1996) DDBJ accession No. U61379.
18. Caldwell, C. R., Turano, F. J., McMahon, M. B. (1998) Identification of two cytosolic ascorbate peroxidase cDNAs from soybean leaves and characterization of their products by functional expression *E. coli*. *Planta* **204** : 120-126.
19. Teixeira, F.K., Menezes-Benaventa, L., Galvao, V.C., Margis, R. and Margis-Pinheiro, M. (2006) Rice Ascorbate peroxidase gene family encodes functionally diverse isoforms localized in different subcellular compartments. *Planta* **6** : 1-15.
20. Kim, I. J., Lee, B.H., Jo, J., Chung, W. I. (2001) Sequence variability of nine cytosolic ascorbate peroxidases in polyploid strawberry. *DNA Seq.* **11** : 475-484.
21. Amako, K., Sano, S., Miyake, C., Cao, W., Asada, K. (1996) DDBJ accession No. D88649-1.
22. Yoo, T.H., Park, C.-J., Lee, G.-J., Shin, R., Yun, J.-H., Kim, K.-J., Rhee, K.-H., Paek, K.-H. (2002) A hot pepper cDNA encoding ascorbate peroxidase is induced during the incompatible interaction with virus and bacteria. *Mol. Cells* **14** : 75-84.
23. Webb, R. P., Allen, R. D. (1995) Isolation and Characterization of a cDNA for Spinach Cytosolic Ascorbate Peroxidase. *Plant Physiol.* **108** : 1325.
24. Ishikawa, T., Rapolu M. (2002) DDBJ accession No. AB077953-1
25. Genoscope (2004) DDBJ accession No. CR382130-174.
26. 海妻矩彦, 喜多村啓介, 酒井真次 (2003) 食用マメ類の科学 現状と展望.
27. Patterson, W. R., Poulos, T. L. (1995) Crystal Structure of Recombinant Pea Cytosolic Ascorbate Peroxidase. *Biochemistry* **34** : 4331-4341.
28. Zhang, H., Wang, J., Nickel, U., Allen, R. D., Googman H.M. (1997) Cloning and expression of an *Arabidopsis* gene encoding a putative peroxisomal ascorbate peroxidase. *Plant Molecular Biology* **34** : 967-971.
29. Wada, N., Kinoshita, S., Matsuo, M., Amako, K., Miyake, C., Asada, K. (1998) Purification and molecular properties of ascorbate peroxidase from bovine eye. *Biochem. Biophys. Res Commun.* **242** : 256-261.
30. Storozhenko, S., Pauw, P.D., Montagu, M.V., Inze, D., and Kushnir, S. (1998) The heat-shock element is a functional component of the *Arabidopsis* APX1 gene promoter. *Plant Physiol.* **118** : 1005-1014.
31. Sato, Y., Murakami, T., Funatsuki, H., Matsuba, S., Saruyama, H. and Tanida, M. (2001) Heat shock-mediated APX gene expression and protection against chilling injury in rice seedling. *J. Exp. Bot.* **354** : 145-151.
32. Karpinski, S., Reynolds, H., Karoinska, B., Wingsle, G., Creissen, G. and Mullineaux, P. (1999) Systemic signalling and acclimation in response to excess excitation energy in *Arabidopsis*. *Science* **284** : 654-657.
33. Morita, S., Kaminaka, H., Masumura, T., and Tanaka, K. (1999) Induction of rice cytosolic ascorbate peroxidase mRNA by oxidative stress; the involvement of hydrogen peroxide in oxidative stress signaling. *Plant. Cell Physiol.*, **40** : 417-422.
34. Funatsuki, H., Kurosaki, H., Murakami, T., Matsuba, S., Kawaguchi, K., Yumoto, S. and Sato, Y. (2003) Deficiency of a cytosolic ascorbate peroxidase associated with chilling tolerance in soybean. *Theor. appl. Genet.* **106** : 494-502

ABSTRACT

The nucleotide sequence was determined for a cDNA encoding Adzuki bean [*Vigna angularis* (Willd.) et H. Ohashi; var. Erimoshouzu] ascorbate peroxidase (VaAPX). VaAPX detoxifies peroxide, a cytotoxin, using ascorbate as a substrate. The VaAPX open reading frame was 1,076bp, from which the number of amino acids and the molecular weight were inferred to be 250 and ca. 27,000Da, respectively. The Adzuki bean APX had 98% amino acid homology with cowpea, 95% with soybean, and 92% with pea. In addition, cDNAs coding for APX were prepared from initial leaves of five different varieties of Adzuki beans were compared. The result revealed the following: (1) the sequence of var. Erimoshouzu at bases 6-10 upper from the Open Reading Frame (ORF) of APX gene was "TGCTA", whereas those of the other four varieties were "AGTAC" and (2) vars. Erimoshouzu, Buchisouryukei-1, and Toyomidainagon had a "T" at base 61, whereas vars. Akanedainagon and Sahoroshouzu had a "C".

Keyword : Ascorbate peroxidase(APX), Ascorbie acid,cDNA,
Adzuki bean

昆虫寄生菌 *Verticillium lecanii* (*Lecanicillium* spp.) によるダイコンパーティシリウム黒点病の生物防除

楠木 芳¹⁾・川井彩子^{1, 2)}・相内大吾^{1, 3)}・小池正徳¹⁾*・谷 昌幸¹⁾・倉持勝久¹⁾

(受理：2006年4月28日)

Biological control of Verticillium black spot of Japanese radish by entomopathogenic *Verticillium lecanii*
(*Lecanicillium* spp.)

Kaori Kusunoki¹, Ayako Kawai^{1, 2}, Daigo Aiuchi^{1, 3}, Masanori Koike^{1*}, Masayuki Tani¹ and Katsuhisa Kuramochi

1)

摘要

ダイコンパーティシリウム黒点病に対する防除効果を昆虫寄生菌 *Verticillium lecanii* を用いて検討した。温室試験と圃場試験で *V. lecanii* の7菌株 (A-2、B-2、C-1、2aF30、2aF31、2aF43、AaF101) を用いて実施した。*V. lecanii* の分生胞子を処理したポット試験では全ての *V. lecanii* 菌株で高い防除効果があり、病原菌単独処理と比較して有意な差が認められた。なかでも B-2 が最も高い防除効果を示し、病原菌単独処理の発病率 51.2% と比較して 31.4% となった。*V. lecanii* のフスマ培養土を用いたポット試験における病徴抑制効果は病原菌単独処理区との有意な差が認められたのは C-1 処理区のみであった。A-2、B-2 処理区においても抑制効果の傾向がみられたが、生長促進効果では顕著な差はみられなかった。また、圃場試験では全ての *V. lecanii* 処理区で発病が抑制された。特に B-2、C-1 においては高い発病抑制効果があり、病原菌単独処理区の半分以下に抑制していた。商品価値調査においては *V. lecanii* 処理区で商品価値のあるダイコンの数が優った。以上の結果から、病原菌単独処理と有意な差が認められなかったものもあるが、*V. lecanii* はダイコンパーティシリウム黒点病を抑制するのに有効である傾向が確認された。よって、*V. lecanii* はダイコンパーティシリウム黒点病に対して生物防除資材として有望であることが示唆された。

キーワード；ダイコンパーティシリウム黒点病、*Verticillium dahliae*, *Verticillium lecanii*

緒言

ダイコンパーティシリウム黒点病は冷涼な気候で発病しやすく、北海道で深刻な問題となっている。本病の主な病徴は根部維管束の黒変であり、外見は健全であるた

め発病の発見が難しい。そのため発病が発見されるとカット野菜としての販売に限られたり、市場に売り出すことができなくなったりと発病地域 (十勝、羊蹄) のダイコン栽培農家に多大な被害を及ぼしている。本病は主に

1 帯広畜産大学畜産学部 環境総合科学講座

1 Department of Agro-environmental Science, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine

2 京都大学大学院農学研究科 環境微生物制御学研究室

2 Laboratory of Environmental Mycology, Graduate School of Agriculture, Kyoto University

3 岩手大学大学院連合農学研究科 生物制御学講座

3 The United Graduate School of Agricultural Science, Iwate University

*Corresponding to Masanori Koike (e-mail:koike@obihiro.ac.jp)

不完全菌類の *Verticillium dahliae* Klebahn によって引き起こされる病害であり、土壌伝染性病原菌としてトマト、ナス、ダイコンなどの野菜や花卉類などに根から感染して導管に侵入し、維管束系の機能を低下させ、半身萎ちょう病や導管病などを引き起こす重大な病原菌として知られている (北沢ら、1980)。*V. dahliae* は土壌中で長く病原力を保ったまま微小菌核として生存することが可能なため、防除困難な病原菌である (森田、1983; 原田ら、1997; Tjamos et al., 2004; Dong et al., 2005)。また、輪作・休閒では防除効果が現れにくく、土壌くん蒸剤による土壌消毒が有効であるが、土壌くん蒸剤は高価なうえ施用方法も煩雑である。現在では、土壌消毒剤のダズメットを用いた防除法が検討、実施されている (小松ら、2001a, 2001b; 角野ら、2001a, 2001b)。しかし、人畜に対する安全性の面や環境保全型農業を推進していくうえで問題となるため、これに替わる防除法として拮抗微生物などを用いた生物防除の確立に大きな期待がよせられている (木嶋ら、1988; 勝部ら、1997)。

病原菌に何らかの活性を示す微生物は拮抗微生物と呼ばれており、拮抗微生物は土壌中や植物体上などから容易に分離することができるため、これを用いた病害の生物防除は世界各国で試みられている (Barranco et al., 2002; Karagiannidis et al., 2002; 勝部ら、1997; 木嶋ら、1995; Verhaar et al., 1996)。今回の研究で用いる昆虫寄生性糸状菌 *Verticillium lecanii* はアブラムシ類、コナジラミ類などの害虫 (Hall, 1984) だけでなく、うどんこ病菌、さび病菌などの植物病原菌 (Verhaar et al., 1996) にも寄生性を示す有用な微生物である。この *V. lecanii* の特性を利用して、アブラムシ用に VERTREC、オンシツコナジラミ用に MYCOTAL が既に生物防除資材としてアリスタライフサイエンス社 (製造元オランダ・コパート社) より販売されている。また、ある程度の低温、乾燥条件下でも生存可能な *V. lecanii* 菌株が分離されたことにより、圃場における使用の可能性も検討されるようになった (東尾ら、2002; Koike et al., 2004)。しかし、*V. lecanii* は植物病原菌に寄生性を示すことは確認されているものの、まだ植物病原菌に対する防除資材としては販売されていない。そこで本研究では、植物病原菌 *V. dahliae* によって引き起こされるダイコンパーティシリウム黒点病に対して *V.*

Iecanii が生物防除資材と成り得る可能性があるかを探るため、温室内と圃場での試験を実施し、本菌の防除効果を検討した。

材料および方法

菌の分離・培養

V. lecanii の菌株は帯広畜産大学環境微生物学研究室の杉本らにより、本学地域共同センター温室内に発生したモモアカアブラムシから分離された A-2、B-2、C-1 を用いた (Sugimoto et al., 2003)。3 回目の温室試験においては、*V. lecanii* の A-2、B-2、C-1 の他にプロトプラスト融合したものの中からうどんこ病に対して抑制効果の高かった 2 菌株 2aF-30、AaF-101 を供試した (Aiuchi et al., 2004)。また圃場試験においては A-2、B-2、C-1 に加え、プロトプラスト融合したものの中からアブラムシに対して病原性の高かった 2 菌株、2aF-31、2aF-43 を選抜し、試験に供試した。1 回目の温室試験において、*V. lecanii* 3 菌株 (A-2、B-2、C-1) は PDB 培地で 25°C、14 日間振とう培養し、ガーゼでろ過して菌糸片を取り除いた胞子懸濁液を A-2、B-2 は 1×10^7 、C-1 は 0.25×10^7 cfu/ml に調整したものを使用した。2、3 回目の温室試験および圃場試験では、*V. lecanii* は土壌フスマ培地で 14 日間培養したもの (A-2: 1×10^8 、B-2: 2×10^8 、C-1: 4×10^7 、2aF30: 2×10^7 、2aF31: 3×10^7 、2aF43: 4×10^7 、AaF101: 6×10^7 cfu/g) を用いた。*V. dahliae* は北海道の芽室町で感染したダイコンから分離された株 (TS21、VCG4) を用い、*V. lecanii* と同様に土壌フスマ培地で 14 日間培養したもの (4×10^7 cfu/g) を供試した。

供試植物

すべての実験において *V. dahliae* に感受性の高いダイコン品種である「貴宮」(シンジェンタシード) を用いた。

V. lecanii 分生胞子処理による発病抑制効果 (ポット試験 1)

V. lecanii の発病抑制効果を検討するため、本学地域共同研究センター温室において 1 回目の温室試験を実施した。ジフィーポット (6cm) に市販の園芸培土を

昆虫寄生菌 *Verticillium lecanii* (*Lecanicillium* spp.) によるダイコンパーティシリウム黒点病の生物防除
 詰め、1ポット当たりダイコン（品種：貴宮）を2粒播種し、プラスチックトレーにジフィーポットを5つずつ入れた。出芽後、ポット当たり1株に間引きし、7日後茎のまわりに *V. lecanii* の孢子懸濁液を10ml接種した。さらに4日後、1トレー当たり5% (w/w) の *V. dahliae* 培土を100g詰め、30日後に発病評価を実施した。*V. dahliae* のみの病原菌単独処理と無処理区を設置した。1トレー5株とし、3反復行った。発病評価は次式により算出した。

$$\text{発病率} = \Sigma (\text{枯れた葉の数} / \text{全体の葉の数}) \times 100$$

***V. lecanii* 土壌フスマ培養土による病徴抑制効果（ポット試験2）**

V. lecanii による根部維管束の病徴抑制効果を検討するため、2回目の試験を温室において実施した。ジフィーポットに市販の園芸培土を詰め、1ポット当たりダイコン（貴宮）を2粒播種し、出芽後、ポット当たり1株に間引きした。7日後、茎のまわりに土壌フスマ培地で培養した *V. lecanii* を1g接種した。さらに7日後、圃場の土を半分まで詰め、その上に *V. dahliae* 濃度5% (w/w) の病原菌汚染土壌を500g詰めたポリポットにジフィーポットの底をはがして移植した。*V. dahliae* のみの病原菌単独処理と無処理区を設置した。1ポリポット当たり3株とし、5反復行った。40日後、植物体の全体重量と根重量を量り、病徴評価を実施した。病徴評価は主根を縦に切った面の病徴程度（0：病徴なし、1：根の1/5が病徴を示す、2：根の2/5が病徴を示す、3：3/5が病徴を示す、4：4/5が病徴を示す、5：根全体が病徴を示す）により評価した。

***V. lecanii* の発病抑制・生長促進効果（ポット試験3）**

圃場試験に向けてより容易な接種方法や生長促進効果について検討するため、3回目の試験を温室において実施した。ジフィーポットの底に土壌フスマ培地で培養した *V. lecanii* を1g入れ、その上に市販の園芸培土を詰め、1ポット当たりダイコン（貴宮）を2粒播種し、出芽後、ポット当たり1株に間引きした。14日後、本学環境微生物学研究室のダイコンパーティシリウム黒

点病が多発する圃場の土を半分まで詰め、その上に *V. dahliae* 濃度3% (w/w) の病原菌汚染土壌を500g詰めたポリポット (21cm) にジフィーポットの底をはがして移植した。*V. dahliae* のみの病原菌単独処理と無処理区を設置した。1ポリポット当たり3株とし、6反復行った。50日後、温室試験1と同じく発病率を算出し、植物体の全体重量と根重量を測定した。

圃場試験

本学環境微生物学研究室の圃場（黒ボク土）において2005年7月14日から9月9日にかけて試験を実施した。本圃は以前から *V. dahliae* によるダイコンパーティシリウム黒点病が発病する汚染土壌である。*Bacillus* 属 (KB-1、KB-2、KB-3) と *V. lecanii* の菌株 A-2、B-2、C-1、2aF-31 および 2aF-43 を用いて行った (Kawai et al., 2006)。ジフィーポットの底に土壌フスマ培地で培養した *V. lecanii* を1g入れ、その上に園芸培土を詰め、1ポット当たりダイコン（貴宮）を2粒播種し、7月14日に本圃へ移植した。なお、試験区は1×20mのベッドが9つ、そこに両側に30cm間隔で穴の開いたシルバーマルチを用いて18列設け、一番端の両列はボーダーとした。また、1列を15株ずつの3つに分け、全部で48区画設けた。*V. lecanii* 5菌株処理区、*Bacillus* 属3菌株処理区、コントロール区を設定し、その配列はランダムとした。1区画15株とし、5反復実施した。

発病調査と生育調査（全体重量、根重量）、および商品化率調査（市場に商品として売り出せるダイコンの数/区画当たりのダイコンの数）を9月9日に実施した。

結果

***V. lecanii* 分生孢子処理による発病抑制効果（ポット試験1）**

Fig. 1 に示したように、B-2 処理区は発病率31.4%と処理した菌株の中で最も抑制しており、次いでA-2 処理区の35.2%、C-1 処理区の36.8%となり、高い防除効果を示した。全ての *V. lecanii* 菌株は病原菌単独処理と比較して有意に発病を抑制していた。

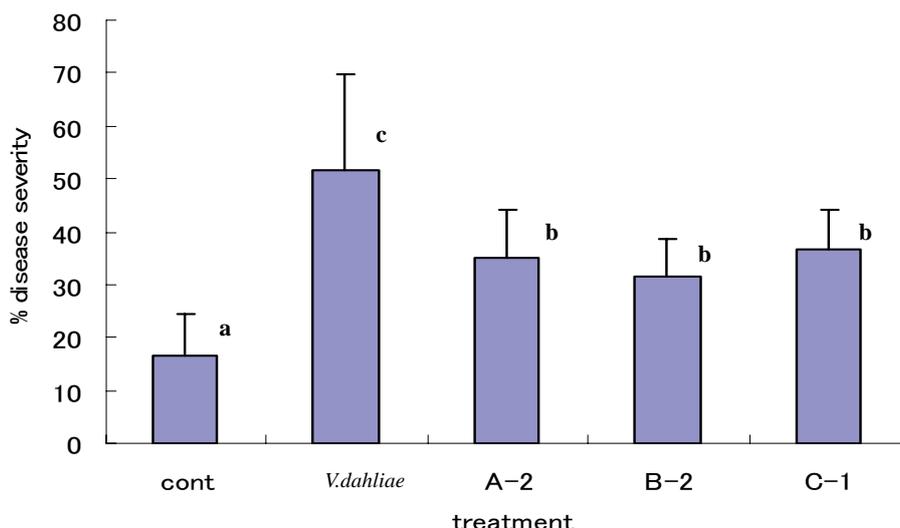


Fig. 1 Effect of treatment with *V. lecanii* on disease incidence of Verticillium black spot of Japanese radish under greenhouse condition. Disease severity was calculated as follow. Disease severity = $\Sigma(\text{number of chlorosis leaves} / \text{number of all leaves}) \times 100$. Means designated with the same letter are not significantly different as determined by the Schffe's F test ($P < 0.05$). Vertical bar indicated S.D.

Table 1 Plant weight, root weight and disease severity of Japanese radish inoculated with *Verticillium dahliae* under greenhouse (Experiment 2)

Treatment	Average of plant weight (g)	Average of root weight (g)	Disease severity *
A-2	67.6 ab **	17.6 ab	3.1 bc
B-2	61.4 ab	19.2 ab	2.9 bc
C-1	60.6 ab	17.4 ab	2.8 b
cont	89.4 a	33.3 a	0.0 a
<i>V.dahliae</i>	54.6 b	13.4 b	3.9 c

* Disease severity :0= no discoloration; 1=1/5 of the cross root showing discoloration; 2=2/5 of the cross root showing discoloration; 3=3/5 of the cross root showing discoloration; 4=4/5 of the cross root showing discoloration; 5=full cross root showing discoloration.

** Means designated with the same letter are not significantly different as determined by the Schffe's F test ($P < 0.05$).

V. lecanii 土壌フスマ培養土による病徴抑制効果 (ポット試験2)

V. lecanii の菌株別にダイコンの全体重量と根重量を Table 1 に示した。全体重量も根重量も病原菌単独処理と比較して有意な差は認められなかったが、全ての *V. lecanii* 菌株処理区において全体重量、根重量共に病原菌単独処理区よりも重量が優った。*V. lecanii* 処理による病徴抑制効果については、C-1 処理区が病徴 2.8 と最も抑制しており、病原菌単独処理と比較して有意な差を示した (Table 1)。また、A-2 および B-2 処理区は病原菌単独処理と比較して有意な差は認められなかったが、いずれも病原菌より病徴を抑制していた。

V. lecanii の発病抑制・生長促進効果 (ポット試験3)

発病については Fig. 2 に示したように、全ての *V. lecanii* 菌株処理区において病原菌単独処理区と有意な差が認められた。特に B-2 処理区が 24.9% と最も抑制しており、病原菌単独処理区 (41.8%) の約半分に発病を抑制し、高い防除効果を示した。

全体重量・根重量については Table 2 に示した。全ての *V. lecanii* 菌株処理区において、全体重量・根重量共に顕著な差は認められなかった。しかし、根重量では 2aF-30 処理区 (0.97g) が無処理区 (0.91g) を上回った。

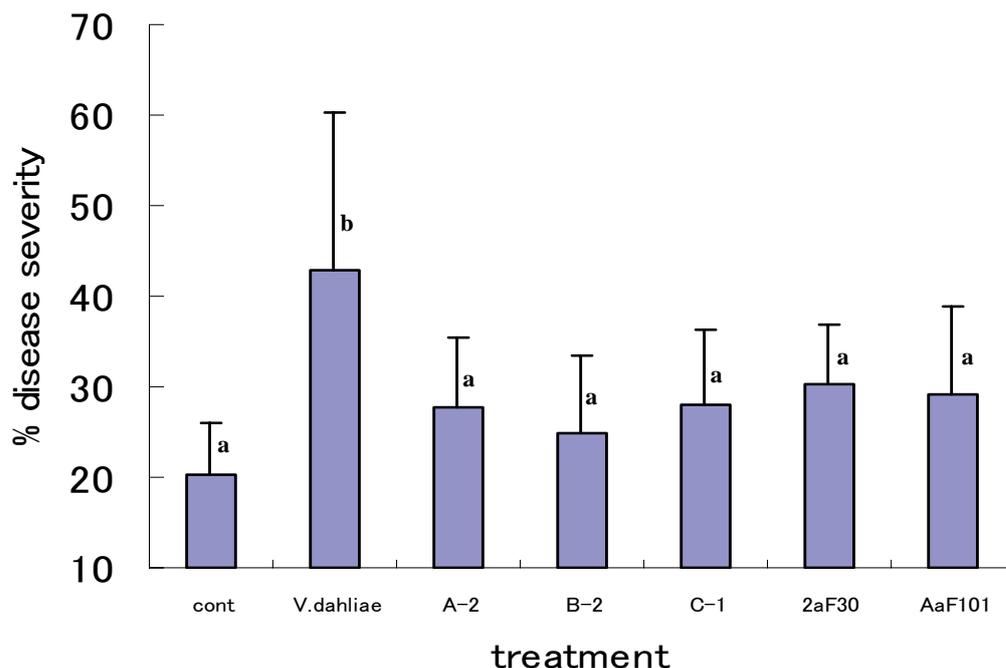


Fig.2 Effect of treatment with *V.lecanii* on disease incidence of Verticillium black spot of Japanese radish under greenhouse condition. Disease severity was calculated as follow. Disease severity= $\Sigma(\text{number of chlorosis leaves}/\text{number of all leaves})\times 100$. Means designated with the same letter are not significantly different as determined by the Schffe's F test ($P<0.05$). Vertical bar indicated S.D.

Table 2 Effect of *Verticillium dahliae* inoculation to plant weight and root weight of Japanese radish under greenhouse (Experiment 2)

Treatment	Average of plant weight (g)	Average of root weight (g)
A-2	16.3	0.87
B-2	13.2	0.74
C-1	13.3	0.77
2aF30	14.1	0.97
AaF101	13.3	0.89
cont	16.3	0.91
<i>V.dahliae</i>	13.4	0.81
	NS *	NS

* NS: not significant according to ANOVA F-test.

圃場試験

Table 3 に *V. lecanii* の菌株別に圃場下におけるダイコンの全体重量および根重量を示した。全ての菌株区において病原菌単独処理区と比較して有意な差は認められず、*V. lecanii* の菌株間で最も平均全体重量の高かった A-2 処理区 (934.9g) と最も低かった B-2 処理区 (856.1g) で 78.8g の差を示した。平均根重量では、最も高かった A-2 処理区 (647.8g) と最も低かった C-1 処理区 (600.0g) の差は 47.8g であった。

また、発病株率では全ての *V. lecanii* 菌株区におい

て病原菌単独処理区と比較し、発病を抑制傾向がみられたが、有意な差は認められなかった (Fig 3)。しかし、C-1 処理区では発病率 5.8%、B-2 処理区では 9.4% と高い防除効果が認められた。全体重量および根重量と発病率等との関連性はなかった。

商品化率においては、*V. lecanii* 菌株区と病原菌単独処理区間に有意な差はなかった (Table 3)。しかし、菌株間であまり差はなかったものの、全ての *V. lecanii* 菌株区は病原菌単独処理区よりも商品価値のあるダイコンが多かった。

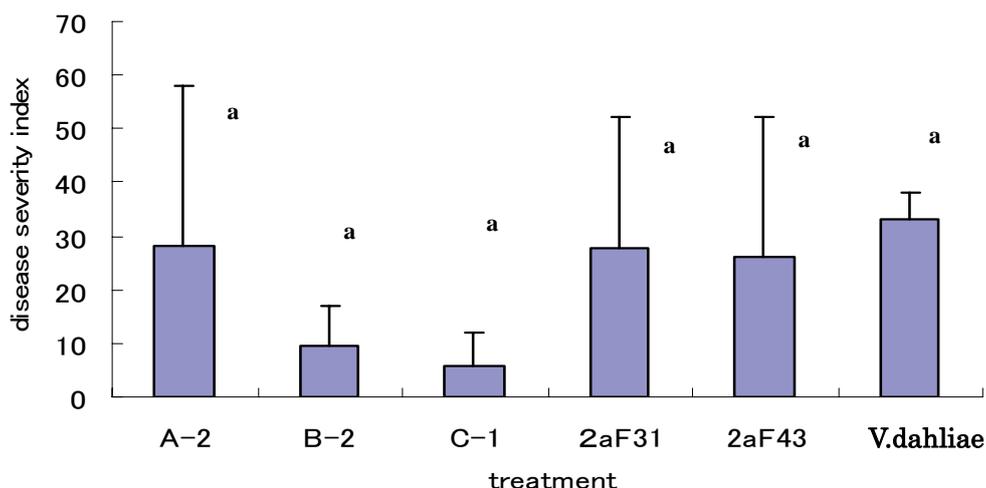


Fig.3 Effect of treatment with *V.lectanii* on disease incidence of Verticillium black spot of Japanese radish under *V.dahliae* infested field. Means designated with the same letter are not significantly different as determined by the Scheffé's F test ($P < 0.05$). Vertical bar indicated S.D.

Table 3 Plant weight, root weight and marketable root of Japanese radish under *V.dahliae* infested field.

Treatment	Average of plant weight (g)	Average of root weight (g)	Average of marketable root (%)
A-2	934.9	647.8	59.5
B-2	856.1	609.3	58.2
C-1	861.3	600.0	56.9
2aF-31	920.1	629.7	58.1
2aF-43	868.8	615.1	54.2
<i>V.dahliae</i>	888.8	634.5	51.1
	NS *	NS	NS

* NS: not significant according to ANOVA *F*-test.

考察

V. dahliae は数多くの植物に萎凋、萎縮、枯死などを引き起こす多犯性の病原菌として知られている(原田ら、1997)。トマトやナスの半身萎ちょう病に関する報告は数多くあり(飯嶋、1983; 橋本、1989)、本研究室では *V. lectanii* と *Bacillus* 属菌を用いた *V. dahliae* に対する拮抗性試験において、生育を抑制する効果を示し、なおかつポット試験においてトマト半身萎ちょう病の発病を抑制することがわかっている(Koike et al., 2004)。

分生孢子懸濁液を処理したポット試験では、全ての *V. lectanii* 菌株処理区で病原菌単独処理区と比較して発病を有意に抑制しており、特にB-2が高い防除効果を示した。しかし、土壌フスマ培地を処理したポット試験では、全体重量・根重量共に病原菌単独処理区と *V.*

lectanii 処理区との間に有意な差はなく、病徴抑制効果ではC-1のみ有意な差が認められた。この2つの試験における防除効果の違いは、2回目の温室試験で、ポリポット半分は圃場の *V. dahliae* 病原菌汚染土を詰めたにも関わらず、さらに5%濃度の *V. dahliae* 病原菌汚染土を加えた上で試験を行ったことにより、*V. dahliae* の濃度が高くなりすぎたためと考えられる。しかしながら、2回の温室試験で全ての *V. lectanii* 菌株は病原菌単独処理よりも発病・病徴を抑制し、全体重量・根重量が優っていたことから防除効果が確認された。

3回目のポット試験では全ての *V. lectanii* 菌株処理区で病原菌単独処理区と比較して発病を有意に抑制していたことから、ポットの底に菌を接種しても根腐れを起こすことなく、発病を抑制することが確認された。よって、発芽後に茎のまわりに菌を接種するのではなく、あらかじめ底に菌接種するというより容易な接種方法

昆虫寄生菌 *Verticillium lecanii* (*Lecanicillium* spp.) によるダイコンパーティシリウム黒点病の生物防除が可能であり、資材化に向けて有効であると考えられる。らの検討が必要ではあるが、本研究から *V. lecanii* の生物防除資材としての潜在能力を確認すると共に、植物病原菌 (*V. dahliae*) に対する防除資材としての実用化に向けて、*V. lecanii* は有望であると考えられる。

一方、圃場においては B-2、C-1 の各菌株処理区間での区画ごとのバラつきは少なかったが、その他の菌株でバラつきが多かったため、病原菌単独処理区と比較して防除効果の有意な差は認められなかった。ばらつきが多かったのは、圃場内で *V. dahliae* 濃度が異なっていた可能性があると考えられる。その結果として、北から 3・4 ベッド目は全体の発病率が高く、各菌株間のばらつきが大きくなった。またその他の理由としては、圃場の土壌中における多くの細菌や菌類などの微生物、地上部における多くの微生物や昆虫などの様々な生物が関係し、それらが作用した区画としていない区画での差によるものと考えられる。圃場での病気による作物の損害は 1 つの病原体のみでなく、いくつかの組み合わせで引き起こされることが多く (Sherf et al., 1986)、今回の試験ではダイコンの軟腐病と併発しているダイコンが多く確認された。また、実験室または室内試験での効果が圃場ではほとんど発揮されず、実用性が認められない現状にあるのは投入された微生物が土壌中で安定しないためと考えられている (木嶋ら、1988)。しかしながらデータのばらつきが大きかった菌株があったものの、明らかに発病を抑制している菌株もあったことから、よりよい菌株を選抜し、*V. lecanii* の土壌中での安定化をはかることで生物防除資材と成り得る可能性は十分にあると考えられる。今後はダイコンの根面、根内、そして根圏への定着性試験など資材化に向けてより多面的な研究が必要であろう。

V. lecanii は土壌中においても十分に生存できると報告されている (Beyer et al., 1997)。本論文の全ての試験を通して、*V. lecanii* の土壌接種で発病・病徴抑制効果が確認された。各試験で最も防除効果のある *V. lecanii* 菌株は異なり、一概に特定の菌株がダイコンパーティシリウム黒点病を防除するのに最も効果的であると断定することはできない。しかし、*V. lecanii* 菌株間での差は圃場試験での発病株率以外は少なく、全ての *V. lecanii* 菌株において本病抑制効果傾向が確認されたことから *V. lecanii* はダイコンパーティシリウム黒点病に対する防除資材としての可能性を秘めていることが示唆される。今後、圃場での *V. lecanii* 適応能力の強化や防除効果の向上に対する研究など、多方面か

引用文献

- Aiuchi, D., Koike, M., Tani, M., Kuramochi, K., Sugimoto, M. and Nagao, H. (2004) Protoplast fusion, using nitrate non-utilizing (nit) mutants in the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* (*Lecanicillium* spp.). IOBC/wprs Bull. 27 (8):127-130
- Barranco, J. E., Alatorre, R., Gutierrez, M., Viniegra, G. and Saucedo, G. (2002) Criteria for the selection of strains of entomopathogenic fungi *Verticillium lecanii* for solid state cultivation. Enzyme and Microbial Technology 30:910-915
- Beyer, P. U., Hirte, W. F. and Sermann, H. (1997) The behavior of entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas in soil, I. Viability in soil at different ecological conditions. Plant Dis. Protec. 104(1):65-74
- Dong, .Z., Zhang, X. K., Choen, Y., Zhou, Y., Li, W. J. and Li, Z. H. (2006) Dry mycelium of *Penicillium chrysogenum* protects cotton plants against wilt disease and increase yield under field conditions. Crop Protec. (in press)
- Hall, R. A. (1984) Epizootic potential for aphids of different isolates of the fungus *Verticillium lecanii*. Entomophaga 29:311-321
- 原田幸雄・古枝知也・村田和俊 (1997) *Verticillium dahliae* Klebahn によるシナノキおよびヤマモミジの半身萎凋病 (新称) について 日植病報 63:345-350
- 橋本光司 (1989) ナス半身萎ちよう病に関する研究 埼玉園試特別研報 2:11-29
- 東尾俊基・小池正徳・杉本みどり・檜山直美・秋川寛典・長尾英幸 (2002) *Verticillium lecanii* の葉面定着能力 日植病報 68:202-203

- 飯嶋勉 (1983) トマト半身萎ちょう病に関する研究 東京農試研報 16 : 63-128
- 勝部和則・赤坂安盛 (1997) 非病原性 *Fusarium oxysporum* 利用によるハウレンソウ萎ちょう病の防除 日植病報 63 : 389-394
- Karagiannidis, N., Bletsos, F. and Stavropoulos, N. L. (2002) Effect of *Verticillium dahliae* (Kleb.) and mycorrhiza (*Glomus mosseae*) on root colonization, growth and nutrient uptake in tomato and eggplant seedlings. Sci. Horticult. 94 : 145-156
- Kawai, A., Kusunoki, K., Aiuchi, D., Koike, M., Tani, M. and Kuramochi, K. (2006) Biological control of *Verticillium* black spot of Japanese radish using *Bacillus* spp. and genotypic differentiation of selected antifungal *Bacillus* strains with antibiotic marker. Res. Bull. Obihiro Univ. (27:49~58)
- 木嶋利男・天谷正行・郷間秀夫・米内貞夫・大橋一夫・生井潔・須永哲央・小栗尚子・橋田弘一・熊田鉄丈・小林光子 (1995) 組織内共生微生物を用いた生育及び病害の制御 栃木県農試研報 43 : 47-86
- 木嶋利夫・有江力・木村栄・峯岸長利・手塚紳浩・橋田弘一・福田充 (1988) 抗菌微生物の利用に関する研究 栃木県農試研報 35 : 95-128
- 北沢健治・鈴井孝仁 (1980) *Verticillium dahliae* Klebahn による各種作物の半身萎ちょう病 日植病報 46 : 267-270
- Koike, M., Higasio, T., Komori, A., Akiyama, K., Kishimoto, N., Masuda, E., Sasaki, M., Yoshida, S., Tani, M., Kuramochi, K., Sugimoto, M. and Nagao, H. (2004) *Verticillium lecanii* (*Lecanicillium* spp.) as epiphyte and its application to biological control of arthropod pests and diseases. IOBC/wprs Bull. 27(8):41-44
- 小松 勉・角野晶大・北畠国昭・柳山浩之 (2001a) ダイコンバーティシリウム黒点病に対するダズメット粉粒剤の防除効果 (3) 根雪前無被覆処理の効果 北日本病虫研報 52 : 53-55
- 小松 勉・角野晶大・北畠国昭・柳山浩之 (2001b) ダイコンバーティシリウム黒点病に対するダズメット粉粒剤の防除効果 (4) マルチ畦内処理と抵抗性品種の組み合わせ効果 北日本病虫研報 52 : 56-58
- 森田儔 (1983) 花きのバーティシリウム病 植物防疫 37 : 117-120
- Sherf, A. F and MacNab, A. A. (1986) Vegetable Diseases and Their Control. Wiley, New York 728pp
- Steventon, L. A., Okori, P., Dixelius, C. (2001) An Investigation of the Susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to Isolates of Two Species of *Verticillium*. J. Phytopathol. 149:395-401
- Sugimoto, M., Koike, M., Hiyama, N. and Nagao, H. (2003) Genetic, morphological, and virulence characterization of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*. J. Invertebr. Pathol. 82:176-87.
- 角野晶大・北畠国昭・柳山浩之・田中民夫・佐々木高行 (2001a) ダイコンバーティシリウム黒点病に対するダズメット粉粒剤の防除効果 (1) 処理量と処理深度 北日本病虫研報 52 : 45-48
- 角野晶大・北畠国昭・佐々木高行・柳山浩之・小松 勉・田中民夫 (2001b) ダイコンバーティシリウム黒点病に対するダズメット粉粒剤の防除効果 (2) 三重ポリエチレンフィルムを用いたマルチ畦内処理 北日本病虫研報 52 : 49-52
- Tjamos, E. C., Tsitsigiannis, D. I. and Tjamos, S. E. and Antoniou, P. P. (2004) Selection and screening of endorhizosphere bacteria from solarized soils as biocontrol agents against *Verticillium dahliae* of solanaceous hosts. Plant Pathol. 110:35-44
- Verhaar, M. A., Hijwegen, T. and Zadoks, J. C. (1996) Glasshouse experiments on biocontrol of cucumber powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*) by the mycoparasites *Verticillium lecanii* and *Sporothrix rugulosa*. Biol. Cont. 6:353-360

ABSTRACT

Seven strains of *Verticillium lecanii* were tested for their capacity to control *Verticillium* black-spot of Japanese radish caused by *Verticillium dahliae* under greenhouse condition and *V. dahliae* infested field. The effect of disease suppression and symptoms suppression with *V. lecanii* were investigated. In first greenhouse test, Japanese radish plant inoculated with *V. lecanii* conidia showed significant decrease in disease severity compared to those of *V. dahliae* inoculated control plant. Especially, the highest protection resulted with B-2, which gave 31.4% protected efficiency. In second greenhouse test using *V. lecanii* grown in wheat bran media, C-1 was more effective than other fungal treatments in reducing the disease severity. In field test, the protective effect of B-2 and C-1 were even greater than no treatment. Although A-2 was irregular in blocks, it showed a tendency to decrease in disease severity. These results suggest that *V. lecanii* has a greater potential as biocontrol agents against *Verticillium* black spot of Japanese radish.

Keywords; black spot of Japanese radish, *Verticillium dahliae*, *Verticillium lecanii*

Biological control of *Verticillium* black spot of Japanese radish using *Bacillus* spp. and genotypic differentiation of selected antifungal *Bacillus* strains with antibiotic marker

Ayako Kawai^{1,2)}, Kaori Kusunoki¹⁾, Daigo Aiuchi^{1,3)}, Masanori Koike^{1)*}, Masayuki Tani¹⁾ and Katsuhisa Kuramochi¹⁾

(Received: April 28, 2006)

Bacillus 属菌によるダイコン黒点病の生物防除と抗生物質耐性マーカーを付与した分離菌の遺伝的特徴
川井彩子^{1,2)}、楠木 芳¹⁾、相内大吾^{1,3)}、小池正徳^{1)*}、谷 昌幸¹⁾、倉持勝久¹⁾

ABSTRACT

Bacillus species can form endospores and have broad-spectrum activity of their antibiotics. For that reason, they offer several advantages over other bacteria for protection against root pathogens. This work was intended to determine the ability of *Bacillus* spp. to inhibit *Verticillium dahliae*. First, antagonistic activities of *Bacillus* spp. were studied in greenhouse trials. These results suggest that the bacterium can control soil-borne diseases. Secondly, to investigate the situation in a culture environment, *Bacillus* spp. were examined for their activity to control *Verticillium* black spot of Japanese radish and plant-growth promotion rhizobacteria (PGPR) effects in a field. After 2 months, these bacteria reduced *Verticillium* black spot of Japanese radish. The disease severity of those Biological Control Agent (BCA) treatments was less than in the pathogen control treatment. Furthermore, the plants treated with KB-3 showed the best PGPR effect. Field conditions show that *Bacillus* spp. isolate KB-2, KB-3 is a potential BCA against *V. dahliae*.

Subsequently, to select bacteria that are able to more control disease and more colonize in the plants and which facilitate recovery from soil and plants, *Bacillus* spp. were isolated from roots and were made resistant to ampicillin using UV irradiation. In all, 17 ampicillin-resistant mutants were tested for inhibition *V. dahliae* and *F. oxysporum* *in vitro*. Five bacteria isolates displayed inhibitory effects on FOM. All bacteria isolates indicated high antibiotic activity on *V. dahliae*. Then, to investigate the molecular characterization of all isolated strains of *Bacillus* spp., PCR amplification of the 16S-23S rDNA intergenic transcribed spacer (ITS-PCR), restriction fragment length polymorphism of the ITS-PCR (ITS-PCR RFLP), and enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR (ERIC-PCR) were conducted. The ITS-PCR and ITS-PCR RFLP results suggest that KB-1 and strains of isolated from KB-1 were identical. Furthermore, those of the strains of KB-2 were also identical. However, KB-3 and all strains of isolates from KB-3 were different by ITS-PCR RFLP. Results suggest that the strains of isolates from KB-3 resembled those of KB-2. Using ERIC-PCR, 20 strains of *Bacillus* spp. could be distinguished.

Keywords: *Bacillus* spp., Biological control, *Verticillium* black spot of Japanese radish, *Verticillium dahliae*

INTRODUCTION

Japanese radishes (*Raphanus sativus* L. var. *longipinnatus* L.H.Bailey) are important products of Hokkaido, Japan because that area's cool climate is amenable to their production. However, soil-borne diseases occur often as a result of this characteristic regional feature. *Verticillium* black spot of Japanese radish by *Verticillium dahliae* causes yield losses in Japanese radishes in Hokkaido, especially in its occurrence was reported for the first time (Kitazawa and Suzui, 1980). Once Japanese radishes are infected, external symptoms are slight, but black lesions occur in the vascular system and root qualities are reduced considerably. *V. dahliae* is a commonly reported soil-borne fungal pathogen

infecting several crops (Alstrom, 2001; Mercado-Blanco et al., 2004; Garmendia et al., 2004; Tjamos et al., 2004; Tahmatsidou et al., 2005). The pathogen can survive for 14 years or more in soil as microsclerotia, which are small, multicellular and melanized structures (Soesanto et al., 2001). Microsclerotia of *V. dahliae* that develop in senescing tissues of the dead plant might persist in soil for several years. Therefore, chemical control is nearly impossible (Berg et al., 2001). For that reason, it is difficult to control this soil-borne plant pathogen. Application of agrichemicals and use of resistant cultivars have been developed to control soil-borne pathogens. However, harmful effects to the environment and humans

¹ Department of Agro-environmental Science, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine

1 帯広畜産大学畜産学部 環境総合科学講座

² Laboratory of Environmental Mycosecience, Graduate School of Agriculture, Kyoto University

2 京都大学大学院農学研究科 環境微生物制御学研究室

³ The United Graduate School of Agricultural Science, Iwate University

3 岩手大学大学院連合農学研究科 生物制御学講座

* Corresponding to Masanori Koike (e-mail: koike@obihiro.ac.jp)

might result from those countermeasures. For that reason, soil disinfestation by steaming or fumigation is often used to control diseases on several crops. Methyl bromide, the most widespread soil fumigant, was banned in 2005 because it was detected in high concentrations in the earth's stratosphere (Noling, 2002). Consequently, an urgent need exists to develop ecologically compatible alternative methods. Some methods, such as soil solarization, irrigation (Katan, 1996), and crop rotation (LaMondia et al., 2002) are culture methods that are used for management. In addition, biological control is the active object of study in this field (Whipps, 2001; Emmert et al., 1999).

As biological control agents (BCAs), *Bacillus* species offer great potential benefits because of their ability to form endospores and because of the broad-spectrum activity of their antibiotics. Endospores have suitable features for use as BCA for structures that are capable of surviving desiccation, heat, oxidizing agents, and UV and γ radiation (Setlow, 1995; Nicholson, 2002). These characteristics allow for long-term storage and easy commercialization (Brannen and Kenny, 1997). *Bacillus* spp. produce a broad range of antibiotic compounds that are inhibitory to many plant pathogens (Silo-suh et al., 1994). Because antibiotics are produced from *Bacillus*, iturin A is widely known for its strong antifungal activity. It is a valuable antifungal agent that is known for its broad spectrum and low toxicity (Grau et al., 2001); surfactin is well known as a potent surface-active agent and as an antibiotic (Hiraoka et al., 1992). Furthermore, the species of *Bacillus* as plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) are beneficial native soil bacteria that colonize plant roots and engender improved plant growth (Kokalis-Burelle et al., 2006). Therefore, isolates of *Bacillus* have shown the capacity to control various plant diseases, e.g., damping-off of alfalfa seedlings (Handelsman et al., 1990), sugar beet cercospora leaf spot (Collins and Jacobsen, 2003), mummy berry disease (Scherm et al., 2004), and gray mould disease (Toure et al., 2004).

The first objective of this work was to evaluate the effect of *Bacillus* spp. as BCA in the control of Verticillium black spot in the greenhouse and in the field.

A greenhouse experiment was conducted in 2005 to evaluate antagonistic activity of *Bacillus* spp. to *V. dahliae* (unpublished data). Eggplants were used as the object plant. Results of this study show that some plants were diseased, but others exhibited controlled disease. *Bacilli* that more controlled disease and more colonized plants were selected: endophytic bacteria were isolated from roots of plants that controlled disease exceptionally. This endophytic relationship between the antagonistic bacterium and fungus and the plants suggests possibilities for biological control (Wagner and Lewis, 2000; Cao et al., 2005). In many studies that were conducted, endophytic bacteria were considered as candidate BCAs. Nejad and Johnson (2000) showed that suppressing vascular wilt diseases is possible and can involve induced resistance to soil-borne pathogens.

Study of the diversity of antifungal rhizobacteria using fingerprint techniques is important not only useful for

elucidating their ecological role in the rhizosphere, but also for characterization of biological control agents for (i) registration and patenting biological control strains, (ii) recognizing the strains, (iii) quality checking during production, and (iv) ecological characterization (Lemanceau et al., 1995; Marten et al., 2000). Therefore, ITS-PCR and ITS-PCR RFLP methods were used to study whether the strains of isolates were *Bacillus* spp. Furthermore, genotypic diversity among the isolates was characterized by molecular fingerprinting methods using ERIC-PCR. It has been applied for typing of various *Bacillus* strains and *B. subtilis* (Shangkuan et al., 2000).

The secondary objectives of this work were (i) to select endophytic bacteria from roots and to evaluate their antagonistic activity to soil-borne plant pathogens (ii) to study genotypic differentiation of isolated *Bacillus* spp.

MATERIALS AND METHODS

2.1 Biological control of Verticillium black spot of Japanese radish

2.1.1 Microbial cultures

Plant pathogenic *V. dahliae* Kleb. (TS-21) obtained from an infected Japanese radish at Memuro in Hokkaido were used. The pathogenic fungi were cultured in darkness at 25°C for two weeks on PDA plates. These strains were then grown in moist gardening soil and wheat bran (4:1,w/w) for two weeks.

Three strains of *Bacillus* spp. were provided by Kiyomoto Bio. Co. Ltd.: *Bacillus subtilis* (KB-1), *Bacillus subtilis* (KB-2), *Bacillus vallismortis* (KB-3). One commercial preparation was stored at potato dextrose agar (PDA) slants at 4°C. For use, the bacteria were grown in darkness at 25°C for 7 days on a No. 802 (10 g polypepton, 2 g yeast extract, 1 g MgSO \cdot 7H $_2$ O, 15 g agar, per liter) plate. For application, the bacterial inocula were grown in No. 802, except agar, using a rotary incubator (37°C, 24 h, 390 rpm). Later, the bacteria were cultured in wheat bran media and 5% molasses water (1:1, w/w) for 14 days; then they were dried completely in a tray (ca. 1×10^8 CFU/ml).

2.1.2 Greenhouse experiment 1.

First, three *Bacillus* strains (KB-1, KB-2, KB-3) were evaluated for control of *V. dahliae* performing with Japanese radish (*Raphanus sativus* L. var. *longipinnatus* L.H.Bailey) cv. "TAKAMIYA", susceptible to *V. dahliae*, under greenhouse conditions. One seed was sown in a jiffy pot (6 cm diameter; Sakata Seed Co.) filled with culture soil, then five pots were placed on a plastic tray. After seven days, 1 g of each *Bacillus* spp., which was cultured as described above, was inoculated around the plant stem. Four days later, 100 g of soil containing *V. dahliae* (5%) was put in a plastic tray. No-bacteria inoculation plots and non-treated antagonist and soilborne fungi plots were prepared as controls. The experiment was repeated three

Biological control of Verticillium black spot with *Bacillus* spp.

times. The disease rate, expressed as a percentage of diseased leaves over the total number of leaves per plant, was observed for 30 days after *V. dahliae* inoculation.

2.1.3 Greenhouse experiment 2.

Plants were grown until germination in jiffy pots filled with culture soil. Each isolate of *Bacillus* was inoculated as described in 2.1.2. After six days, three jiffy pots were transplanted to 21 cm pots containing soil from a polluted field at the bottom of the pot and soil containing *V. dahliae* (5%) on the top. Non-inoculated plants and soil served as controls. These plants were grown for 60 days in a greenhouse. Afterwards, disease symptoms were assigned rankings according to a six-grade evaluation system. Fresh plant weight and fresh root weight were measured to evaluate plant promotion effects.

2.1.4 Field experiments

For evaluating plant disease suppression, three bacterial strains were tested in field experiments. The method of bacterial inoculation was 1 g of each *Bacillus* put on the bottom in a jiffy pot and filled with gardening soil. Two seeds were then planted and at once transplanted in the field. After germination, buds were thinned.

The experimental design was a complete randomized block with five replications for each bacterium. A field of about 19 m × 12 m consisted of nine ridges. A ridge of about 10 m × 1 m included six plots. Each plot was 50 cm wide and 3 m long; 15 Japanese radish seedlings were planted in each jiffy pot transplanted in plots at intervals of 20 cm. Planting was done on 26 July and harvesting on 9 September 2005.

At harvest, the incidence of naturally occurring disease in the field was observed. Furthermore, the attack rate was assessed: Disease incidence index (%) = (number of disease individuals) / (number of all individuals) × 100. Plant growth measurements including the total and root weight were taken at harvest. In addition, commercialization of Japanese radish was estimated.

2.2 Isolation of bacterial antagonists

2.2.1 Isolation of endophytic bacteria from plant

To select bacteria that are better able to colonize in plant tissues and better control diseases, *Bacillus* spp. were isolated from internal tissues of eggplant roots. The plants had been used for evaluating antagonistic activity to *V. dahliae* in another experiment the previous year (unpublished data). Plants that indicated a high control effect were selected.

The bacteria were disinfected individually by soaking each in 70% ethanol for 1–2 min, followed by immersion in 5% sodium hypochlorite for 20–30 min. They were then rinsed three times in sterile distilled water and dried in hard filter paper. Finally, they were put on PDA and No. 802 and incubated in darkness at 25°C. If a colony appeared colony, it was purified on No. 802 and judged as *Bacillus* or not by

their appearance.

2.2.2 Selection of ampicillin resistant *Bacillus* strains

A key to progress in the field of biological control to protect plants against soil-borne pathogens is to understand the interaction between biological control agents and pathogens in the rhizosphere. Isolates of bacteria were varied with UV irradiation and selected an ampicillin-resistant mutants to facilitate recovery from soil and plants. Ampicillin-resistant mutants of each strain were generated using the method described by Bacon and Hinton (2002).

A collection of 20 bacterial isolates (strains of origin to KB-1 were 7, KB-2 were 9, KB-3 were 4) were cultured on No. 802, except agar, in a shaking incubator for one day. All bacterial isolates were irradiated under UV light for 30 s, 1 min, and 2 min; they were subsequently applied on No. 802 supplemented with 50 µg/l of ampicillin at 37°C for one day in an incubator. The experiment was replicated five times. Therefore, ampicillin resistant bacterium were obtained and cultured on No. 802 supplemented with 100 µg/l of antibiotic. Thereby, 17 isolates of bacterial strains were recovered. The isolates comprise 10 strains of origin to KB-1 (1-A, 1-B, 1-C, 1-D, 1-E, 1-F, 1-G, 1-H, 1-I, 1-J), 4 strains of origin to KB-2 (2-A, 2-B, 2-C, 2-D), and 3 strains of origin to KB-3 (3-A, 3-B, 3-C).

2.2.3 *In-vitro* inhibition of phytopathogenic fungal mycelial growth by *Bacillus* spp.

A collection of 17 bacterial isolates was used for evaluation of *in-vitro* antagonistic activity against *V. dahliae* and *Fusarium oxysporum* on PDA. In this study, *F. oxysporum* f. sp. *melonis* (FOM) (race 0) was used.

All *Bacillus* strains were increased on No. 802, except agar, using a shaking incubator (37°C, 24 h, 390 rpm). After incubation, a suspension of *Bacillus* spp. was dropped on PDA and agar discs of *V. dahliae* or *F. oxysporum* placed on identical plates at 3 cm intervals. Zones of inhibition were measured after one week (FOM) or three weeks (*V. dahliae*). The trial was replicated three times.

To evaluate spore germination suppression, 17 isolates of *Bacillus* spp. were dual cultured with soil-borne pathogens. *Bacillus* spp. was cultured as described above. The *V. dahliae* and *F. oxysporum* were cultured in PDB for 2 weeks and adjusted to 1 × 10⁶ spores/ml using a hemacytometer. Then, 0.2 ml of suspension was spread on PDA and cultures of six isolates of *Bacillus* spp. were dropped in a circle. Inhibition zones were measured after 7 days' incubation at 25°C. This trial was replicated five times.

2.3 Genotypic differentiation of *Bacillus* spp.

2.3.1 DNA extraction

Three strains of *Bacillus* and 17 isolates of ampicillin-resistant mutants were cultured as described

above. Then, 1.0 ml of bacterial suspensions was centrifuged at 4000 g for 5 min and the supernatant was removed. Cell pellets were resuspended in 0.5 ml of sterile distilled water and boiled for 15 min. After centrifugation at 3500 g for 3 min, 1 µl of supernatant fluid was used as template DNA in PCR assay (Li and Mustapha, 2002).

2.3.2 16S-23S rDNA ITS-PCR

Amplification of the 16S-23S ITS region was carried out as described by Ouoba et al. (2004): 25 µl of the reaction mixture containing 1 µl of DNA template, 2.5 µl of 10× PCR buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂ and 0.01% gelatin), 0.5 µl of dNTPs (10 mM dATP, 10 mM dCTP, 10 mM dGTP, 10 mM dTTP), 1 µl of the forward primer 16S-1500F (50 pmol/µl) (5'-AA G TC GTA ACA AGG AA-3'), 1 µl of the reverse primer 23S-32R (50 pmol/µl) (5'-GCC ARG GCA TGG ACC-3'), 0.25 units of Taq polymerase (Sigma Genosys Japan Inc., Japan), and 18.75 µl of autoclaved Milli-Q water were used. Negative controls (no DNA template) were included in each trial to clarify that no contamination by DNA or reagents occurred.

The cycling program was started with an initial denaturation at 94°C for 5 min followed by 10 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 48°C for 30 s, and elongation at 72°C for 30 s. Then, we performed 25 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 55°C for 30 s and elongation at 72°C for 30 s. The PCR was ended with a final extension at 72°C for 7 min. The amplified product was cooled at 4°C using a thermal cycler (iCycler; Bio-Rad Laboratories Inc., CA, USA).

To visualize the DNA fingerprint, 3 µl of amplification products were separated by electrophoresis in 2.0% agarose-TBE gels in 2 h 20 min at 50 V and visualized after staining with ethidium bromide under UV.

2.3.3 16S-23S rDNA ITS-PCR-RFLP

ITS-PCR-RFLP analyses were also performed as described by Ouoba et al. (2004). Each 5 µl of PCR product was digested for 16 h at 65°C by mixing 1 µl of NE buffer for Taq (10×), 1 µl of bovine serum albumin (BSA 100×), and 0.38 µl of Taq (TaKaRa Holdings Inc., Japan). The final volume was adjusted to 10 µl using sterile water. The DNA fragments were separated by applying 4.5 µl of each PCR product with 1 µl of loading buffer to 3% agarose gel for 4 h at 35 V. A 100 b DNA ladder (Takara) was used as a molecular size marker. The gel was soaked in ethidium bromide solution and DNA was visualized under UV light.

2.3.4 ERIC-PCR

To distinguish among all strains of *Bacillus*, ERIC-PCR was carried out using the ERIC1R primer (5'-ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C-3') using methods described by Versalovic et al. (1991). The reaction mixture (25 µl volume) contained 2.5U of Taq polymerase, 2.5 µl of PCR buffer (10×), 0.5 µl of dNTPs, 1 µl of single primer, and Milli-Q water. We included negative control of

contaminants in the reagents and reaction mixture. Amplification was performed using a thermal cycler with temperature ramping as follows: 95°C for 3 min to denature the template; 40 cycles of 94°C for 1 min, 50°C for 1 min, and 72°C for 2 min; and final incubation at 72°C for 10 min. Finally, 3 µl of amplification products with 1 µl of loading buffer were separated using agarose gel electrophoresis in 2.0% agarose gels in 2 h 20 min, and visualized using UV light.

RESULTS

3.1 Greenhouse experiment

The first experiment in the greenhouse showed the suppressive effect of three isolates of *Bacillus* on *Verticillium* black spot caused by *V. dahliae*, as shown in Fig. 1. All bacteria strains exhibited restrained disease incidence; three isolates of *Bacillus* and *V. dahliae* control showed statistically significant differences. Of them, KB-3 was the most efficient, by approximately 30%, in reducing disease severity in *V. dahliae*-inoculated plants.

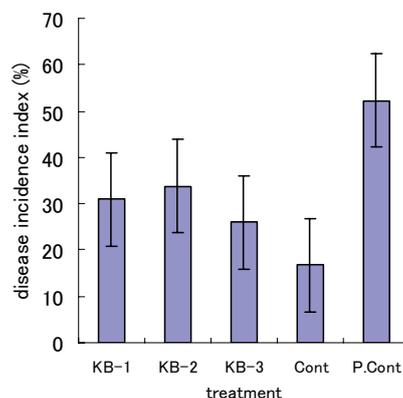


Fig. 1. Effect of *Bacillus* spp. in controlling *Verticillium* black spot under first greenhouse condition. Vertical bar indicates S.D.

Table 1. Comparisons of efficacy of biological control agents in control of *V. dahliae*, fresh plant weight and fresh root weight under second greenhouse conditions.

Treatment	DS (0-5)*	Fresh plant weight (g/plant)	Fresh root weight (g/plant)
KB-1	3.1a	53.6a	12.6a
KB-2	3.7a	61.6ab	19.1ab
KB-3	2.9a	59.2a	16.7a
<i>V. dahliae</i>	3.9a	56.8a	14.3a
control	0b	89.4b	33.3b

Means designated with the same letter are not significantly different as determined using Scheffe's F test ($P < 0.05$).

*Scale 0–5 where: 0, healthy root; 1, about 20% of roots infected; 2, about 40% of roots infected; 3, about 60% of roots infected; 4, about 80% of roots infected; 5, 100% infected

In the second greenhouse study, three strains of *Bacillus* inoculation reduced disease symptoms in comparison with the untreated control (Table 1). Lesions on Japanese radishes treated with *Bacillus* spp. were smaller and less severe than those of Japanese radishes that had been treated

Biological control of *Verticillium* black spot with *Bacillus* spp.

with *V. dahliae* alone. Superior disease control was obtained when KB-3 was applied. Furthermore, KB-2 and KB-3 inoculation increased plant flesh weight and plant root weight compared with the untreated control (Table 1). However, no treatments showed statistically significant differences.

3.2 Biocontrol of *Verticillium* black spot under field conditions

Three strains of *Bacillus* reduced disease incidence in the field experiment after 2 months (Fig. 2). Especially, KB-2 was the most effective against *Verticillium* black spot in three strains of bacteria. This strain showed 19% protection efficiency. Furthermore, KB-1 and KB-3 also showed suppressive effects against *V. dahliae*. These results suggest that these strains of *Bacillus* offer the potential for use as BCAs against soil-borne plant pathogens. However, no treatments showed statistically significant differences.

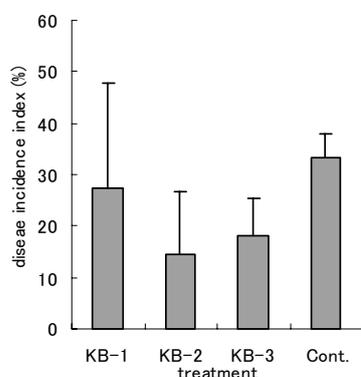


Fig. 2. Efficacy of three isolates of *Bacillus* in control of *Verticillium* black spot in a field experiment. Vertical bar indicated S.D.

Table 2. Efficacy of biological control agents in fresh plant weight, fresh root weight and commercialization rate.

Treatment	Fresh plant weight (g/plant)	Fresh root weight (g/plant)	Commercialization rate (%)
KB-1	883.3	561.8	51.4
KB-2	880.2	599.7	57.3
KB-3	946.0	649.8	64.2
<i>Verticillium</i>	888.8	634.5	52.0

Effects of antagonistic treatment on plant fresh weight, root fresh weight, and the commercialization rate of Japanese radish are listed in Table 2. Results of KB-3 inoculation suggest that it presents the possibility for PGPR. However, no significant difference from the control treatment was found in any treatments of *Bacillus* spp. inoculation.

3.3 PCR analysis

To classify the isolates, ITS-PCR and ITS-PCR RFLP were used. Using ITS-PCR, KB-1 and 10 strains of isolates from KB-1 were characterized by two bands of 456 and 282 bp (Fig. 3). Of those, 1-I and 1-J showed a slight difference from two additional bands, but it was not always reproducible. Three strains of isolates from KB-2 were characterized respectively by three bands of 456, 342 and 282 bp (Fig. 4). Also, KB-2 showed only a band of 282 bp, but in another experiment, other bands appeared (data not shown). Three others, KB-3, 3-A and 3-B, were characterized by three bands as well as the strains of isolates from KB-2 (Fig. 4). Also, 3-C showed only a band of 282 bp, but in another experiment, the remaining two bands appeared (data not shown). Using ITS-PCR RFLP (Fig. 5) KB-2, 2-A, 2-B and 2-D showed four bands of 339, 233, 159 and 154 bp. In addition, 3-A and 3-C showed the same bands as strains of KB-2, but KB-3 showed four bands of 275, 233, 159 and 154 bp. The strains of isolates from KB-1 showed 233, 159 and 154 bp (Fig. 6). However, another band was not clearly evident despite repeated attempts.

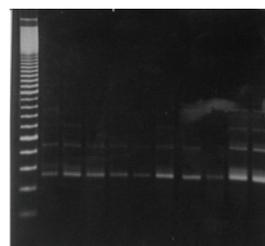


Fig. 3. Agarose gel of ITS-PCR products of strains selected from KB-1. Lanes 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10: KB-1, 1-A, 1-B, 1-C, 1-D, 1-E, 1-G, 1-H, 1-I, 1-J, respectively. Lane m, 100 bp DNA ladder



Fig. 4. Agarose gel of ITS-PCR products of isolates of *Bacillus*. Lanes 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9: KB-2, 2-A, 2-B, 2-D, KB-3, 3-A, 3-B, 3-C, 1-F, respectively. Lanes m, 100 bp DNA ladder

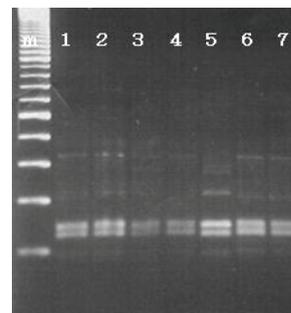


Fig. 5. Agarose gel of ITS-PCR RFLP products of strains of isolates from KB-2 and KB-3. Lanes 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7: KB-2, 2-A, 2-B, 2-D, KB-3, 3-A, 3-C, respectively. Lanes m, DNA size marker

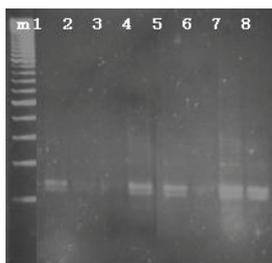


Fig. 6. Agarose gel of ITS-PCR RFLP products of strains of isolates from KB-1. Lanes 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8: 1-A, 1-C, 1-D, 1-E, 1-G, 1-H, 1-I, 1-J, respectively. Lanes m, 100 bp DNA ladder

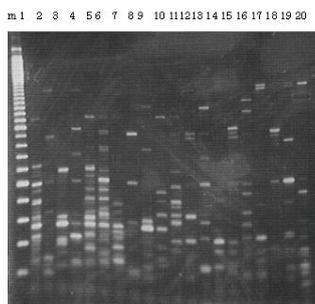


Fig. 7. ERIC-PCR genomic fingerprints of *Bacillus* spp. Lanes 1–20: KB-1, KB-2, KB-3, 1-A, 1-B, 1-C, 1-D, 1-F, 1-G, 1-H, 1-I, 1-J, 2-A, 2-B, 2-C, 2-D, 3-A, 3-B, 3-C. Lanes m, 100 bp DNA ladder.

All the ERIC-PCR types of 20 isolated *Bacillus* spp. were unique (Fig. 7). Several DNA band patterns were observed. Sequencing of the 16S rDNA allowed the identification at KB-1 and all strains of isolates from KB-1. Furthermore, KB-2 and all strains of isolates from KB-2 were also identified. However, KB-3 and two strains of isolates from KB-3 were shown to be different and similar to KB-2 by their ITS-PCR RFLP results.

3.4 Antagonistic activity of biocontrol agent against soil-borne pathogens *in vitro*

Table 3. Inhibitions of hyphae growth in *Fusarium oxysporum* by *Bacillus* spp.

Isolates	Inhibition	Isolates	Inhibition
KB-1 A	-	KB-1 J	+
B	+	KB-2 A	-
C	+	B	-
D	+	C	-
E	-	D	-
F	+		
G	-	KB-3 A	++
H	-	B	++
I	+	C	-

Size of inhibition zone: -, no inhibition zone; +, 0-2 mm; ++, 2-4 mm; +++, 4-6 mm; +++++, more than 6 mm

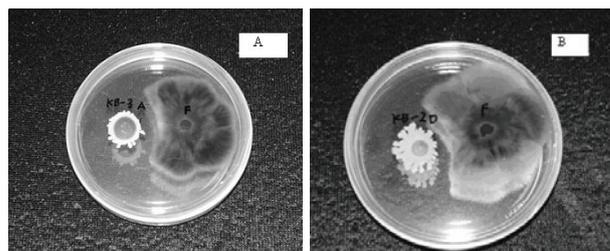


Fig. 8. Inhibition zone between *Bacillus* spp. (A, the strain of A was derived from KB-1, B, the strain of D was selected from KB-2) and *Fusarium oxysporum*.

F. oxysporum

Table 3 shows results of *in vitro* tests of antagonism toward *F. oxysporum*, a plant pathogen, using a dual culture technique on a PDA plate. The inhibition zone surrounding a colony of *Bacillus* spp. was identified clearly. The 13 isolates of 20 *Bacillus* spp. showed antifungal activity against *F. oxysporum*. The B • D strains were derived from KB-2; those of A • B • C that were derived from KB-3 inhibited the growth of FOM significantly (Fig. 8). In addition, a collection of eight bacterial strains was given the suppression of spore germination, and especially the strain of A • B derived from KB-3 displayed greatly inhibited spore germination (Table 4).

Table 4. Suppressions of *F. oxysporum* spore germination by *Bacillus* spp.

Isolates	Inhibition	Isolates	Inhibition
KB-1 A	+	KB-1 J	-
B	+	KB-2 A	-
C	+	B	+++
D	+	C	-
E	+	D	++++
F	+		
G	+	KB-3 A	++++
H	+	B	++++
I	-	C	++++

Sign meanings: -, no inhibition; +, inhibition; ++, clear inhibition

V. dahliae

All *Bacillus* strains suppressed *V. dahliae* growth significantly; inhibition zone diameters were greater than 6 mm (Table 5). Inhibition was considerable in the surrounding a colony of *Bacillus* spp. (Fig. 9). The 12 isolates of *Bacillus* spp. controlled spore germination in the pathogen. The F strain, derived from KB-1, and A, which was derived from KB-3, were more clearly suppressed to *V. dahliae* than other isolated bacteria (Table 6).

Biological control of *Verticillium* black spot with *Bacillus* spp.Table 5. Screening for antagonistic activity of *Bacillus* spp. to *V. dahliae*.

Isolates	Inhibition	Isolates	Inhibition
KB-1 A	++++	KB-1 J	++++
B	++++	KB-2 A	++++
C	++++	B	++++
D	++++	C	++++
E	++++	D	++++
F	++++		
G	++++	KB-3 A	++++
H	++++	B	++++
I	++++	C	++++

Size of inhibition zone: -, no inhibition; +, 0–2 mm; ++, 2–4 mm; +++, 4–6 mm; +++++, more than 6 mm

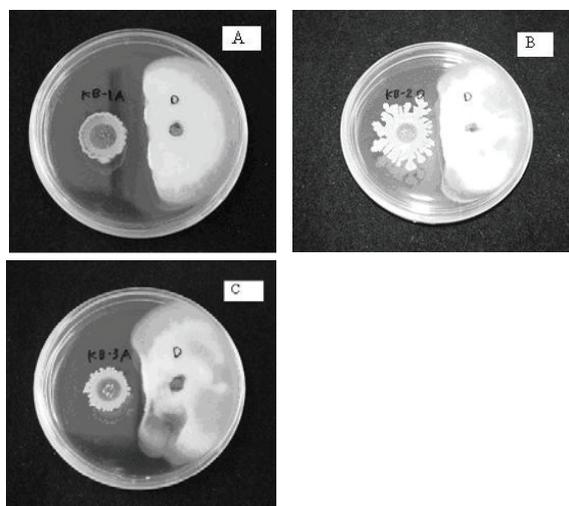


Fig. 9. Inhibition zone between *Bacillus* spp. (A, the strain of A was selected from KB-1; B, the strain of D was derived from KB-2; C, the strain of A was derived from KB-3) and *Verticillium dahliae*.

Table 6. Inhibitions of spore germination in *V. dahliae* by *Bacillus* spp.

Isolates	Inhibition	Isolates	Inhibition
KB-1 A	+	KB-1 J	+
B	+	KB-2 A	-
C	+	B	-
D	-	C	-
E	-	D	+
F	++		
G	+	KB-3 A	++
H	+	B	+
I	+	C	+

Sign meanings: -, no inhibition; +, inhibition; ++, clear inhibition

DISCUSSION

This paper reports the usefulness of three strains of *Bacillus* spp. of our laboratory for suppression of *Verticillium* black spot. Two greenhouse studies and a field study were conducted to analyze control effects.

In the first pot assay in a greenhouse, all isolates of *Bacillus* reduced leaf wilting significantly in comparison with *V. dahliae*-inoculated specimens. Three strains of bacteria that reduced symptom development reached 18–26% compared to treatments with no bacteria. Particularly, the *Bacillus* sp. isolate KB-3 suppressed diseases caused by all bacteria.

The second greenhouse experiment showed nearly healthy Japanese radish plants in bacterium-inoculated plots, but all plants in *V. dahliae* inoculated plots showed disease. *Bacillus* spp. showed suppression effects against *V. dahliae*, but the difference from control plants was not significant. We infer that the high density of the pathogen population used in this study caused this result. Despite that situation, KB-3 better suppressed disease occurrence by about 20% than pathogen inoculation. Because the goal was to control disease symptoms in plant roots, these results suggest that *Bacillus* can colonize in roots and suppress *V. dahliae*. Several works indicate that colonization behavior of BCA is related to modes of disease suppression (Islam et al., 2005).

These results indicated that three strains of *Bacillus* spp. present the possibility for control soil-borne plant pathogens. Other works report that *Bacillus subtilis* were able to suppress wilt diseases of maize (Cavaglieri, 2005) and damping-off of tomato and cucumber (Kita et al., 2005). In addition, the ability of PGPR in growth promotion and resistance induction in various crops is well known and many studies have been conducted (Guo et al., 2004; Ji et al., 2006). Therefore, *Bacillus* spp. are adequate bacteria for commercialization as BCA. The experiment was conducted in a field that resembles that of an agricultural system to reflect this method's potential use for commercialization.

In the field trial, reduction in symptom development of 18.6% was achieved by inoculating KB-2 and 15.3% by KB-3 compared to untreated controls under *V. dahliae* polluted soil. However not all strains of bacteria significantly suppressed soil-borne plant pathogens. Moreover, disease suppression and PGPR effects in the field were not as marked as those observed in the greenhouse. Because of environmental stresses and various populations of soil-inhabiting fungi, it might be difficult to study these phenomena in field conditions (Estevez de Jensen et al., 2002). Myriad microorganisms live in soil. Accordingly, competition occurs in the rhizosphere and at the root surface of plants, which offer suitable environments for almost all microorganisms and environmental resources (Cavaglieri et al., 2004). Therefore, competition for limited important resources and colonization in proper environments are the primary antagonism mechanisms. Two greenhouse experiments showed that *Bacillus* spp. is capable of controlling plant pathogens. Therefore, future studies should establish a

greater understanding of the dynamics of applied beneficial organisms under field conditions to optimize their application methods and timing. It is also important to understand the effects of applied biological control strains on populations of indigenous beneficial bacteria and known to suppress pathogen establishment and disease (Kokalis-Burelle et al., 2006).

Ampicillin-resistant *Bacilli* were selected using UV irradiation to examine how *Bacilli* suppress plant disease pathogens and how much are they colonize soils and plants. Therefore, this treatment would simplify re-isolation from soils and plants and facilitate more precise studies. In this study, 17 strains of ampicillin-resistant mutant of *Bacillus* were selected. *Bacillus* spp. is known to control soil-borne pathogens because they produce antibiotics that suppress the growth of competing microorganisms (Asaka and Shoda, 1996). To examine whether *Bacillus* spp. can control soil-borne pathogens or not, dual culture inhibition assays were conducted. All isolates of bacteria were examined for antibiotic activity; some strains showed excellent effects to *V. dahliae* and *F. oxysporum*. Strains of *Bacillus* derived from KB-3 showed better suppression effects to pathogens than the original bacterium (unpublished data). Ampicillin-resistant mutants are inferred to show increased ability to produce antibiotics. Antifungal activity of *Bacillus* spp. was resistant to high temperature, a wide range of pH, and the action of many hydrolytic enzymes (Souto et al., 2004). These characteristics indicate that mutants might control plant pathogens not only in a greenhouse, but also in the field, with its attendant complex conditions.

This study investigated original bacteria and strains of isolates from roots. The genotypic characterization of ampicillin-resistant mutants was investigated using ITS-PCR, ITS-PCR RFLP and ERIC-PCR. Results obtained by ITS-PCR analyses showed that all strains of mutant were identity of each of origin bacteria. Interestingly, *B. subtilis* (KB-1 and KB-2) and *B. vallismortis* (KB-3) showed identical bands. Recent taxonomic studies have revealed that *B. subtilis* is heterogeneous and should be considered as a complex of closely related species (Reva et al., 2004). Isolates that had been previously classified as *B. subtilis* are now recognized as *B. atrophaeus*, *B. mojavensis*, and *B. vallismortis*. Furthermore, *B. subtilis* in turn has been classified into two subspecies: *B. subtilis* subsp. *subtilis* and *B. subtilis* subsp. *spizizenii* (Nakamura et al., 1999). Because *B. subtilis* and *B. vallismortis* are phenotypically similar species, the results of PCR assay showed no differentiation among species.

Genotypic analyses of the rDNA region have been used to distinguish strains. RFLP analyses of the spacer region between the 16S and 23S rDNA gene provides a useful method for classification within species (Haque and Russell 2005). In this study, the type strain of 3-A and 3-C originates from KB-3 inoculated plants. However, the results demonstrated that these strains were assigned distinctly from KB-3 and similar to KB-2. The strains of 3-A and 3-C were inferred to be *Bacillus subtilis*, which is present in soils and colonizes roots. These strains had higher antibiotic activity to soil-borne plant pathogens than

other strains. For that reason, they are new promising candidate strains as BCAs and should be examined *in vitro* and in a greenhouse.

The molecular typing technique based on the presence of repetitive DNA sequences that are dispersed throughout the genome of diverse bacterial species, such as REP-PCR and BOX-PCR, were used to discriminate various *Bacillus* species (Herman et al., 1998; Kim et al., 2001). In addition, ERIC-PCR was used as an approach based on targeting of repeated DNA sequences. It was used for characterization (Shangkuan et al., 2001). The data presented here indicate that ERIC-PCR can differentiate the isolates of strains. This result suggests that ERIC-PCR assay enabled classification of closely related strains of *Bacillus* isolate and that it can be useful in greenhouse and field studies as a molecular ecological marker.

In this study, these results suggest that *Bacillus* spp. had the ability to control *V. dahliae*. However, for practical use, *Bacillus* spp. must be more enhanced in their inhibition effects. Therefore, we hope that studies are conducted to explore mechanisms for control and the relationship between BCAs and plant pathogens in the rhizosphere and endorhizosphere. The application of ampicillin-resistant mutants will be an effective method in study. This kind of research has relevance to minimize the use of synthetic fungicides, thereby contributing to preservation of the environment.

Acknowledgements

We extend special appreciation to Kiyomoto Bio Co. Ltd. for supplying *Bacillus* strains.

REFERENCES

- Alstrom, S. (2001): Characteristics of Bacteria from Oilseed Rape in Relation to their Biocontrol Activity against *Verticillium dahliae*. *J. Phytopathol.* 149, 57-64
- Asaka, O. and Shoda, M. (1996): Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 4081-4085
- Bacon, C.W. and Hinton, D.M. (2002): Endophytic and biological control potential of *Bacillus mojavensis* and related species. *Biol. Control* 23, 274-284
- Berg, G., Fritze, A., Roskot, N., and Smalla, K. (2001): Evaluation of potential biocontrol rhizobacteria from different host plants of *Verticillium dahliae* Kleb. *J. Appl. Microbiol.* 91, 963-971
- Brannen, P. M. and Kenny, D. S. (1997): Kodiak® – a successful biological-control product for suppression of soil-borne plant pathogens of cotton. *Indust. Microbiol. Biotech.* 19, 169-171
- Cao, L., Qiu, Z., You, J., Tan, H. and Zhou, S. (2005) Isolation and characterization of endophytic streptomycete antagonists of *Fusarium* wilt pathogen from surface-sterilized banana roots. *FEMS Microbiol. Lett.* 247, 147-152
- Cavaglieri, L., Passone, A., and Etcheverry, M. (2004): Screening procedures for selecting rhizobacteria with biocontrol effects upon *Fusarium verticillioides* growth

Biological control of *Verticillium* black spot with *Bacillus* spp.

- and fumonisin B₁ production. *Res. Microbiol.* 155, 747-754
- Cavaglieri, L., Orlando, J., Rodriguez, M. I., Chulze, S., and Etcheverry, M. (2005): Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* in vitro and at the maize root level. *Res. Microbiol.* 156, 748-754
- Collins, D. P. and Jacobsen, B. J. (2003): Optimizing a *Bacillus subtilis* isolate for biological control of sugar beet cercospora leaf spot. *Biol. Control* 26, 153-161
- Emmert, E. A. B. and Handelsman, J. (1999): Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. *FEMS Microbiol. Lett.* 171, 1-9
- Estevez de Jensen, C., Percich, J. A., and Graham, P. H. (2002): Integrated management strategies of bean root rot with *Bacillus subtilis* and *Rhizobium* in Minnesota. *Field Crops Res.* 74, 107-115
- Garmendia, I., Goicoechea, N., and Aguirreolea, J. (2004): Effectiveness of three *Glomus* species in protecting pepper (*Capsicum annuum* L.) against verticillium wilt. *Biol. Control* 31, 296-305
- Grau, A., Gomez-Fernandez, J.C., Peypoux, F., and Ortiz, A. (2001): Aggregational behavior of aqueous dispersions of the antifungal lipopeptide iturin A. *Peptides* 22, 1-5
- Guo, J. H., Qi, H. Y., Guo, Y. H., Ge, H. L., Gong, L. Y., Zhang, and L. X., Sun, P. H. (2004): Biocontrol of tomato wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. *Biol. Control* 29, 66-72
- Handelsman, J., Raffel, S., Mester, E. H., Wunderlich, L., and Grau, C. R. (1990): Biological control of damping-off of alfalfa seedlings with *Bacillus cereus* UW85. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 713-718
- Haque, A. and Russell, N. J. (2005): Phenotypic and genotypic characterization of *Bacillus cereus* isolates from Bangladeshi rice. *Int. J. Food Microbiol.* 98, 23-34
- Herman, L., Heyndrickx, M., and Waes, G. (1998): Typing of *Bacillus sporothermodurans* and other *Bacillus* species isolated from milk by repetitive element sequence based PCR. *Lett. Appl. Microbiol.* 26, 183-188
- Hiraoka, H., Asaka, O., Ano, T., and Shoda, M. (1992): Characterization of *Bacillus subtilis* RB14, coproducer of peptide antibiotics iturin A and surfactin. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 38,635-640
- Islam, T., Hashidoko, Y., Deora, A., Ito, T., and Tahara, S. (2005): Suppression of damping-off disease in host plants by the rhizoplane bacterium *Lysobacter* sp. strain SB-K88 is linked to plant colonization and antibiosis against soilborne peronosporomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 3786-3796
- Ji, P., Campbell, H. L., Kloepper, J. W., Jones, J. B., Suslow, T. V., and Wilson, M. (2006): Integrated biological control of bacterial speck and spot of tomato under field conditions using foliar biological control agents and plant growth-promoting rhizobacteria. *Biol. Control* 36, 358-367
- Katan, J. (1996) Soil solarization: Integrated control aspects. In: R. Hall (ed.), *Strategies for Managing Soilborne Plant Pathogens*, APS Press, St Paul, pp. 250-278.
- Kim, W., Hong, Y., Yoo, J., Lee, W., Choi, C., and Chung, S. (2001): Genetic relationships of *Bacillus anthracis* and closely related species based on variable-number tandem repeat analysis and BOX-PCR genomic fingerprinting. *FEMS Microbiol. Lett.* 207, 21-27
- Kita, N., Ohya, T., Uekusa, H., Nomura, K., Manago, M., and Shoda, M. (2005): Biological control of damping-off of tomato seedlings and cucumber *Phomopsis* root rot by *Bacillus subtilis* RB14-C. *JARQ* 39, 109-114
- Kitazawa, K. and Suzui, T. (1980): *Verticillium* Black-Spot Disease of Radish. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 46, 271-273.
- Kokalis-Burelle, N., Kloepper, J. W., and Reddy, M. S. (2006): Plant growth-promoting rhizobacteria as transplant amendments and their effects on indigenous rhizosphere micro-organisms. *Appl. Soil Ecol.* 31, 91-100
- LaMondia, J. A., Elmer, W. H., Mervosh, and T. L. Cowles, R. S. (2002): Integrated management of strawberry pests by rotation and intercropping. *Crop Prot.* 21, 837-846
- Lemanceau, P., Corberand, T., Gardan, L., Latour, X. Laguerre, G., Boeufgras, J., and Alabouvette, C. (1995): Effect of two plant species, flax (*Linum usitatissimum* L.) and tomato (*Lycopersicon esculantum* Mill.), on the diversity of soil-borne populations of fluorescent pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1004-1012
- Li, Y. and Mustapha, A. (2002): Evaluation of four template preparation methods for polymerase chain reaction-based detection of *Salmonella* in ground beef and chicken. *Lett. Appl. Microbiol.* 35, 508-512
- Marten, P., Smalla, K., and Berg, G. (2000): Genotypic and phenotypic differentiation of an antifungal biocontrol strain belonging to *Bacillus subtilis*. *J. Appl. Microbiol.* 89, 463-471
- Mercado-Blanco, J., Rodriguez-Jurado, D., Herva's, A., and Jimenez-Diaz, R. M. (2004): Suppression of *Verticillium* wilt in olive planting stocks by root-associated fluorescent *Pseudomonas* spp. *Biol. Control* 30, 474-486
- Nakamura, L. K., Roberts, M. S., and Cohan, F. M. (1999): Relationship of *Bacillus subtilis* clades associated with strains 168 and W23: a proposal for *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* subsp. nov. and *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* subsp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 1211-1215
- Nejad, P. and Johnson, P. A. (2000): Endophytic Bacteria Induce Growth Promotion and Wilt Disease Suppression in Oilseed Rape and Tomato. *Biol. Control* 18, 208-215
- Nicholson, W. L. (2002): Roles of *Bacillus* endospores in the environment. *Cell Mol. Life Sci.* 59, 410-416
- Noling J. W. (2002): The practical realities of alternatives to methyl bromide: concluding remarks. *Phytopathology* 92, 1373-1375
- Ouoba, L. I. I., Diawara, B., Amoa-Awua, W., Traore, A. S., Moller, P. L., (2004): Genotyping of starter cultures of

- Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* for fermentation of African locust bean (*Parkia biglobosa*) to produce Soumbala. Int. J. of Food Microbiol. 90, 197-205
- Reva, O. N., Dixelius, C., Meijer, J., and Priest, F. G. (2004): Taxonomic characterization and plant colonizing abilities of some bacteria related to *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*. FEMS Microbiol. Ecol. 48, 249-259
- Scherm, H., Ngugi, H. K., Savelle, A. T., and Edwards, J. R. (2004): Biological control of infection of blueberry flowers caused by *Monilinia vaccinii-corymbosi*. Biol. Control 29, 199-206
- Setlow, P. (1995): Mechanisms for the prevention of damage to DNA in spores of *Bacillus* species. Ann. Rev. Microbiol. 49, 29-54
- Shangkuan, Y. H., Yang, J. F., Lin, H. C., and Shaio, M. F. (2000): Comparison of PCR-RFLP, ribotyping and ERIC-PCR for typing *Bacillus anthracis* and *Bacillus cereus* strains. J. Appl. Microbiol. 89, 452-462
- Shangkuan, Y. H., Chang, Y. H., Yang, J. F., Lin, H. C., and Shaio, M. F. (2001): Molecular characterization of *Bacillus anthracis* using multiplex PCR, ERIC-PCR and RAPD. Lett. Appl. Microbiol. 32, 139-145
- Silo-suh, L. A., Lethbridge, B. J., Raffel, S. J., He, H., Clardy, J., and Handelsman, J. (1994): Biological Activities of Two Fungistatic Antibiotics Produced by *Bacillus cereus* UW85. Appl. Environ. Microbiol. 60, 2023-2030
- Soesanto, L. and Termorshuizen, A. J. (2001): Effect of temperature on the formation of microsclerotia of *Verticillium dahliae*. J. Phytopathol. 149, 685-691
- Souto, G. I., Correa, O. S., Montecchia, M. S., Kerber, N. L., Pucheu, N. L., Bachur, M., Garcia, A. F. (2004): Genetic and functional characterization of a *Bacillus* sp. strain excreting surfactin and antifungal metabolites partially identified as iturin-like compounds. J. Appl. Microbiol. 97, 1247-1256
- Tahmatsidou, V., O'Sullivan, J. Cassells, A. C., Voyiatzis, D., and Paroussi, G. (2005): Comparison of AMF and PGPR inoculants for the suppression of *Verticillium* wilt of strawberry (*Fragaria* × *ananassa* cv. Selva). Appl. Soil Ecol. article in press
- Tjamos, E. C., Tsitsigiannis, D. I., Tjamos, S. E., and Katinakis, A.P. (2004): Selection and screening of endorizosphere bacteria from solarized soils as biocontrol agents against *Verticillium dahliae* of solanaceous hosts. Eur. J. Plant Pathol. 110, 35-44
- Toure, Y., Ongena, M., Jacques, P., Guiro, A., and Thonart, P. (2004): Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. J. Appl. Microbiol. 96, 1151-1160
- Versalovic, J., Koeuth, T., and Lupski, J. R. (1991): Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucle. Ac. Res. 19, 6823-6831
- Wagner, B. L. and Lewis, L. C. (2000): Colonization of corn, *Zea mays*, by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Appl. Environ. Microbiol. 66, 3468-3473
- Whipps, J. M. (2001): Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. J. Exp. Bot. 52, 487-511

摘要

Bacillus 属菌は芽胞を形成することで悪条件下でも生存することができ、また広い宿主範囲をもつ抗生物質を産生する。このことから生物防除資材として適しているとされており、その可能性を探って多様な研究が行われている。そこで本実験では、キヨモト・バイオ(株)より分譲された *Bacillus* 属菌 3 菌株 (KB-1, KB-2, KB-3) を用いてダイコン黒点病に対する生物防除資材としての可能性について検討した。二回のポット試験を行った後、圃場内で発病抑制効果を見た。その結果、すべての菌接種区において病原菌単独処理区と比較して病気を抑制している傾向がみられ、特に KB-2、KB-3 接種区で優れた効果がみられた。さらに土壌や植物体内から菌を分離しやすくし、より正確なデータを得るために、*Bacillus* 属菌 3 菌株にマーカーを付与した。すなわち、UV 照射により突然変異を生じさせ、アンピシリンに対する抵抗性をもつ *Bacillus* 系統を選抜した。以上の処理によって得られた合計 17 菌株を用いて対峙培養を行い、*Verticillium dahliae* および *Fusarium oxysporum* に対する拮抗作用を調査した。その結果、*F. oxysporum* に対しては 6 菌株で、*V. dahliae* に対してはすべての菌株で優れた抑制効果がみられた。このことから変異株は病原菌の生育を抑制することが示唆された。また、ITS-PCR, ITS-PCR-RFLP, ERIC-PCR を用いて KB-1, KB-2, KB-3 とアンピシリン耐性変異株の遺伝的特徴を調べた。これにより遺伝的にもこれらの菌を識別することが可能となり、今後のポット試験・圃場試験での有効的な活用が期待される。

Low-molecular-weight aliphatic carboxylic acids in soils incubated with decomposing forest litter

Masayuki Tani¹, Masanori Koike¹, Katsuhisa Kuramochi¹ and Teruo Higashi²

(Received: April 17, 2006)

森林リター分解物を添加・培養した土壌における低分子脂肪族カルボン酸

谷 昌幸¹, 小池正徳¹, 倉持勝久¹, 東 照雄²

ABSTRACT

The effects of the addition of decomposing forest litter, collected from Podzolic soil organic layers (Oi, Oe and Oa) and Brown Forest soil Oe layers, on the amounts and composition of low molecular weight aliphatic carboxylic acids (LACAs) in soils were investigated by incubation experiments for 4 weeks. The total amounts of LACAs were greater at the beginning of incubation (384 to 1155 $\mu\text{mol kg}^{-1}$), but decreased abruptly after 1 week, becoming relatively stable for a period of 1 to 4 weeks (299 to 377 $\mu\text{mol kg}^{-1}$). The average amounts (without 0 weeks) of LACAs, especially acetic acid and citric acid, in soils incubated with forest litter under moderately moist conditions, were smaller than in the blank soil. Larger amounts of LACAs, especially formic acid, succinic acid, and citric acid, accumulated in soils incubated with forest litter under slightly wet conditions than in the blank soil. Changes in soil microflora and their activities induced by the differences in soil moisture conditions and incorporated decomposing forest litter can affect the balance of LACAs between production and decomposition in soils. Two types of decomposing forest litter collected from two Brown Forest soils, which are under almost the same vegetation and climatic conditions, but are from distinctly different parent materials, had nearly similar effects on the dynamics of LACAs. Three types of decomposing forest litter obtained from three layers of the Podzolic soil, which are substantially different in their decomposition degree, induced several changes in the composition of LACAs. The findings in the present study led to the conclusion that the decomposing forest litter derived from the vegetation present, the soil moisture conditions, and accompanying changes in soil microflora greatly influence the amounts and composition of LACAs in forest soils.

Key words: decomposing forest litter, forest soils, incubation experiment, low-molecular-weight aliphatic carboxylic acid (LACA), soil microflora

INTRODUCTION

It is interesting to evaluate the effects of the dynamics of low-molecular-weight aliphatic carboxylic acids (LACAs) in forest soils, which are essential to soil chemical processes and soil environmental quality (Stevenson, 1967; Fox, 1995). Most LACAs in forest soils probably are produced and brought into the soil of microbial metabolism, leachate from forest litter, and also as root exudates of higher plants (Fox,

1995). In acidic forest soil conditions, LACAs in the soil solution of O horizons, which consist of decomposing forest litter, play an important role in the speciation of aluminum and other metal ions with the ability of forming complexes (Pohlman and McColl, 1988; Tam and McColl, 1991; van Hees *et al.*, 1996). LACAs are also thought to exert an important role on the natural acidity of soils, which is not negligible (Devêvre *et al.*, 1996; Slattery *et al.*, 1998).

Some studies have shown that low-molecular-weight

¹Department of Agro-Environmental Science, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine

²Institute of Applied Biochemistry, University of Tsukuba

organic acids were abundant in litter and soil extracts from podzolic soils, and these acids were thought to be concerned with the podzolization process (Fox and Comerford, 1990; Lundström, 1993; van Hees *et al.*, 2000; Bergelin *et al.*, 2000). Fox and Comerford (1990) have reported that oxalate concentrations in soil solutions of Spodosols were greater in the Bh and Bt horizons than in the A horizon. The total amount of LACAs in the soil-water extract of a Typic Podzolic soil in Japan was much larger in the O horizon than in the Bh horizon (Tani *et al.*, 1993). Thus, high concentrations of LACAs in the O horizons enriched by the litter decomposed product might be decomposed and/or immobilized, occurring in the mineral horizons under "dynamic equilibrium" conditions between production and decomposition (Huang and Violante, 1986; Lundström *et al.*, 1995; van Hees *et al.*, 2003a; 2003b).

It has been determined from field experiments that the vegetation and plant materials included in forest litter layers may play an important part in determining the amount and composition of LACAs in the mineral horizons of a Podzolic soil and Brown Forest soils (Tani *et al.*, 1993; Tani and Higashi, 1999). It is essential to prove the effect of decomposing forest litter on the distribution of LACAs in the mineral soil horizons for the further evaluation of the role of LACAs in forest ecosystems. In this study, the amount and composition of LACAs in soils incubated with five different decomposing forest litters under different water regimes were determined. The viable counts of microorganisms were also measured to examine the relationship of LACAs dynamics with soil microflora and their activities.

MATERIALS AND METHODS

Soil and decomposing forest litter samples

The soil sample used for the incubation experiment was collected from the surface 10 cm of a fallow upland soil. The soil was a light-colored Andosol (Umbric-Dystric Andosols in WRB system, 1998), collected at the Agricultural and Forestry Research Center, University of Tsukuba, Ibaraki Prefecture, Japan. The soil sample was air-dried and passed through a 2-mm sieve. The decomposing forest litter samples were collected from the Oi, Oe and Oa layers of a Typic Podzolic soil, which has a thick mor-type humus layer and supports a coniferous forest (Haplic Podzols in WRB system, 1998), and from the Oe layers of two Brown Forest soils, which are found under almost the same vegetation and climatic conditions, but are derived from different parent materials (one from graywacke and another from volcanic ash). They have relatively thin, mull-type humus layers and support a typical deciduous forest (Dystric Cambisols and Fulvic Andosols in WRB system, 1998). A detailed description of these soil profiles and their vegetation were given in previous papers (Tani *et al.*, 1993; Tani and Higashi, 1999). The forest litter samples were ground in a coffee grinder and passed through a 0.5-mm sieve. Their total carbon and nitrogen contents are shown in Table 1. The C/N ratios of the Podzolic soil humus layers were higher in the upper Oi layer than in the lower Oa layer, reflecting the decomposition degrees of forest floor leaves and roots. The C/N ratios of the two Brown Forest soil Oe layers resembled each other, and were lower than the Podzolic soil humus layers.

Table 1. Properties of the decomposing forest litter samples.

Soil type	Vegetation	Layer	Depth (cm)	T-C ^a T-N ^a		C/N ratio
				(g kg ⁻¹)		
Podzolic soil [Haplic Podzols] ^b	Coniferous forest	Oi	+21 - +14	513	14.8	34.6
		Oe	+14 - +4	500	15.6	32.1
		Oa	+4 - 0	461	16.6	27.7
Brown Forest soil 1 [Dystric Cambisols]	Deciduous forest	Oe	+4 - 0	427	17.9	23.9
Brown Forest soil 2 [Humic Cambisols]	Deciduous forest	Oe	+5 - 0	474	20.3	23.4

^a Total carbon and nitrogen determined by dry combustion method.

^b WRB system (FAO, 1998)

Incubation experiment

Air-dried soil samples equivalent to 50 g of oven-dried soil were placed in polypropylene vessels (500 ml) and mixed with 2.5 g of each of the forest litter samples. Each vessel was watered with ultra-pure water to maintain the moisture

content of the soil sample at approximately 60 % or 80 % of the maximum water-holding-capacity (WHC). Vessels containing soil samples incorporated with decomposing forest litter were capped with aluminum foil bored to make a small air hole, and were then left in an incubator for 4 weeks

Low-molecular-weight aliphatic carboxylic acids in soils incubated with decomposing forest litter at 28 °C. Every week, ultra-pure water was added to each vessel to maintain the initial water content. The soil samples were served for the analysis of LACAs at 0, 1, 2 and 4 weeks after incubation. Overnight pre-incubation was conducted as for the 0 week's samples. Duplicate vessels on a reduced scale were also prepared to investigate the changes in the viable counts of bacteria and fungi at the same time. Over five kinds of forest litter samples were mixed and incubated at 60 % of the maximum WHC. To investigate the effect of the moisture content on the amounts and composition of LACAs, three kinds of Oe layer samples of each soil type were added at 80 % of the maximum WHC. Both incubation experiments under the different moisture conditions included blank soil samples that were not incorporated with any forest litter samples.

LACAs analysis

Phosphate buffer (pH 2) was used to extract the water-soluble LACAs fraction and the weakly adsorbed fraction (Tani *et al.*, 1993). Incubated soil was extracted with ammonium phosphate buffer (pH 2), which was added to each vessel so as to obtain a combined total volume of added extractants and a moisture level reaching 200 ml. The procedures used to obtain the crude extract and concentrate, and to purify the extracted solution, were the same as those used by Tani *et al.* (1993), where ten kinds of LACAs, namely formic acid, acetic acid, propionic acid, butyric acid, lactic acid, oxalic acid, fumaric acid, succinic acid, malic acid, and citric acid were identified and determined by HPLC.

Viable counts of bacteria and fungi

The viable counts of microorganisms were determined by the dilution-plate method as an index of microbial activity. Egg-albumin agar medium and rose-bengal agar medium were used for the counts of bacteria and fungi, respectively (Committee of Soil Microorganism Research, 1977).

RESULTS

Amount and composition of LACAs

The amounts of LACAs in the incubated soil samples, where the soil moisture content was maintained at 60 % of the maximum water-holding-capacity (WHC), as obtained by the extraction with a phosphate buffer solution are given in Table 2. Formic acid, acetic acid, and lactic acid were

dominant among the volatile monocarboxylic acids in almost all the soil samples. The amounts of formic acid ranged from 79.6 to 122.8 $\mu\text{mol kg}^{-1}$, being not so changeable throughout the incubation period as those of the acetic acid. The amounts of acetic acid were quite variable, ranging from 33.3 to 712.7 $\mu\text{mol kg}^{-1}$. These amounts were generally larger at the beginning of incubation, and were drastically reduced after 1 week in the soils incubated with forest litter from the Podzolic soil Oi and the Brown Forest soil Oe layers. Propionic acid and butyric acid were less than the other monocarboxylic acids or not detected. The nonvolatile dicarboxylic and tricarboxylic acids consisted mainly of oxalic acid, succinic acid, and citric acid. Sharp fluctuations were not observed for the amounts of oxalic acid and succinic acid during the whole period of incubation, and ranged from 39.2 to 69.6 and from 31.2 to 101.8 $\mu\text{mol kg}^{-1}$, respectively. The pattern of changes in the amounts of citric acid was relatively similar to that of the acetic acid. They were the largest in the soil pre-incubated soils at 0 week, decreasing abruptly after 1 week, and gradually after 2 or 4 weeks.

The total amounts of LACAs in the blank soils and the incubated soils with forest litter from the Podzolic soil Oi and the Brown Forest soil Oe layers were considerably larger at the beginning of incubation at 0 week, since they contained large amounts of acetic acid and citric acid (Fig. 1a and 1b; Table 2). Almost all soil samples incubated at 60 % of the maximum WHC revealed a similar range of the total amounts of LACAs at 1 week. At the end of 4 weeks of incubation, the total LACAs in the incubated soils with forest litter from the Podzolic soil organic layers slowly increased like in the blank soil, while those from the Brown Forest soil Oe layers continued to gradually decrease.

The amounts of LACAs in the incubated soils, where the soil moisture contents were maintained at 80 % of the maximum WHC, are given in Table 3. Like in Table 2, formic acid, acetic acid, and lactic acid predominated among the volatile monocarboxylic acids in almost all of the soils. The amounts of both formic acid and acetic acid were not as variable throughout the whole incubation period, compared to those in Table 2, and ranged from 85.8 to 124.8 and from 45.0 to 68.6 $\mu\text{mol kg}^{-1}$, respectively. The amount of acetic acid was not always larger at the beginning of the incubation at 80 % of the maximum WHC. The amount of oxalic acid, which was one of the major nonvolatile acids, ranged from

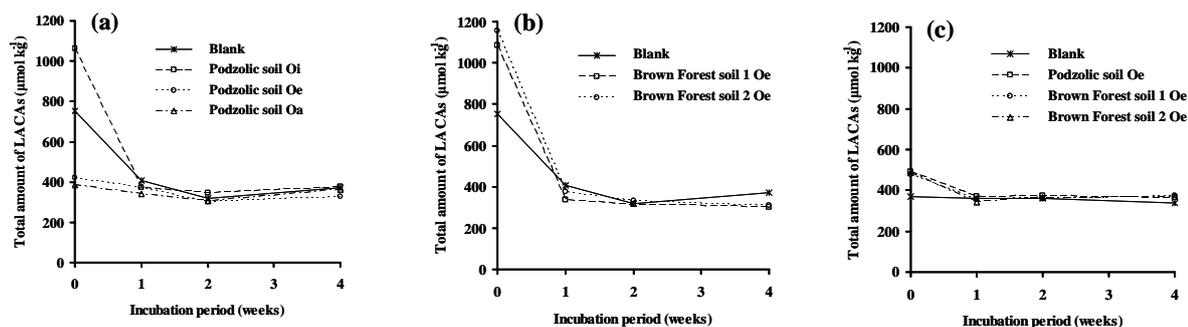


Fig. 1. Changes in the total amounts of LACAs in soils incubated with or without decomposing forest litter of (a) Podzolic soil (Oi, Oe and Oa layers), and (b) Brown Forest soils (Oe layers) at 60 % of maximum water-holding-capacity, and (c) Podzolic soil and Brown Forest soils (Oe layers) at 80 % of maximum water-holding-capacity.

Table 2. LACAs in the incubated soil samples where moisture content was maintained at 60% of maximum water-holding capacity.

Soil samples	Incubation periods (weeks)	LACAs ($\mu\text{mol kg}^{-1}$)									
		Formic acid	Acetic acid	Propionic acid	Butyric acid	Lactic acid	Oxalic acid	Fumaric acid	Succinic acid	Malic acid	Citric acid
Blank	0	116.0	350.3	9.3	Tr. ^b	35.2	50.9	0.7	48.8	3.6	137.1
	1	114.2	105.3	N.D.	Tr.	17.3	46.5	0.4	37.6	3.9	81.6
	2	84.2	50.4	N.D. ^a	Tr.	14.2	54.8	0.2	34.2	2.0	77.1
	4	105.9	69.7	N.D.	N.D.	15.6	69.6	0.3	31.2	2.7	78.9
Podzolic soil Oi	0	122.8	556.6	26.1	Tr.	47.7	51.5	1.2	82.1	2.8	170.1
	1	104.7	70.9	14.4	Tr.	14.6	41.7	0.5	37.4	3.8	82.2
	2	85.5	71.8	14.6	Tr.	15.7	44.2	0.3	37.5	1.9	73.7
	4	112.4	72.8	10.8	Tr.	15.5	60.6	0.3	35.5	2.1	67.3
Podzolic soil Oe	0	91.5	49.8	8.0	Tr.	22.1	50.0	0.4	62.1	1.2	134.5
	1	108.5	64.8	10.7	Tr.	13.9	49.9	0.4	43.0	4.1	77.0
	2	83.4	44.5	N.D.	Tr.	13.6	47.4	0.2	38.8	1.9	71.9
	4	94.7	54.6	9.1	N.D.	13.3	58.7	0.3	41.7	2.3	54.9
Podzolic soil Oa	0	88.0	44.9	N.D.	Tr.	17.7	45.9	0.3	51.6	1.5	134.1
	1	102.0	74.1	N.D.	Tr.	15.2	39.2	0.4	35.4	3.8	72.6
	2	85.1	39.6	N.D.	Tr.	13.8	49.5	0.3	41.2	1.9	73.5
	4	93.7	47.8	N.D.	N.D.	12.2	66.6	0.3	87.1	2.0	51.9
Brown Forest soil 1 Oe	0	119.0	662.0	Tr.	Tr.	26.9	40.5	1.0	92.7	2.0	139.6
	1	100.1	53.2	N.D.	Tr.	12.7	45.4	0.4	63.8	3.1	59.0
	2	97.4	41.0	N.D.	Tr.	9.7	46.4	0.3	59.5	3.3	57.7
	4	82.2	39.7	N.D.	N.D.	10.5	56.9	0.2	53.8	2.3	53.8
Brown Forest soil 2 Oe	0	118.2	712.7	Tr.	Tr.	32.0	44.2	1.1	101.8	3.0	141.7
	1	109.2	57.8	N.D.	N.D.	13.1	45.0	0.5	82.5	3.6	64.4
	2	98.7	43.4	N.D.	N.D.	11.2	49.7	0.3	62.3	2.6	62.3
	4	79.6	33.3	N.D.	N.D.	7.3	59.7	0.2	79.9	1.7	46.3

^aN.D., no peak detected; ^bTr., trace amount

Table 3. LACAs in the incubated soil samples where moisture content was maintained at 80% of maximum water-holding capacity.

Soil samples	Incubation periods (weeks)	LACAs ($\mu\text{mol kg}^{-1}$)									
		Formic acid	Acetic acid	Propionic acid	Butyric acid	Lactic acid	Oxalic acid	Fumaric acid	Succinic acid	Malic acid	Citric acid
Blank	0	100.1	46.9	N.D. ^a	Tr. ^b	11.6	54.9	0.3	60.8	2.6	90.9
	1	106.9	56.6	N.D.	Tr.	11.7	49.4	0.4	69.4	3.2	63.0
	2	102.9	62.7	N.D.	N.D.	5.5	51.2	0.4	67.8	3.4	66.2
	4	85.8	45.8	N.D.	N.D.	10.1	70.6	0.2	68.5	2.6	54.5
Podzolic soil Oe	0	111.4	68.6	N.D.	Tr.	22.6	54.1	0.4	107.4	2.6	123.0
	1	107.6	65.3	N.D.	N.D.	14.8	49.1	0.4	68.6	2.6	63.0
	2	107.1	50.9	N.D.	N.D.	6.2	54.6	0.4	82.5	3.8	67.7
	4	108.0	57.1	N.D.	N.D.	7.9	62.0	0.3	68.1	3.8	60.0
Brown Forest soil 1 Oe	0	118.9	45.0	N.D.	Tr.	16.4	57.0	0.4	119.0	3.0	117.3
	1	107.3	45.4	N.D.	Tr.	12.6	46.7	0.4	74.7	3.5	64.4
	2	99.7	45.2	N.D.	Tr.	11.0	57.7	0.4	80.7	3.1	61.3
	4	105.0	53.7	N.D.	N.D.	6.6	75.5	0.4	63.1	3.3	67.6
Brown Forest soil 2 Oe	0	124.8	46.4	N.D.	Tr.	14.0	62.7	0.5	122.0	2.5	113.0
	1	103.9	45.8	N.D.	N.D.	11.5	45.6	0.4	75.9	3.0	58.3
	2	104.5	59.0	N.D.	N.D.	6.9	50.7	0.4	77.1	3.4	63.0
	4	103.6	48.9	N.D.	N.D.	6.5	71.8	0.4	68.8	3.4	65.4

^aN.D., no peak detected; ^bTr., trace amount

Low-molecular-weight aliphatic carboxylic acids in soils incubated with decomposing forest litter

45.6 to 75.5 $\mu\text{mol kg}^{-1}$, and was always larger in the soils incubated for 4 weeks than in those at the beginning of incubation, 0 week. In contrast, the amounts of abundant succinic acid and citric acid were larger in the 0 week incubated soils, and decreased at 1 week. In most of the incubated soils, the amounts of succinic acid were relatively larger than those of citric acid, which differed from the results in Table 2. Thus, different soil moisture regimes can alter the balance between the production and decomposition of LACAs, resulting in different compositions of LACAs.

The total amounts of LACAs in the blank soil incubated at 80 % of the maximum WHC barely changed during the period of incubation (Fig. 1c). The pattern of changes in the total amounts of LACAs in the incubated soils with decomposing forest litter closely resembled each other. They were slightly larger at the beginning of incubation 0 week. They decreased after 1 week, and remained stable until 4 weeks. The difference between the incubated soils in the amended forest litter was slight.

Effect of decomposing forest litter and soil moisture regime

It was suggested that the "dynamic equilibrium" conditions under the production and decomposition of LACAs had become stable in an earlier stage of incubation. As a wide variation in the total amounts of LACAs and each individual acid was observed in the pre-incubated soils at 0 week (Fig. 1), the average amounts of the predominant five LACAs, which were formic acid, acetic acid, oxalic acid, succinic acid and citric acid from 1 week to 4 weeks were compared to assess the effect of decomposing forest litters and soil moisture regimes on the amounts and composition of LACAs.

The amounts of formic acid ranged from 93.2 to 107.6 $\mu\text{mol kg}^{-1}$, and were similar to each other (Fig. 2a). There was a slightly larger amount of formic acid in the blank soil than in the soils incubated with decomposing forest litters at 60 % of the maximum WHC, while the amended soils contained larger amounts of formic acid to some extent at 80 % of the maximum WHC. The average amounts of acetic acid were relatively lower than those of formic acid, ranging from 44.6 to 75.1 $\mu\text{mol kg}^{-1}$ (Fig. 2b). At 60 % of the maximum WHC, the largest amount was observed in the blank soil. The soils incubated with forest litter from the Podzolic soil contained larger amounts of acetic acid than those from the two Brown Forest soils. Among the forest

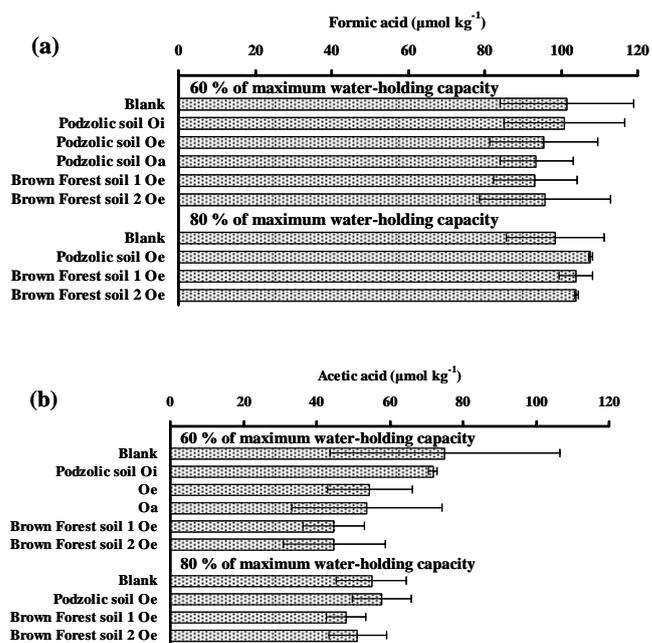


Fig. 2. Average amounts of (a) formic acid and (b) acetic acid in soils incubated for the period of 1 to 4 weeks.

litter collected from three organic layers of the Podzolic soil, the amount of acetic acid decreased from the Oi to Oa layer, being especially larger in the soil amended with the Oi layer litter. The soils incubated with intermediately decomposing forest litter obtained from three Oe layers contained a relatively larger amount of acetic acid at 80 % of the maximum WHC than at 60 %.

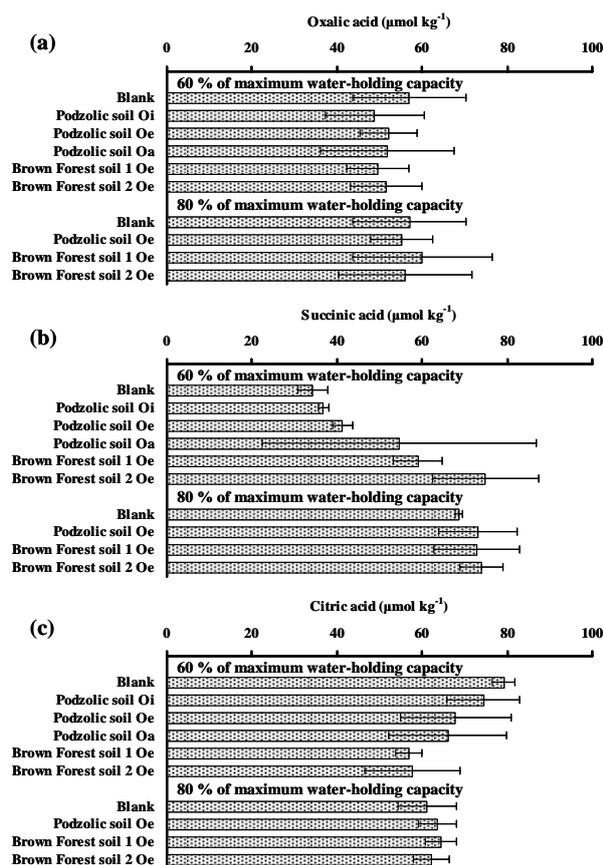


Fig. 3. Average amounts of (a) oxalic acid, (b) succinic acid and (c) citric acid in soils incubated for the period of 1 to 4 weeks.

The amounts of oxalic acid ranged from 48.8 to 60.0 $\mu\text{mol kg}^{-1}$, and not much difference was observed between each soil sample (Fig. 3a). The amount of oxalic acid in the soils incubated with forest litter at 80 % of the maximum WHC was slightly larger than at 60 %. The effect of the decomposing forest litter addition on the amounts of succinic acid at 60 % of the maximum WHC was obviously observed, being smallest in the blank soil (34.3 $\mu\text{mol kg}^{-1}$), and larger in the soils incorporated with the forest litter from the Podzolic soil Oa layer and the Brown Forest soil Oe layers (54.6 - 74.9 $\mu\text{mol kg}^{-1}$; Fig. 3b). Among the forest litter layers, the amounts of succinic acid were larger in the soils incubated with the Brown Forest soil Oe layers than the Podzolic soil organic layers, and they increased from the Oi to Oa layer of the Podzolic soil. While at 80 % of the maximum WHC the amounts of succinic acid were generally larger than at 60 %, there was little difference between the blank soil and the incubated soils with forest litter (Fig. 3b). The average amounts of citric acid were comparatively similar to those of succinic acid, ranging from 57.7 to 79.2

$\mu\text{mol kg}^{-1}$ (Fig. 3c), although the effect of the addition of decomposing forest litter at 60 % of the maximum WHC was in sharp contrast to that of succinic acid. Namely, the blank soil was the largest in the whole soil samples; the soils added with forest litter from the Podzolic soil contained larger citric acid than from the Brown Forest soils, and the amounts of citric acid decreased from the Oi to Oa layer of the Podzolic soil. At 80 % of the maximum WHC, a great difference in the amounts of citric acid was not found.

The average amounts of total LACAs in the soils incubated with the intermediately decomposing forest litter of Oe layers from the Podzolic soil, and the Brown Forest soil 1 and 2, at 60 % of the maximum WHC, for a period from 1 to 4 weeks (i.e. without 0 week), were 335, 318 and 338 $\mu\text{mol kg}^{-1}$, respectively. Those incubated at 80 % of the maximum WHC were larger, being 371, 363 and 359 $\mu\text{mol kg}^{-1}$, respectively, so that 6.3 to 14.4 percent increases were observed when the soils were incubated with forest litter under slightly wet conditions.

DISCUSSION

The total amounts of LACAs in the whole soil samples were larger at the beginning of incubation (0 week), abruptly decreasing after only 1 week and remaining relatively unchanged in the latter half of incubation (2 and 4 weeks). These patterns were consistent with those of dissolved organic carbon biodegradation in the forest floor leachates obtained in a beech - fir mixed forest (Boissier and Fontvielle, 1993). The LACAs are assimilated by various heterotrophic microorganisms, and so may occur in soils under dynamic equilibrium conditions between their production and decomposition (Huang and Violante, 1986; Lundström *et al.*, 1995). Almost all soil samples revealed a similar range of the total LACAs after 1 week, suggesting that the production and decomposition of LACAs in the incubated soils had already equilibrated in a short period.

The addition of decomposing forest litter caused a negative effect on the amounts of acetic acid and citric acid under the moderately moist conditions. Their reductions were more remarkable in the soils in which the forest litter from the Brown Forest soils was incorporated. Among the Podzolic soil organic layers, the soil added with the Oi layer contained slightly larger amounts of acetic acid and citric acid than the Oe and Oa layers. It is inferred from these results that the C/N ratio of the decomposing forest litter will

Low-molecular-weight aliphatic carboxylic acids in soils incubated with decomposing forest litter

be relevant to the balance between the production and decomposition of acetic acid and citric acid. In contrast, the addition of decomposing forest litter, especially that obtained from the Podzolic soil Oa layer and the Brown Forest soil Oe layers, leads to an increase in the amount of succinic acid.

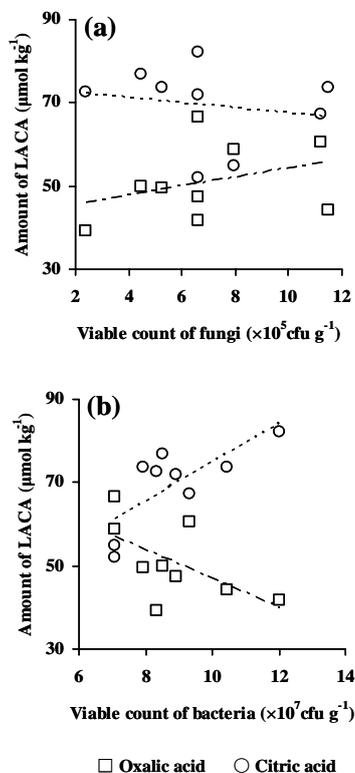


Fig. 4. Correlation of viable counts of (a) fungi and (b) bacteria with amounts of oxalic acid and citric acid in soils incubated with decomposing forest litter obtained from Podzolic soil organic layers at 60 % of maximum water-holding-capacity for the period of 1 to 4 weeks.

Thus, the addition of decomposing forest litter could induce changes in the amount and composition of LACAs in the soils, as Alin *et al.* (1997) suggested when they pointed out that the amendment of plant residues also resulted in similar changes. It is expected that microbial activities will relate to these changes. In Fig. 4 you can see a diagram which shows the relationship between viable counts of microorganisms and the amounts of oxalic acid and citric acid in the soils incubated with the forest litter of the Podzolic soil at 60 % of the maximum WHC from 1 to 4 weeks. As for oxalic acid, the positive correlation with viable counts of fungi and the negative correlation with those of bacteria were found, despite the fact that they were not always statistically significant. However, just the opposite relationship was observed in citric acid. When these parameters were tested with multiple regression analysis, a statistically significant correlation was observed as below:

$$A_{\text{oxa}} = 1.86 \times 10^{-5} C_f - 4.51 \times 10^{-7} C_b + 77.9 \quad (r^2 = 0.665, p = 0.038)$$

$$A_{\text{cit}} = -1.60 \times 10^{-5} C_f + 5.62 \times 10^{-7} C_b + 30.8 \quad (r^2 = 0.761, p = 0.014)$$

$A_{\text{oxa}}, A_{\text{cit}}$: Amounts of oxalic acid and citric acid ($\mu\text{mol kg}^{-1}$), respectively.

C_f, C_b : Viable counts of fungi and bacteria (cfu g^{-1}), respectively.

For example, the positive regression coefficient between the amounts of oxalic acid and viable counts of fungi (1.86×10^{-5}) suggests that fungi contribute to the production of oxalic acid in the soil environment, as pointed out by many researchers (Graustein *et al.*, 1977; Cromack *et al.*, 1979; Malajczuk and Cromack, 1982; van Hees *et al.*, 2003a; 2003b).

Larger amounts of LACAs, especially formic acid, succinic acid, and citric acid, accumulated in the soils incubated with decomposing forest litter under the slightly wet moisture condition (at 80 % of the maximum WHC). Since viable counts of fungi were generally lower at 80 % of the maximum WHC than at 60 %, it was supposed that the decomposition of LACAs by fungi could be suppressed, and would result in the change of balance between the production and decomposition of LACAs.

Two types of decomposing forest litter collected from two subtypes of the Brown Forest soils, which are about 200 m apart and under the almost same vegetation and climatic condition, however from distinctly different parent materials, had nearly similar effects on the amount and composition of LACAs. Three types of decomposing forest litter obtained from the Oi, Oe and Oa layers of the Podzolic soil, which are substantially different in their decomposition degree and C/N ratio, induced several changes in the composition of LACAs under experimental conditions.

As Fox (1995) suggested, factors affecting the types and amounts of low molecular weight organic acids present in the soil include the vegetation present, soil type, depth in the profile, proximity to roots, and soil aeration. We conclude that the decomposing forest litter derived from the vegetation present, accompanying soil microflora and their activity, and the soil moisture conditions, which control the balance between production and decomposition of LACAs in soils, exert a great influence on the amounts and composition of LACAs in forest soils.

REFERENCES

- Alin, S., Xueyuan, L., Kanamori, T., Ono, S., and Arai, T. 1997: Low-molecular-weight aliphatic acids in soils incubated with plant residues under different moisture conditions. *Pedosphere*, **7**, 79-86
- Bergelin, A., van Hees, P. A. W., Wahlberg, O., and Lundström, U. S. 2000: The acid-base properties of high and low molecular weight organic acids in soil solution of podzolic soils. *Geoderma*, **94**, 223-235
- Boissier, J. M. and Fontvieille, D. 1993: Biodegradable dissolved organic carbon in seepage waters from two forest soils. *Soil Biol. Biochem.*, **25**, 1257-1261
- Committee of Soil Microorganism Research 1977: Methods for counting microorganisms in soils. In *Experimental Methods for Soil Microorganisms*, Eds. T. Suzuki *et al.*, p. 21-42, Yokendo LTD., Tokyo (in Japanese)
- Cromack, Jr. K., Sollins, P., Graustein, W. C., Speidel, K., Tood, A. W., Spycher, G., Li, C. Y., and Tood, R. L. 1979: Calcium oxalate accumulation and soil weathering in mats of the hypogeous fungus *Hysterangium Grassum*. *Soil Biol. Biochem.*, **11**, 463-468
- Devêvre, O., Garbaye, J., and Botton, B. 1996: Release of complexing organic acids by rhizosphere fungi as a factor in Norway spruce yellowing in acidic soils. *Mycol. Res.*, **100**, 1367-1374
- FAO 1998: World Reference Base for Soil Resources, FAO, ISRIC and ISSS, Rome
- Fox, T. R. 1995: The influence of low-molecular-weight organic acids on properties and processes in forest soils. In *Carbon Forms and Functions in Forest Soils*, Eds. W. W. McFee and J. M. Kelly, p. 43-62, SSSA, Madison, WI
- Fox, T. R. and Comerford, N. B. 1990: Low-molecular-weight organic acids in selected forest soils of the southeastern USA. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **54**, 1139-1144
- Graustein, W. C., Cromack, Jr. K., and Sollins, P. 1977: Calcium oxalate: Occurrence in soils and effect on nutrient and geochemical cycles. *Science*, **198**, 1252-1254
- van Hees, P. A. W., Anderson, A-M. T., and Lundström, U. S. 1996: Separation of organic low molecular weight aluminium complexes in soil solution by liquid chromatography. *Chemosphere*, **33**, 1951-1966
- van Hees, P. A. W., Lundström, U. S., and Giesler, R. 2000: Low molecular weight organic acids and their Al-complexes in soil solution – composition, distribution and seasonal variation in three podzolized soils. *Geoderma*, **94**, 173-200
- van Hees, P. A. W., Godbold, D. L., Jentschke, G., and Jones, D. L. 2003a: Impact of ectomycorrhizas on the concentration and biodegradation of simple organic acids in a forest soil. *Eur. J. Soil Sci.*, **54**, 697-706
- van Hees, P. A. W., Jones, D. L., and Godbold, D. L. 2003b: Biodegradation of low molecular weight organic acids in a limed forest soil. *Water, Air, Soil Pollut. Focus*, **3**, 121-144
- Huang, P. M. and Violante, A. 1986: Influence of organic acids on crystallization and surface properties of precipitation products of aluminum. In *Interaction of Soil Minerals with Natural Organics and Microbes*, SSSA Spec. Publ. 17, Eds. P. M. Huang and M. Schnitze, p. 159-221, SSSA, Madison, WI
- Lundström, U. S. 1993: The role of organic acids in the soil solution chemistry of a podzolized soil. *J. Soil Sci.*, **44**, 121-133
- Lundström, U. S., van Breemen, N., and Jongmans, A. G. 1995: Evidence for microbial decomposition of organic acids during podzolization. *Eur. J. Soil Sci.*, **46**, 489-496
- Malajczuk, N. and Cromack, Jr. K. 1982: Accumulation of calcium oxalate in the mantle of ectomycorrhizal roots of *Pinus radiata* and *Eucalyotus marginata*. *New Phytol.*, **92**, 527-531
- Pohlman, A. A. and McColl, J. G. 1988: Soluble organics from forest litter and their role in metal dissolution. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **52**, 265-271
- Slattery, W. J., Edwards, D. G., Bell, L. C., Coventry, D. R., and Helyar, K. R. 1998: Soil acidification and the carbon cycle in a cropping soil of north-eastern Victoria. *Aust. J. Soil Res.*, **36**, 273-290
- Stevenson, F. J. 1967: Organic acids in soil. In *Soil Biochemistry*, Vol. 6, Eds. A. D. McLaren and G. H. Peterson, p. 119-146, Marcel Dekker, NY
- Tam, S. C. and McColl, J. G. 1991: Aluminum-binding ability of soluble organics in Douglas fir litter and soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **55**, 1421-1427
- Tani, M., Higashi, T., and Nagatsuka, S. 1993: Dynamics of low-molecular-weight aliphatic carboxylic acids (LACAs) in forest soils: I. Amount and composition of

LACAs in different types of forest soils in Japan. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **39**, 485-495

Tani, M. and Higashi, T. 1999: Vertical distribution of low-molecular-weight aliphatic carboxylic acid (LACAs) in some forest soils of Japan. *Eur. J. Soil Sci.*, **50**, 217-226

摘 要

ポドゾル性土の0i層, 0e層および0a層, 母材が異なる2種類の褐色森林土の0e層から採取した森林リター分解物を土壤に添加し, 水分含量を最大容水量の60%(適潤条件)および80%(加湿条件)に調整して4週間の培養を行った。森林リター分解物の種類や水分条件などが低分子脂肪酸カルボン酸(LACA)の量と組成に及ぼす影響を調べた。LACA総量は培養開始時に極めて高く(384~1155 $\mu\text{mol kg}^{-1}$), 1週間後には急激に減少した。培養1~4週間の間は, LACA総量の変動が比較的小さかった(299~377 $\mu\text{mol kg}^{-1}$)。培養開始時を除く期間中におけるLACA量の平均値は, とくに酢酸とクエン酸について, 森林リター分解物を添加し適潤条件で培養した土壤において, リター無添加土壤よりも低かった。一方, 加湿条件で培養した場合には, リターを添加した土壤でギ酸, コハク酸およびクエン酸が増加した。土壤水分条件と添加した森林リター分解物の違いは土壤微生物相とその活性に変化を引き起こし, 土壤中におけるLACAの生産と分解の平衡状態に影響を及ぼした。母材が異なる2種類の褐色森林土は, 植生および気候条件がほぼ同一であり, これらの0e層から採取したリター分解物が培養土壤中のLACAの量および組成に及ぼす影響に違いは認められなかった。一方, ポドゾル性土0層から採取した分解程度が異なる3種類のリター分解物は, 培養土壤中のLACA組成に影響を及ぼした。本研究の結果より, 森林リター分解物の分解程度, 土壤水分条件, それらの違いに起因する土壤微生物のフローラと活性は, 森林土壤における低分子脂肪酸カルボン酸の量と組成に重要な影響を及ぼしていることが明らかとなった。

大規模牧場が野生動植物の保全に果たす役割についての予備調査 -ケニア高原の事例から-

平田昌弘¹⁾、門平睦代¹⁾、水谷文美²⁾、松本葉²⁾、小疇浩¹⁾、佐藤雅俊¹⁾

(受理：2006年4月17日)

Preliminary survey on the role of large-scale ranch in conserving wild animals and plants

-From a case study in Kenya highland-

Masahiro HIRATA¹, Mutsuyo KADOHIRA¹, Fumi MIZUTANI², Kazuha MATSUMOTO², Hiroshi KOAZE¹
and Masatoshi SATO¹

摘 要

ケニア高原地帯のライキピア県において、大規模牧場が野生動植物の保全に果たす役割を検討するために、ヨーロッパ人による大規模牧場と現地の人々による小規模牧畜地帯における植生状態と土地利用の現状を定性的に把握した。大規模牧場(ロールダイガ牧場)の植生は、原生林(林床が短草型草本)、Acacia林(林床が長草型草本)、そして、局所的にAcacia林(林床が短草型草本)によって構成されていた。植生は、ExcellentからFairの状態を利用され、多くはGoodの状態で行われていると評価された。草地1haあたりに換算したウシ飼養頭数が0.25頭という低い放牧圧であれば、植生はほぼGoodの状態で行われることが示唆された。一方、小規模牧畜地帯(イル-ポレイ集落)の植生は、主にAcacia林(林床が短草型草本)となっていた。この土地利用の状態は、FairからPoorであると評価され、草地1haあたりに換算したウシ飼養頭数が2.26頭という極めて高い放牧圧では、植生はPoorに向かって退行してしまうと判断できる。「大規模放牧地で緩やかな土地利用、そして、放牧移動性を高いままに維持すること」こそ、土地を人間が利用しつつも環境保全を成功させる戦略であると考えられる。ケニア高原における大規模牧場の経営形態は、世界でも注目されるべき優れた放牧利用の事例と考えられる。

キーワード：牧畜、放牧圧、植生退行、大規模牧場、ケニア高原

1. はじめに

19世紀後半から始まるヨーロッパ諸国のアフリカ植民地政策により、現在のケニア地域においても主にイギリス

を中心とした侵略が始まった。ヨーロッパ人は、農業、工業、政治と、政治・経済活動全般にわたってケニアを統制し、植民地化していった(Ochieng, 1989)。特に、ケニア

¹帯広畜産大学畜産学部 〒88-8555 帯広市稲田町

School of Agriculture, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Obihiro, Hokkaido, 080-8555, Japan

²International Livestock Research Institute (ILRI), P.O.Box 307090, Nairobi, Kenya

南部の高原地帯で、バンツー諸語族やナイル諸語族の農耕民や牧畜民が利用していた自然草地をヨーロッパ人が占領し、西欧種の家畜を持ち込んで牧場を大規模に開拓していった。ケニア南部の高原地帯が White-high land と呼ばれる由縁がここにある。

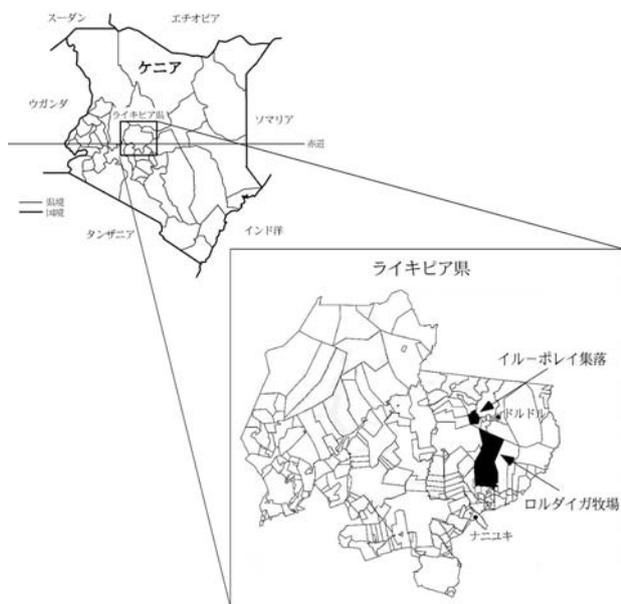


図1. ケニア国ライキピア県と調査地 (■)

第一次世界大戦により、ヨーロッパ人のケニア移住は一時中断された。しかし、第一次世界大戦後、戦役に徴兵されていたヨーロッパ人に対して土地を安価もしくは長期間で購入できるという政策のもと、ヨーロッパ人の開拓移住が再開されるようになった (小田, 1987)。ケニアのほぼ中央に位置するライキピア県では (図1)、1920年頃からヨーロッパ人による開拓入植が進展した。その後、牧場経営に成功していったヨーロッパ人は、経営に失敗した入植者から土地を買い取り、牧場規模を徐々に拡大していくこととなった。

ケニア高原に位置するライキピア県での20世紀前半の牧場経営は、ヨーロッパ人の開拓入植とヨーロッパ人による大規模経営とによって特徴づけられる。このようなヨーロッパ人によるライキピア県での大規模牧場経営に大きな転機をもたらしたのが、1950年代のアフリカ民族主義運動、そして、1963年のケニアの独立であった。ケニアの独立に際し、イギリス政府は1億ドルもの資金援助をケ

ニア政府におこなった。ケニア政府は、この資金を元手に、ヨーロッパ人の経営する大規模牧場を買い取り、その農地をケニア人に2エーカー単位で切り売りし、ケニア高原のヨーロッパ人入植地帯へのケニア人の入植を進めた。その結果、ライキピア県では、ヨーロッパ人による大規模牧場と現地のケニア人による小規模牧畜民による集落とが混在するようになった。その後、ヨーロッパ人による大規模牧場では低い放牧圧のままで維持されたが、ケニア人集落では人口増加に伴う家畜頭数の増加により、植生は高い放牧圧に曝されるようになり、現在に至っている。現在、ライキピア県には在来のケニアの人々によって形成されている集落が13、西欧人の所有による大規模牧場が約30存在している (Mizutani, 2002)。

本研究の目的は、ケニア高原地帯における大規模牧場が野生動植物の保全に果たす役割を明らかにすることにある。今回の予備的な調査では、ケニア高原地帯のライキピア県において、ヨーロッパ人による大規模牧場地帯と在来の人々による小規模牧畜地帯における生態環境、植生状態、および、土地利用の現状を観察とインタビューにより2005年6月11日から6月26日まで調査し、大規模牧場の土地利用体系が植生の維持に果たしている役割を定性的に把握することを目的とした。

2. 調査地

ライキピア県において、ヨーロッパ人による大規模牧場としてロルダイガ牧場 Lolldaiga ranch を、在来の人々による小規模牧畜としてイル・ポレイ集落 Il-polei community を事例として、家畜飼養状況と植生状態の把握をおこなった (図1)。

2-1. ライキピア県の気象条件

ライキピア県は赤道直下であるため、日長と気温が一年を通してほぼ一定している。ライキピア県では、日長の年較差が10分以内である。一方、気温は1300m-1500mの高地にあるため (図2)、平均気温が年間を通して15℃前

後と冷涼な高山気候帯にある。日中には22℃前後となる。

れら以外の季節は降雨が相対的に少なくなる。

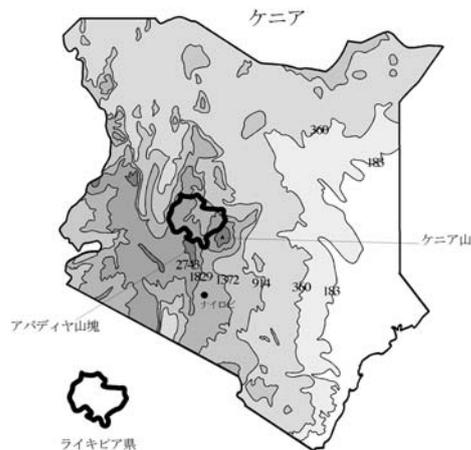


図2. ケニアの標高 (m) とライキピア県

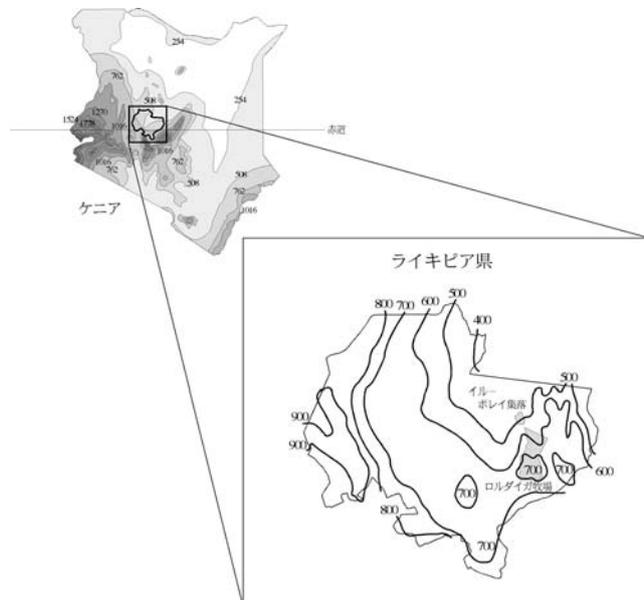


図3. ケニア国ライキピア県と調査地 (□) の年間降水量 (mm)

出典: Jaetzold R. and Schmidt H., 1983.

ケニアの降水量は、インド洋沿岸部、および、標高が高くなるにつれて多くなる。ケニアは南西部地域が標高1,000 m以上の高地が続く。年間降水量は、ケニア北部の低地では300 mmを下回るが、南西部の高地の多くでは700 mm以上、ケニア山周辺など多いところでは2,000 mm以上もある(図3)。ライキピア県の年間降水量は、北東部から南西部にかけて約400 mmから900 mmへと推移する。降雨時期は、4月～5月にかけての大雨期、10月～11月の小雨期の年間2回の雨季がある。7月から8月にかけて降水が多くなるのは、大陸性の低気圧の影響である。こ

2-2. 大規模牧場：ロルダイガ牧場

ロルダイガ牧場は、イギリス人のダグラス・ハインド Dagrus Hinde 氏によって1929年に開拓された。当初は2,000 haであったが、開拓牧場を周辺から徐々に買い上げ、現在ではロルダイガ牧場の総面積は20,000 haに至っている。現在、この広大な牧場で、ウシ4,590頭、ヒツジ4,500頭、ラクダ150頭を飼養している。中型家畜のヒツジとヤギをウシの1/10として放牧圧を換算すると(日本草地学会編、1985)、草地1 ha当りウシ0.25頭で飼養されていることになる。ロルダイガ牧場では、低い放牧圧で家畜を飼養していることが理解される。この低い放牧圧の状態、定置放牧することなく、大規模牧場内で定期的に放牧地を変えて粗放的に家畜を飼養している。



図4
ヨーロッパ人が経営する大規模牧場には多くの野生動物が現在も生息する。

ロルダイガ牧場では、人口と家畜頭数が急激に増加する前から入植開拓が開始され、草地1 ha当たりウシ0.25頭という低い放牧圧のままで土地利用がおこなわれてきたため、野生動物と野生植物とが極めて良好に維持されている。野生動物としては、シマウマやキリン、アフリカゾウ、ガゼルなど大型動物が約60種、鳥類が約300種生息するという(図4)。ケニアの人々の集落では、中・大型の野生動物がほとんど見かけられないことを考慮すると、大規模牧場が野生動物の保全に極めて重要な役割を果たしているといえる。

2-3. 小規模牧畜：イル-ポレイ集落

イル-ポレイ集落の総面積は2,000 ha であり、ここに275世帯、合計2850人が居住している。イル-ポレイ集落はマサイ族と自称する人々によって形成された集落であり、牧畜を生業として主に生活している（Sankan, 1971）。マサイ

族以外の人々としては、集落のセンターにケニア南部からキユク農耕民が入り込んで、雑貨屋や食堂を経営している。また、移動の通過地点として、ケニア北部のレンディーレ牧畜民の姿も見られる。しかし、外部の人々は比率的わずかであり、イル-ポレイ集落はマサイ族の人々の集落とい

表1. イル-ポレイ集落（275世帯）での飼養家畜の種類と平均頭数

世帯	ウシ					ヒツジ			ヤギ			ラクダ	ニワトリ
	成雄ウシ	成雌ウシ	仔雄ウシ	仔雌ウシ	ウシ合計	雌ヒツジ	雄ヒツジ	ヒツジ合計	雌ヤギ	雄ヤギ	ヤギ合計		
平均頭数(頭)	1.4	5.1	1.3	1.1	8.8	19.4	8.7	28.1	40.8	7.2	48.0	0.3	5.2
SD	2.2	8.6	2.4	1.6	12.9	29.8	14.1	40.3	40.8	8.3	45.8	1.0	6.0
275世帯合計推定頭数	383.8	1,393.1	344.5	299.2	2,420.6	5,333.8	2,399.5	7,733.2	11,217.6	1,988.5	13,206.0	90.7	1,441.5

飼養している家畜の種類と頭数に関するデータは、全275世帯の内、91世帯分のみイル-ポレイ集落副長から入手できた。91世帯についての一世代あたり平均家畜頭数は、ウシ8.8±12.9頭、ヒツジ28.1±40.3頭、ヤギ48.0±45.8頭、ラクダ0.3±1.0頭、ニワトリ5.2±6.0羽であった（表1）。91世帯分の家畜飼養状況を基にイル-ポレイ集落全275世帯の家畜飼養頭数を推定すると、ウシ2,421頭、ヒツジ7,733頭、ヤギ13,206頭、ラクダ91頭、ニワトリ1,442頭となる。マサイ族は、中型家畜のヒツジ・ヤギを中心として、これに少頭数の大型家畜であるウシを飼養して主に牧畜を営んでいることが分かる。ラクダやニワトリを飼養するようになったのは、最近のことである（イル-ポレイ集落副長私信）。

中型家畜のヒツジとヤギをウシの1/10として放牧圧を換算すると、草地1haあたりウシ2.26頭が飼養されることになる。イル-ポレイ集落での放牧圧はロールダイガ牧場よりも9.0倍も大きく、極めて高い放牧圧で家畜を飼養していることが把握される。このような放牧圧では、植生退行が必然的に進行することとなる。

3. ケニア高原における植生と土地利用の評価

3-1. ライキピア県における土地利用と植生状態の関係

大規模牧場としてのロールダイガ牧場と小規模牧畜地帯としてのイル-ポレイ集落を事例に、土地利用が植生に与える影響を定性的に検討してみることにする。

ロールダイガ牧場は、人口増加と家畜頭数増加によって自

然植生が攪乱される以前に入植し建設したところである。しかも、草地1ha当たり換算でウシ0.25頭飼養という低い放牧圧のまま土地利用がおこなわれてきた。そのため、自然植生が現在も極めて良好に維持されている。人間の土地利用がほとんど及んでない場所では、モクセイ科の *Olea europaea*（野生オリーブ）とヒノキ科の *Juniperus procera*（ネズ *Juniper* の一種）の原生林が残存している。かつて、ケニア山（5,199 m）からアバディア山塊（3,000 m 級の山岳地帯）までは *Juniper* の林だったとされ、今ではロールダイガ牧場のような大規模牧場や国立公園に残っているのみとなっている（図2）。*O. europaea* と *J. procera* の原生林地では、太陽光が原生林の林冠で遮られるため、下層の草本植物は草丈が相対的に低く、被覆度も低く粗な状態となっている（図5）。



図5 野生オリーブの原生林植生。

土地利用が進むと、*O. europaea* と *J. procera* の原生林は

姿を消し、代わってマメ科の *Acacia* spp. (アカシア) が疎らに出現し、景観を形成するようになる (図 6)。放牧圧の低い状態でのアカシア植生では、太陽光の透過性が高くなるため、イネ科を中心とした長草草本植物が下層を形成する。放牧圧の低いロールダイガ牧場の多くの場所は、このアカシア林と長草草本植物の組み合わせの植生となっている。より土地利用の進んだところでは、アカシア林・短草草本植物の植生となっている場所も見受けられる。人間の土地利用が進むと、*O. europaea*・*J. procera* 原生林からアカシア林へと何故移行するかは、詳しくは分かっていない。



図6 軽度の放牧圧状態でのアカシア林植生。



図7 強度の放牧圧状態でのアカシア林植生。

一方、イル-ポレイ集落の場合、草地 1 ha 当たり換算でウシ 2.26 頭という極めて高い放牧圧で家畜を飼養している。植生は、*Acacia* spp. が景観を形成し、イネ科を中心とした短草草本植物が下層を形成している。過剰な放牧が進みすぎたところでは、*Acacia* spp. は残存するものの、草本植物は採食されてほとんどなくなる (図 7)。

以上のことから、ケニア高原における人間の土地利用に

よる植生の変遷過程を推定することができる。人間が全く利用していない土地では、木本植物では *O. europaea* と *J. procera* を主とした原生林が、草本植物では草丈が相対的に低く、多種類で、粗な密度で自生した短草草本植物が生育し、両者の混在した自然植生が成立する (図 8)。この自然植生に軽度の土地利用が加わると、*O. europaea* と *J. procera* の原生林が *Acacia* 林に置き換わり、長草草本植物との組み合わせの植生へと変遷する。ライキピア県の事例の場合、自然植生が攪乱された際、*Acacia* spp. が侵入植物ということになる。更に強い人間の土地利用が加わると、*Acacia* 林と短草草本植物の植生へと退行する。過放牧が進行した場合、*Acacia* 林は残存するものの、草本植物はほとんど残存しない植生となる。

ケニア高地のライキピア県では、土地利用が進むにつれての自然植生の定性的な退行は、以上のように遷移していくものと推定される。

3-2. ロールダイガ牧場とイル-ポレイ集落での植生評価

Dysksterhuis (1949) は、人間の土地利用によって自然植生が影響を受けた場合、その退行した自然植生の状態を評価するためのモデルを考案した。そのモデルとは、植生の極相を 100、対極として完全に植生が破壊された状態を 0 とし、この両軸を 4 等分割し、植生管理の良い方から Excellent (100-75)、Good (75-50)、Fair (50-25)、Poor (25-0) と位置づけた (図 8)。Dysksterhuis は、Fair 以上の草地管理を推奨している。本来の Dysksterhuis のモデルは植物現存量によって表しているが、本報告では議論に耐え得る植物現存量データが欠損しているため、指標となる植物種構成に適応させて定性的に検討した。

ロールダイガ牧場の植生は、原生林 (林床が短草草本)、*Acacia* 林 (林床が長草草本)、そして、局所的に *Acacia* 林 (林床が短草草本) によって構成されている。植生は、Excellent から Fair の状態で利用され、多くは Good の状態で利用されていると評価できると評価できる (図 8)。草地 1 ha 当たりウシ 0.25 頭飼養という低い放牧圧であれば、植生はほぼ

Good の状態で管理されることが把握される。

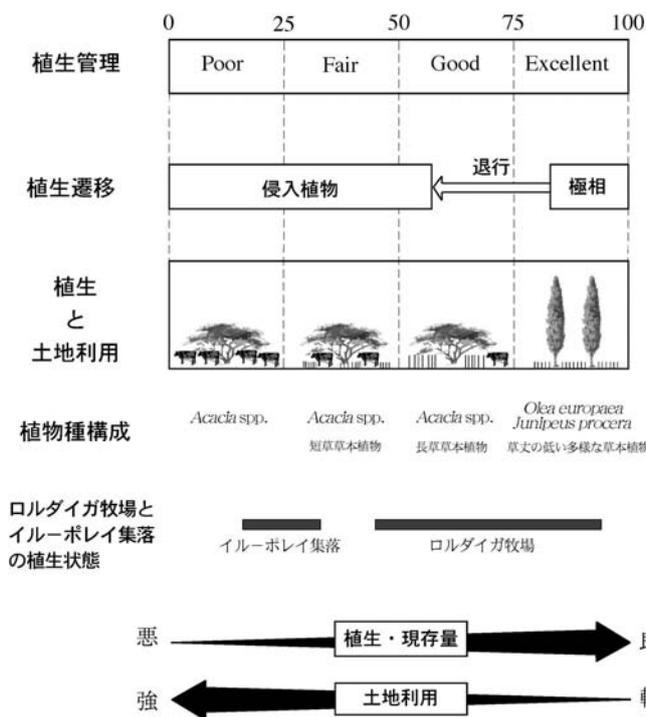


図8. 植物種構成を基にしたロールダイガ牧場とイール・ボレイ集落における植生状態と土地利用との関係

注) Olea europaeaやJuniperus proceraの森林植生を極相とし一つの軸に、他方の軸に人が草本植物を完全の利用し尽くした状態を取り、4等分割して、植生管理の良い方からexcellent, good, fair, poorと定めた (Dysksterhuls, 1949)

一方、イール・ボレイ集落の植生は、主に *Acacia* 林 (林床が短草草本) となっている。この土地利用の状態は、Fair から Poor であると評価できる (図8)。現行の草地 1 ha 当たり換算でウシ2.26頭飼養という極めて高い放牧圧では、植生は Poor に向かって退行してしまうと評価できよう。

4. おわりに

遊牧地帯における土地の個人への分配、土地の私有化は、アジアのモンゴルやアフリカの多くの地域で失敗している (Sneath, 1999 ; ソーハン, 2001)。乾燥地・半乾燥地における放牧地の個人への分配・私有化は、環境保全にはつながらず、局所的な過放牧と沙漠化をもたらす結果に終わっている。世界の多くの地域で放牧地の私有化が失敗している原因は、1) 個人への分配面積が小規模であること、2) 小規模放牧地内に多頭数の家畜を飼養してしまうこと、3) 小規模放牧地内に常に留まって放牧圧を通年与え続け

てしまうこと等が主な理由である。

ケニア高原の場合には、これまで検討してきた通り、大規模牧場においては放牧地の個人への分配・私有化は、野生動物と野生植物の保全につながっている。大規模牧場という経営形態において、放牧地の個人への分配・私有化が環境保全に寄与している理由は、1) 個人への分配面積が大規模であること、2) 大規模放牧地内に限られた頭数だけの家畜を飼養していること、3) 大規模放牧地内の一カ所に停滞することなく、常に移動しながら放牧していること、4) 自然植生が退行してしまう前の早い段階で大規模私有化したこと等の理由があげられる。「大規模放牧地で緩やかな土地利用、そして、放牧移動性を高いままに維持すること」こそ、土地を人間が利用しつつも環境保全を成功させる戦略であると考えられる。ケニア高原における大規模牧場の経営形態は、世界でも注目されるべき優れた放牧利用の事例といえよう。

一方、在来の人々による小規模牧畜集落では、植生退行が確実に進行している。世界の多くの地域で見られる放牧地私有化の失敗の後を追っている。今後、在来の人々による小規模牧畜集落では、人口が継続的に増加し、それに伴って家畜頭数も増加する結果となり、放牧地の許容量を大きく超えてくるであろう。近い将来、緩やかな土地利用にある大規模牧場に対し、小規模牧畜集落の在来の人々が放牧地共有化としての解放を大規模牧場経営者に求めてくるであろう。

緩やかな土地利用の大規模牧場は、野生動物と野生植物の保全に極めて重要な役割を果たしている。乾燥地・半乾燥地は生態基盤が脆弱である。不適切な土地利用がおこなわれれば、野生の動植物の多様性が容易に減少してしまう。ケニア高原で野生の動植物の多様性を守るのであるならば、国立公園と並んで、今後とも大規模牧場を現在までのような土地利用形態で維持させていく必要がある。大規模牧場放牧地の解放への要求が小規模牧畜集落側から強まってくると考えられる今後、大規模牧場の経営形態、および、野生の動植物の保全は、これから正に試練の時を迎

えていくこととなるであろう。

謝辞

本研究は、平成 17 年度文部省科学研究費補助金（基盤研究(B)(2)）『南部アフリカ 3 ヶ国における小規模農家レベルでの畜産振興を妨げる要因の研究』（代表・門平睦代）のもとにおこなわれた。ロルダイガ牧場の人々、イルポレイ集落のマサイ族牧畜民の人々は調査に快く協力してくれた。これらの方々に深く感謝する。

引用文献

- Dysksterhuis, E. J., 1949. Condition and management of rangeland based on quantitative ecology. *J. of Range Management*, 2: 104-115.
- Jaetzold R. and Schmidt H., 1983. *Farm management handbook of Kenya, Vol. II*. Ministry of Agriculture, Nairobi.
- Mizutani, F., 2002. *Report on the socio-economics and ecology of three communities (Tiamamut, Kijabe, Koiya Group Ranches) in northern Likipia, as baseline data for planning of natural resource management*, AWF/ILRI report, Nairobi.
- 日本草地学会編、1985. 『畜産用語辞典』養賢堂.
- Ochieng, W. R., 1989. *A Modern History of Kenya 1895-1980*. Evans Brothers Limited, London, pp259.
- 小田英郎、1987. 「国家の形成と民族」川田順造編『黒人アフリカの歴史世界（民族の世界史 12）』、山川出版社、pp464.
- Sankan S. S., 1971. *The Massai*. Kenya Literature Bureau, Nairobi.
- ソーハン・ゲレルト、2001. 「過放牧発生の社会的背景—イミン・ソムを実例として」『沙漠研究』11: 23-34 .
- Sneath D., 1999. *Special Mobility and Inner Asian Pastoralism. The end of Nomadism ? - Society, State and the Environment in Inner Asia*. Duke University Press,

Durham, pp.218-277.

吉田昌夫・阿部廣二・池野旬・児玉谷史朗・半澤和夫、1996.

『ケニアの農林業』国際農林業協力会.

Summary

Vegetational condition and land utilization were surveyed in the large-scale ranch managed by European farmers and a small-scale pastoral area used by indigenous peoples in Laikipia Province of Kenya highland to clarify the role of the large-scale ranch in the conserving wild animals and plants. The large-scale ranch was managed under light feeding condition of 0.25 cattle-unit/ha, and the vegetation was consisted of 3 vegetational types such as the natural forest with short herbs, Acacia shrubland with long herbs and scattered Acacia shrubland with short herbs. The management of vegetation in the large-scale ranch was evaluated as “Excellent” to “Fair” conditions. The low grazing pressure of 0.25 cattle-unit/ha could maintain a good vegetation conditional in Kenya highland. On the other hand, the small-scale pastoral area was used under heavy feeding condition of 2.26 cattle-unit/ha, and its vegetation was evaluated as “Fair” to “Poor” conditions. Such overgrazing as 2.26 cattle-unit/ha could cause poor vegetational condition in Kenya highland. It is considered from this case study that “Lower grazing pressure in a large-scale pasture and highly grazing mobility” seem to be the important strategy for wildlife conservation. The feeding system of the large-scale ranch in Kenya highland is considered as the excellent case of land use for wildlife conservation in dry/semi-dry areas.

Key words: pastoralism、grazing pressure、vegetation regression、large-scale ranch、Kenya highland

江馬修『山の民』研究序説 (三)

——改稿過程の検討 (三)・初稿から学会版へ (後の上) ——

柴 口 順 一

(帯広畜産大学文学研究室)

二〇〇六年四月三十日受理

An introductory study on Shu Ema "Yama no Tami" [3] :

A research on the process of rewriting(3)・From original version to Gakkai version (C-x)

Jun'ichi SHIBAGUCHI

はじめに

前稿までに、江馬修『山の民』の初稿(雑誌『ひだびと』掲載)から学会版(飛騨考古土俗学会発行)への改稿を検討した。

比較にあたっては便宜上それぞれの本文を各単位に分け、おおよそ構成の変更、新たに加えられた部分、そして省かれた部分の順に検討を加えた。ただ、その際にも断わっておいたように、それらはあくまでも単位レベルでの変更であった。いわゆる単位内における変更も少なくなかったこともすでに指摘しておいた。そこで、本稿以下では補足的に単位内における変更について検討する。改めて確認するまでもないが、単位分けは各本文の章分けに加えて、各章中に行なわれる一行あけによる区分を併用したものである。

さらに補足という意味では、伏せ字について、そして誤植や誤記等についても検討する。また、学会版の人名索引を掲載する。『山の民』にはおびただしい人物

が登場することから、今後の学会版の研究に資するところ少なくないと考えるからである。さらには、第二、第三の改稿を検討する際にも有用であろう。初稿の人名索引もむろん無用とはいえないが、割愛する。初稿は雑誌掲載のため通しページを記し得ず、各誌のページを記す形では煩雑になり、かつ混乱を来しかねないからである。また初稿には学会版の第三部に相当する第三編というべきものが存在しないからでもある。

一

第一稿においては、それぞれの本文を単位に分け、各単位には内容のごく簡単な要約を付しておいた。だが、いずれのテキストについても要約を付すのは重複が多くあまりにも煩雑である。そこで、初稿にはない第三部が存在する、またそれを除く部分においてもおおかたは初稿をカバーしているといえる学会版のみに

行なった。いわゆる単位内における変更を検討するにあたっては、それを利用し、まずはおおよその変更を整理することからはじめたい。すなわち、以前作成したものに単位内の変更を書き加えるのである。全体のうちで変更のある単位の部分に、その要約に付随する形で変更内容を記すことよって、よりわかりやすいものになると同時に、全体における変更のありようもまた把握しやすいものになるであろう。

単位レヴェルの場合と同様、単位内の変更についてもおおよそ構成の変更、新たに加えられた部分、省かれた部分の三つに分けて検討する。それぞれ△、⊕、⊖の記号を付し、⊕と⊖、すなわち新たに追加された部分と省かれた部分についてはその内容の簡単な要約を付す。構成の変更については△のみ記すにとどめざるを得ない。それを簡潔に記すことは困難だからである。その内容についてはのちに行なう検討の際に説明する。あらかじめいっておけば、構成の変更は他のものに比べれば著しく少ない。以前作成したものには各単位のページを記しておいたが、今回はそれを省く。そのかわりに、追加部分にはページ並びに行数、省略部分には行数のみを記す。省略部分は当然ながら初稿のものであり、雑誌掲載である初稿の各誌ページを記すことにあまり意味はないと考えるからである。ちなみにいっておけば、学会版は一行四十三字、初稿は二種類あり、全二十回のうちの前五回までが四十八字、以降の十五回は五十三字である。⊕、⊖、及び△にはそれぞれ番号を付しておく。なお、追加部分に記すページ並びに行数は「/」をはさんでその順に記す。

本稿では初稿第一編から学会版第一部への改稿を検討し、末尾には学会版の人名索引を掲載する。次稿で第二編から第二部への改稿、そして伏せ字、誤植、誤記等を検討する予定である。

第一部 雪崩する国

一 高山御役所

1 (慶応四年一月二十三日) 手代寺田潤之助、早駕籠で郡代役所へ帰参。

⊕ 1 霧につつまれた高山の風景。(3/6)

2 寺田、郡代新見内膳へ情勢報告。

3 大評定の末、郡代役所を鎮撫使先発隊へ明け渡すことを決定。

⊕ 2 役所庭園の景観。(13/14/5)

4 評定の決定を町会所・郡中会所の役人を呼び報告。

二 地役人

5 地役人ら、評定の話しをしながら奥田大蔵の屋敷へ向かう。

⊕ 3 飛驒の地役人について。(21/24/12)

6 地役人ら、奥田邸での相談の結果、天朝への帰順を決定。

7 決定後、奥田邸で酒宴。

三 きのおとけふ

8 事情を聞きつけた人々の混乱。

9 (二月二十四日) 新見郡代、先に出発させる妻子の供を地役人に依頼するが拒絶される。

⊕ 4 地役人吉住礼助・田近孫助の様子とその会話。(39/40/14)

10 郡代の妻子ら、江戸へ向け出発。

⊕ 5 郡代の妻子らの旅行列に行き会った按摩。(45/46/10)

⊖ 1 郡代の妻子らの旅行列に行き会った年増女。(8)

四 郡中会所

11 (二月二十五日) 鎮撫使先発隊の警護として郡上藩入国の知らせ。

12 郡中会所と安永年間の大原騒動について。

⊖ 2 郡上藩による百姓弾圧。(8)

13 郡中会所二階での、村役人の対郡上藩対策についての寄り合い。

14 郡中会所階下での、百姓たちの郷蔵廃止願いについての寄り合い。

⊕ 6 郡中会所(押上屋)階下内部の様子。(58/59/4)

⊕ 7 百姓たちの会話(の一部)。(63/7)

五 夜の落人

15 百姓総代、村役人へ郷蔵廃止願いを提案し、郡代への願書提出を決定。

⊕ 8 郡中会所二階の様子と忠七の様子。(70/71/12)

- 16 郡上藩攻め入るのうわさで混乱する人々。
 新見郡代、郡上藩入国を聞き早々江戸へ向け出発。
 ⊕ 9 新見、夕飯の様子。(78〜79/5)
- 17 百姓たちをのしる新見。(4)
 ⊕ 10 新見一行、美女峠で狐に会う。(82〜83/11)
 ⊕ 11 峠の風景。(85/4)
- 六 牛を追ふて
- 18 牛方親子、道端の地藏尊類が消えているのを発見。
 牛方親子、百姓たちの不動尊撤去の現場に遭遇。
 ⊕ 12 牛方と百姓の会話(の一部)。(94/7)
- 20 牛方親子、峠の茶屋に到着。
 茶屋での、老婆・牛方・百姓の会話。
- 21 牛方親子、茶屋を去り、途中早飛脚に出会う。
- 七 維新の使者
- 22 (二月十日) 竹沢寛三郎、東山道鎮撫使先登隊の命を受け京都を出発。
 郡上藩入国し、人々反発を強める。
- 23 地役人・郡中会所の迎えを受け、竹沢飛驒に入る。
 (二月四日) 郡上藩の一部が退去し、竹沢多くの人々に迎えられ高山に入る。
- 八 『飯粒で鯛』
 △ 1
- 27 竹沢の到着に人々ひとまず安堵。
 (二月五日) 地役人、竹沢にこれまで通りの召し抱えを願い出、了承される。
- 28 町会所・郡中会所の総代、郡上藩家老鈴木兵左衛門に呼ばれ出向く。
 ⊕ 13 郡中会所・町会所総代の会話(の一部)。(132〜133/5)
- 30 郡上藩家老、米三百俵を提供する旨を伝えるが、辞退される。
 総代郡中会所に戻り、相談の上再び鈴木元へ行き辞退を告げる。
- 31 総代らとの会話(の一部)。(141〜142/8)
 ⊕ 14 落首。(146/3)
- 九 たくらみ
- 32 竹沢、町年寄矢島善左衛門に郡上藩のことを語る。
 33 矢島、帰り道に川上屋善右衛門に出会い、また合羽屋のおらくとすれちがう。
- 34 (二月六日) 町会所・郡中会所の総代、郡上藩の件で竹沢へ嘆願。
 ⊕ 4 郡上藩に関するうわさ。(8)
 △ 2
- 35 竹沢の発言と一同の感激。(7)
 ⊕ 5 町会所・郡中会所・地役人、天朝直支配を総督府へ嘆願することを決定。
 ⊕ 6 嘆願書(の一部)。(2)
 ⊕ 7 総括的説明。(3)
- 十 天領百姓
- 36 (二月七日) 竹沢、天朝御領を宣言し、年貢半減その他運上等の軽減を約束。
 △ 3
- 37 広瀬村五郎作、藁つかい小屋に寄り、夜ばい話に興じる若者に年貢半減を伝える。
 ⊕ 16 藁つかい小屋と夜ばいについての説明と、若者らの会話(の一部)。(163〜167/56)
- 38 五郎作、寄り合いに出かけ年貢等の軽減を聞く。(37)
 ⊕ 8 五郎作、家に帰り、女房のおしずに年貢半減のことを伝える。
 ⊕ 17 五郎作、通夜の席で年貢半減を知る。(169〜176/30)
- 39 五郎作、夜ばいに来た若者と年貢半減を肴に酒を飲むところに、息子が帰宅。
- ⊕ 9 五郎作のことば。(4)
 ⊕ 18 五郎作と若者の会話(の一部)。(181/10)

- 10 五郎作と若者の会話（の一部）。（5）
 11 睨み合ひ
 40 （二月八日）郡上藩鈴木、竹沢に不満を述べ対立。
 ⊕ 19 鈴木と竹沢の会話（の一部）。（190～191／8）
 41 （二月九日）郡上藩排除を期して竹沢総督府本陣へ向かう。
 ⊕ 20 竹沢のことは（の一部）。（196／4）
 42 豊屋の佐吉、郡上藩の侍に因縁をつけ対立。
 ⊕ 21 佐吉と侍の会話（の一部）。（202／6）
 ⊕ 22 佐吉と侍の様子。（203／5）
 十二 うどん屋
 43 お光姉妹のいるうどん屋へ通う郡上兵。
 ⊕ 23 うどん屋等を装う密淫売について。（208～209／3）
 △ 4
 ⊕ 24 うどん屋へ通う郡上兵を憎む人々。（209～210／6）
 44 お光姉妹の家に郡上兵がいるとの情報を聞き、踏み込む火方たち。
 ⊕ 25 町の若衆と火方の会話。（210～211／10）
 ⊕ 26 火方が訪れたときの様子。（212～213／6）
 ⊕ 27 内部の様子と、主婦と火方の会話（の一部）。（214～216／23）
 ⊕ 28 主婦と火方の会話（の一部）と、主婦の唄。（217～218／20）
 ⊕ 29 主婦と火方の会話（の一部）。（220～221／9）
 日 11 部屋へふみ込む火方。（13）
 ⊕ 30 主婦、娘、火方の会話（の一部）。（221～223／23）
 十三 総督府本陣へ
 45 火事の半鐘に戦と早合点する郡上兵。
 46 嘆願のため続々と総督府へ向かう百姓たち。
 47 （二月十三日）郡中会所総代、総督府へ行き、郡上藩の件で嘆願。
 十四 絶望と歓喜
 48 郡中会所での百姓たちのおしゃべりと謎かけ。
 日 12 百姓たちの会話（の一部）。（13）
 ⊕ 31 百姓の即興の唄。（250／6）
 49 （二月十六日）郡中会所総代、再度の嘆願に総督府に行くが、そこで郡上藩お預けを言い渡される。
 日 13 嘆願書。（5）
 50 竹沢、急遽飛驒取締役を仰せつかった旨、総代に報告。
 日 14 嘆願書（の一部）。（18）
 ⊕ 32 急遽取締役を仰せつかった経緯。（258／5）
 十五 竹沢の夢
 51 （二月十八日）郡上藩退去し、数日後竹沢、脇田頼三を伴ない帰陣。
 ⊕ 33 郡上藩退去の様子。（260～261／19）
 日 15 郡上藩へのいやがらせ。（22）
 ⊕ 34 郡中会所、二十箇条の請願を提出。（262／8）
 52 竹沢の行なった種々の政策。
 53 山々に臨んでの竹沢の感慨。
 ⊕ 35 高山の風景（の一部）。（267～268／6）

改めていうまでもないことだが、『山の民』という作品の改稿は執拗にしていたことである。大きく三度の改稿を行ない、そのつど大幅な改稿を行なっていることはいうまでもなく、極めて細かい部分にまで徹底して手を加えている。小さな点を問題にすれば一ページごと、いやほとんど一行ごとといってもいいすぎではないほどの改稿が行なわれていたのである。いうならば、そのすべてを明らかにするにはまさに全文を対照する以外にはないのである。それぞれの本文を単位に分け、その単位レベルでの比較という方法を取ったのはそのためであった。そのことによって、全体の基本的な変更を明らかにするのが本論の目的であったことは改めて確認するまでもない。その補足という意味で、本稿では単位内における変更について検討するわけだが、述べたような事情から、その変更のすべてを取りあげることが不可能に近い。小さな変更は割愛するほかはなく、今まとめ

たものにもそれは除外してあることをあらかじめ断わっておく。

二

はじめに構成の変更を検討する。すでに述べたように、構成の変更は他に比べて著しく少ない。第一編から第一部への改稿において、やや大きな変更といえるのは四箇所ある。第一の変更、すなわち△1は26の最後の部分である。鎮撫使先発隊の警護としてやってきた郡上藩の一部が退去したあと、竹沢寛三郎を隊長とする鎮撫使先発隊と、家老鈴木兵左衛門率いる新たな郡上藩の兵士が高山に入る。そこで次のような記述がなされる。

彼等（郡上兵——引用者注）は御坊照蓮寺に本陣を置いた。この御坊は、その山岳のやうな、巨大な、どつしりしたこけら葺の屋根をもつて町々を威圧してゐたばかりでなく、飛州総百姓の信仰の白熱した焼点ともなつてゐた。もとより本堂にある阿弥陀如来の本尊や開祖上人の御影などは、逸早く他へ移してはしまつたが、ここを旧敵に占領されて、人々はもつとも神聖なものを冒瀆されたやうに感じた。

「やれ／＼、」人々は呟いた、「たつたけさ郡上兵を川上筋へ送り出したと思つたら、又新手が益田筋から入つてござつた。今度は家老がついてござるで、ちつとやさつとでは動かぬかも知れぬぞ。」

地の文である前半と会話を中心とした後半の二段に分かれているが、初稿ではそれが逆になっている。つまり、学会版において前後を入れ替えたというわけだが、なぜそうする必要があるのかはよくわからない。人々が嘆く理由をはじめに説明し、そのあとに具体的な嘆きの会話を提示するという意図があつたといえるかもしれない。だが、いずれが構成としてすぐれているかはにわかには判断することはできないであろう。

第二の変更△2は、34のはじめの部分である。町会所や郡中会所では何とか

郡上藩を追い出したかった。むろん、それは飛驒のすべての人々の希望であつた。郡上藩はどさくさにまぎれて飛驒横領の野心があるとの噂も広がつていた。幕府の直轄領であつた飛驒の人々は朝廷の直支配、すなわち天領になることを強く望んでいたのである。初稿ではそのようなことが記されたあとに、町会所と郡中会所の役員たちが集り対策を協議するという記述があつた。

そして、宮之前村久兵衛、甲村孫助、押上屋市次郎等、数名のものが、さつそく町会所へ出かけて行つた。その広い奥座敷では、矢島、矢貝、川上の三町年寄が、数名の組頭と額を集めて、同じ問題を繞つて相談に耽つてゐた。ここで、町会所と郡中会所とが一緒になつて、対策を熟議した。

学会版ではそれが、先に述べた記述の前におかれており、ここでも前後を入れ替えるという形になっている。まずは人々が集まり郡上藩対策を協議するという記述を持つてきて、なぜにそれほどまでに郡上藩を追い出そうとしているのかといった事情をあとから記すという形になっているのである。ここでの変更はおそらく、それらの記述の直前にあつた記述が学会版では省かれていたことと関わっており、のちにその部分を検討する際に考える。

ところで、引用した初稿部分に相当する学会版における記述は次のようになっていた。

その晩、町会所の奥まつた一部屋で、町年寄矢島、屋貝、川上の三人を始め、数名の組頭、それに郡中総代宮之前村久兵衛、甲村孫助、押上屋市次郎等がほの暗い行燈のかげに額を集めて、ひそ／＼相談に耽つてゐた。云ふまでも無く、竹沢の示唆によつて、対郡上藩の方策を練つてゐたのである。

初稿では、宮之前村久兵衛をはじめとする郡中会所の総代が町会所に出向くところから記されているが、学会版ではすでに協議がはじまつている。また、その関係からか学会版では町年寄三人の名前が先に記されているというちがひもある。

その他細かな変更は多々指摘し得るが、すでに述べたようにこの程度の小さな変更は取りあげない。ただ、いかに細かい部分にまで手を入れていたかの一例を示すためにあえて引用した。

第三の変更△3は36にある。竹沢寛三郎は、人々が望んでいたように飛驒の天朝御領を宣言し、加えて年貢の半減、その他運上等の軽減を約束するというのがそのおおよその内容であるが、ここでの変更はやや複雑である。この36は、内容的に大きく四つの部分に分けることができる。

- 一 竹沢が各所に高札を立て、飛驒の天朝御領を宣言する。
- 二 飛驒統治に関する竹沢の考え。
- 三 竹沢、町会所と郡中会所の総代を呼び、年貢半減、その他運上等の軽減の方針をいわたす。
- 四 美濃にあらわれた赤報隊に言及しての竹沢の行動について。

初稿ではほぼこの順番に記されている。ただし、三における最後の部分、「総代たちは、仁政の有難さに、思はず涙を流した。額を畳の上にすりつけた。中には、両手を合せて、竹沢を拜むものさへあつた。実際、彼等の目には、竹沢の背後に燦爛と後光が射してゐるかと思はれた。」という、総代らの喜びをあらわした短かい記述は四のあとに置かれている。それを三の下とし、それ以外の前の部分を三の上とするならば、厳密には一、二、三の上、四、三の下の順に並んでいたことになる。それが、学会版では一、三の上、三の下、四、二の順に改められるのである。

ここでの変更は明らかに改善というべき効果があらわれていると見ることが出来る。学会版では三の上のあとにすぐ三の下を置くことで、いわば三としてひとつにまとめられた形になる。竹沢が年貢半減、その他運上等軽減の方針をいわたし、すぐさまそれに狂喜する総代らの様子を描くのがやはり自然というべきであろう。初稿では、それが四をはさんで最後にぼつりと記されている感じが否めず、分離した印象はぬぐえない。作者もおそらくはそう考えたのであろう。

もうひとつは二をあとの方に持ってきている点である。二は飛驒統治に関する竹沢の考えを記してある部分である。これをあとに持ってきたのはおそらく、天朝御領の宣言に加え年貢等の軽減というふたつの大きな政策を記述したあとに、それらに関する竹沢の考えを記す方がよいと考えたためであろう。さらには、そのことよつて四の竹沢の行動についての記述とそれが連続して記されることになり、おそらくはそのことも考慮に入れてのことであつたであろう。それによつて、確かによりすっきりとした構成になつていたといえるであろう。ただ、二を是非とも四のあとに持つてこなければならなかつたどうかは疑問が残る。四の前に置いても特に不都合はないと考えられるからである。いずれが構成としてすぐれているかはやはり、にわかには判断し難いであろう。

最後に第四の変更△4であるが、それは43にある。ここも△1、△2の場合と同様な前後の入れかえである。高山には、裏町の狭い路地に細民窟が存在していたことがまず紹介される。次に、そうしたなかに向どん屋等の看板を掲げているかがわしい店があつたことが記されている。初稿ではそのような順で記されていたのだが、学会版では細民窟に関するはじめの記述があとにまわされ、うどん屋についての記述が前にきているのである。一般には初稿の方がごく自然な展開といえるであろうが、学会版が特におかしいとはいえないであろう。だが、ここもまた先に述べた△2の変更の場合と似たような事情があつた。先には省略であつたが、ここは追加である。すなわち、ここもまた直前に新たな記述が加えられており、ここでの変更もおそらくそのことと関わっている。先と同様、のちにその部分を検討する際に考える。

次に新たに加えられた部分を検討する。新たに加えられた部分はかなりの箇所へのぼり、ひとつひとつ取りあげていくのは効率性に欠けるであろう。まずは大雑把に分類する形で見ていき、特に問題となると考えられる部分のみをのちにまとめて検討することにする。ただし、省かれた部分をも見たあとにである。新たに加えられた部分と省かれた部分は互いに関連性を持つていている場合が少なくないからである。

新たに加えられた部分でまず目立つのは会話の記述である。⊕7、⊕12、⊕13、

⊕ 14、⊕ 18、⊕ 19、⊕ 20、⊕ 21、⊕ 25、⊕ 28、⊕ 29、⊕ 30の十二箇所、全体のほぼ三分の一を占める。⊕ 20は一人の発言であり、発話というべきかもしれないが、一応会話として扱う。これらはむろん一部地の文を含んではいるが、すべて会話を中心とした記述である。そして、これら会話の記述にはひとつの特徴があった。それらは新たな会話場面を創出するものではなく、もともとあった会話の記述をいわばふくらませるような形で加えられたものだったことである。例外は⊕ 25のみである。これだけは新たな会話場面の創出であった。それらのような記述をあえて加えたのは、作品全体として会話場面をより豊かにしようという意図があったためであろう。もちろん、それが本当の意味でより豊かといえるような記述になっていたかどうかはまた別の問題である。その点についてはいちいち検討することはしない。

次は風景の記述である。⊕ 1、⊕ 2、⊕ 11、⊕ 35がそれである。これまでに何度か言及したが、『山の民』の改稿過程に関する唯一の研究である『江馬修論』（おうふう、00・2）において永平和雄は、初稿から学会版への改稿において新たに加えられた重要なもののひとつに、風景描写をあげていた。永平は自然描写あるいは情景描写といていたが、むろんそう呼んでもかまわない。永平は、自然描写は第二、第三の改稿を通じて一貫しており、学会版においてその確かな基礎が据えられたのであると述べている。加えて、その自然描写が『山の民』の大きな魅力であるところがかえし述べていた。だが、わかるように、新たに加えられた風景の記述は意外と少ないのである。もちろん、単位レヴェルで追加された部分にも風景の記述を含んだものがあつた。だが、永平がいうほど多かったわけではないのである。先の会話の記述と比べればそれは歴然としている。会話の記述に比べれば、むしろ少ないといってもよいほどなのである。付言しておけば、そのことは第二編から第二部への改稿においてもいえることである。

永平は新たに加えられた風景描写として、作品冒頭部分の記述を取りあげていた。初稿では冒頭、「慶応四年、正月二十三日、真夜中。」という記述のすぐあとに、一挺の早駕籠が高山の町に乗り込んでくることが記されている。だが、学会版では冒頭一文の次に、霧に包まれた高山の風景が記されている。それが⊕ 1の

部分である。永平はその追加を高く評価するわけだが、確かにこの部分は一定の効果もあげているといつてよいであろう。それは、残る⊕ 2、⊕ 11、⊕ 35の部分にもあまねくいえることであろう。だが、くりかえしになるが風景の記述の追加は、少なくとも単位内におけるそれは四箇所にすぎず、会話の記述とは比べようもないのである。学会版において風景の記述を意図的に加えようとしていたことは確かであろう。しかし、それ以上に会話の記述を加えることに意を用いていたことは疑いようがないのである。

風景の記述にいわば準ずるものとして、種々の場面におけるあたりの様子の記述、さらには人々の様子の記述をあげることができる。人々の様子の記述は風景の記述とはむろん性質を異にしているといえるが、しばしばあたりの様子の記述と一体化して記されているのでまとめて取りあげることにする。⊕ 4、⊕ 6、⊕ 8、⊕ 9、⊕ 22、⊕ 26、⊕ 27、⊕ 33がそれにあたる。風景の記述の場合と同様、それもまた一定の効果もあげていたといつてよいであろう。それらのなかには一部会話の記述を含んでいるものがあつた。⊕ 4、⊕ 27、⊕ 33の三つである。会話以外の記述を多く含むゆえに、先にあげた会話の記述からは一応除外した。それらについてはのちに別個検討する。

次に見るのは、いくつかがのことからに関する説明とでもいうべき記述である。⊕ 3、⊕ 16、⊕ 23の三つだが、⊕ 3は飛驒の地役人について、⊕ 16は藁づかい小屋と夜ばいについて、そして⊕ 23はうどん屋を装う密淫売についての説明である。飛驒地方固有のというわけではないが、いずれもが飛驒における制度、慣習、風俗等に関する説明である。小説を読み進める上ではやはり理解を助ける説明として有効であろう。これらのなかにも一部会話の記述を含んでいるものがある。⊕ 16がそれだが、ここは他の記述とも関わり問題となる部分でもあるのでのちに検討する。

大雑把に分ければ以上の四種になり、残りはその他というほかはないのだが、残る八つのうちの四つにはある特徴を指摘できなくはない。四つといつてもさらに二つに分かれるのだが、⊕ 15と⊕ 31、そして⊕ 5と⊕ 10である。前者はいわば引用の記述といつてよいかもしれない。しかも、いずれもがいわゆる韻文であ

る。⑮は落首、⑳31は唄の一節が加えられている。唄は百姓の一人が唄ったものであるから発話ともいえるが、鍵括弧なしの分かち書きで別に記されているので引用といっても差しつかえないであろう。⑮の落首は一行あけて記されている。唄といえ、先に会話の記述として分類した⑳28にも唄の一節が記されている。うどん屋の主婦が唄ったもので、こちらは一行あけの分かち書きである。

会話部分の最後に記されているので、まとめて会話の記述とした。後者はまたまったく趣を異にする。⑮5は、郡代に先がけて高山を去る妻子らの旅行列に行き会った按摩が描かれている。⑮10は、妻子らに遅れて高山を去る新見郡代の一行が、美女峠で狐に出くわす場面が描かれている。初稿にはむろん按摩も狐も登場してはいなかった。その意味で、学会版において新しい要素が加わったといつてよいのだが、これらはいずれも、いわばエピソード的な記述の域を出ないといつべきであろう。先の⑮15や⑮31を含めて、これらは作者の工夫がうかがえる追加であったといえるであろう。しかし、その追加をどのように評価すべきなのは議論の余地があるであろう。

次は省かれた部分であるが、ここでは先のような分類の形を取らない。新たに加えられた部分に比べればその箇所が少ないということもあるが、そのような分類にあまり意味はないと考えるからである。先のような会話の記述といえるものはいくつもあった。また、その他としたものうちのひとつの特徴として引用ともいべき記述を先には付け加えておいたが、文字どおりの引用といえる記述もあった。だが、それ以外はまさにその他というほかはないのである。分類はそれなりの分類の数と、各分類を構成する要素のそれなりの数を求められることはいうまでもない。

省かれた部分も新たに加えられた部分と関わっている場合があり、それらほのちに検討する。まずはそれ以外のものを簡単に見ていく。㉑1は、郡代の妻子らの旅行列に行き会った年増女が描かれていた。わかるように、これは省かれた部分というよりは差し替えられた部分といふべきかもしれない。先に見たように、学会版では⑮5として旅行列に行き会った按摩の記述が加えられており、要するに年増女を按摩に変えたのである。なぜ年増女をわざわざ按摩に変える必要がある

ったのかはよくわからない。深夜のできごとだったので、按摩の方がよりふさわしいと考えたのかもしれない。

㉑2は、郡上藩による飛驒の百姓鎮庄の様子が描かれていた。ただし、それはほぼ百年前にさかのぼる安永年間に起った、いわゆる大原騒動におけるものである。飛驒の人々が郡上藩を敵にしていたのもこのできごとがあったからだ。この部分が省かれたのは少々残酷な記述だったためであろうか。だが、他の部分にも同様な記述がなかったわけではないことを考えれば疑問は残る。

㉑3は、百姓たちをのしる新見郡代が描かれていた。飛驒を去る直前の陣屋での発言である。「飛驒の百姓と言へば、昔から無知で、馬鹿な癖に、強情で、分らず屋で、おまけに悪狡い奴らと聞いてある。」と悪態をつき、「こんな大事の際にそんな無法な強訴を企てるなんて！これが平時なら奴等をみんな牢屋へぶちこんでやるんだが！」とうそぶくのである。新見は、全体としてはむろん肯定的に描かれている人物ではなかったが、このようなことは少々軽薄にすぎると考えたのではなからうか。

㉑5もそれと似たような事情による省略であったと考えられる。ここは竹沢の発言である。地役人や郡中総代らを前にして竹沢は、郡上藩の藩主青山峯之助が本当に天朝の味方かどうか疑わしいと述べ、郡上藩の飛驒への出兵も家老らの取り計らいにすぎないと発言するのである。この部分が省かれたのも、やはり少々軽率な発言だったからではなからうか。竹沢のことは根拠があったわけではなかったからである。竹沢は最後に、「もちろん、これはこゝだけの話じゃが……」と加えていた。そう述べたからといってむろん軽率さは回避できるものではなく、むしろそれを助長するものであったといふべきであろう。

㉑6は嘆願書の一部の引用であり、同様なものに㉑13、㉑14がある。ただし、㉑14は全文の引用であり、㉑13は㉑6と同様一部の引用である。学会版でもむろん嘆願書に関する記述はあり、その内容も簡単ではあるが記されていた。であるなら、引用されようがされまいが大した問題ではないといえる。ただ、嘆願書の引用は他にも何箇所もあり、それらが残され、この部分が省かれなければならぬという理由は考えづらい。

曰7は、総括的説明とでもいうべき記述である。飛驒の天朝直支配を求める諸々の動きを指して述べられたものだが、たとえばその動きを、「統一的な、中央集権的な国家の一部として、その直接の支配の下に立たうとする進歩的な運動」と説明していた。飛驒の人々にそのような意識があったとはどうい考えられないことはいうまでもないが、客観的に見てもそのような説明には無理がある。おそらくは作者もそう考えたのであろう。

以上、単位内における変更を大雑把に見てきた。次に、これまでには触れなかった、あるいは保留しておいたものについて検討する。

第一部には、変更箇所が比較的集中している部分が多くあるが、そのうちのひとつ、単位番号でいえば37から39にかけての部分には、これまでに触れなかったものもまた集中している。まずはその部分をまとめて検討する。

37から39の部分には、⑩16、⑩17、⑩18、それに⑩8、⑩9、⑩10と、追加、省略それぞれ三つずつが存在する。⑩16と⑩18を除いて、これまでまったく触れなかった。⑩18も会話の記述として指摘しただけであり、⑩16もことさらに説明する説明の記述として取りあげ、のちに検討するとして保留してあったものである。

この部分は、年貢半減、その他運上等軽減の情報を聞いた広瀬村五郎作が、家に帰る途中藁つかい小屋に立ち寄り、そこに集まっていた若者たちにもそのことを伝え、家に帰ってから女房に教えるが、そこに夜ばいに来ていた他村の若者に出くわし、その若者ともその話しになるという内容である。⑩17は、五郎作がある通夜の席で年貢半減等のことを知ったことが記されている。初稿にはこの部分がなかったわけだが、しかしどこで知ったかが記されていないわけではなない。初稿では寄り合いに出かけ、そこで知ったことが記されている。それがすなわち⑩8であり、学会版ではそれを省いたのである。であるなら、それは差し替えともいえるのだが、単なる差し替えとはいえない事情がそこにはあった。学会版では、五郎作がそれを知る記述は38のはじめに置かれている。すなわち、藁つかい小屋に立ち寄り若者たちに伝える記述のあとに記され、時間的にはさかのぼった形で記されている。ところが、初稿では藁つかい小屋の記述の前、五郎作に

関する記述のはじめに置かれていたのである。もうひとつのちがいは、初稿すなわち⑩8が会話を中心とした記述であったのに対して、学会版ではそうではなかったことである。会話も一部含んではいたが、会話を中心とした記述とはいえず、初稿とは明らかに異なった書かれ方になっていたのである。

会話を中心とした記述をなぜ変える必要があったのか、また、寄り合いの場をなぜ通夜の場に改める必要があったのかはよくわからない。会話を中心とした記述ならば、通夜よりは寄り合いの方がよりふさわしいといえないこともないが、むしろそれで解決がとくわけではない。ただ、通夜の場にすることで初稿では描かれなかった人々の心情といったものが描かれていたという側面がなくもない。通夜が行なわれていたのは組頭の家であった。その九十一歳になる隠居が亡くなったのだが、主人の組頭は涙を流しながら次のようにつぶやいていた。「うちの隠居も九十一まで生きてをつたし、年にちつとも不足は無いのじやが、せめてもう一日生かして置いて、この有難い話を聞かせた上で死なせたかつたぞ。」年貢等の軽減がいかに大きな喜びであったのかがあらわれていると同時に、せめてもう一日生きていけばという無念さがよくあらわれているといつてよいであろう。だが、そのことが通夜の場に変えた決定的な理由とはいえないであろう。

一方、五郎作が年貢等の軽減を知る記述が藁つかい小屋の記述のあとに置かれたのは、もうひとつの追加⑩16と関わっている。すでに述べたように、⑩16は藁つかい小屋と夜ばいに関する説明の記述であった。その説明のあとに、ある晩の藁つかい小屋に集まる若者が描かれ、若者たちの会話の記述があったのである。そして、若者たちの会話の話題はもっぱら夜ばいについてであった。そこにちやうどやってきたのが五郎作で、聞いたばかりの年貢半減、その他運上等軽減の情報を若者たちに伝えるのである。もつとも、若者たちはそれを信じようとせず、酒に酔ったたわごととして五郎作をまともに相手とはしなかったのであるが、ともあれ、そのような展開にした以上は、五郎作が情報を知る記述はあとになって不思議はないであろう。時間をさかのぼる形で記されることには何ら問題はなく、むしろ効果的な場合が少なくないことはいうまでもない。この部分もまた、その効果的な場合のひとつであったといえるであろう。実は初稿にお

いても、厳密に言えば同じような書かれ方がされていたのであった。述べたように、初稿では五郎作が情報を知る記述は薫づかい小屋の記述の前にあったことは確かである。ただ、その部分の最初には、闇夜の田圃道を一人歩いていく五郎作が描かれていた。その五郎作が、今しがたのできごとを想いだすという形で、続けて寄り合いの場面が描かれていたのである。やはり時間をさかのぼる形で記されていたことでは同じだったといえるのである。

五郎作を中心とした記述の部分にはまだ④18の追加と、④9、④10の省略二つがある。いずれも五郎作が家に帰ってからの部分にあり、加えていえばすべて会話の記述である。④18は夜ばいにやってきた若者と五郎作との会話である。二人の会話はかなり長々と描かれているが、その一部に次のような記述が加えられていた。

「さつき村でえらい唄つて騒いどる声でしたが、婚礼でもあつたのかえ？」

「婚礼では無い。お通夜じゃ。」

「お通夜——葬式の？」

「お通夜なら葬式にきまつとるがのう。」

「ほーう。」若ものは円い眼を一層まるく見開いた。「広瀬村じゃ、お通夜の

晩に唄つて騒ぐのか？」

「今夜のお通夜は特別なんじや。汝もよばひばかりしくさつて、まだ何にも知らぬと見えるナ。」

軽いおかしみを含んだ二人の会話だが、ここでお通夜に言及する記述を持ってきたのは、先に見た寄り合いの場を通夜の場に変えたためであったといえるであろう。だが、ここは是非とも通夜でなければならなかったというわけではない。婚礼と見まがうような唄い騒ぐ場面は他の場所でもかまわず、むしろ寄り合いの場でもかまわない。ただ、五郎作が情報を聞いた場所を通夜の場に変えたのに合わせてここにそれを持つてくることで、今見たような軽妙な会話を作り出すことができたのである。

ところで、初稿でも実はこれと似たような記述があった。

「さつきなア、村でえらい唄つたり踊つたりしてをつたが、婚礼でもあつたのかい？」

「それどころか、お正月とお盆と婚礼と一しよにやつて来たのよ。汝アよばひばかりしくさつて、まだ何にも知らんと見えるな。」

この部分が、実は④10とした記述である。はじめの若者のことばが先に見た若者の最初のことばとほとんど同じであり、また、あとの五郎作のことばの後半が先の五郎作のことばのやはり後半とほぼ一致していることを考えれば、ここは省かれた部分というべきかもしれない。先の記述のほぼ最初と最後の発言を除いた部分の追加とすることで済むことではある。ただ、先の引用部分はひとつのまとまりを持った記述なので、このような形の扱いにした。したがって、差し替えとして扱うこともむろん可能である。

残るのは④9の省略であるが、これは五郎作の発言である。やはり若者とのやりとりのなかで発したことばであるが、この五郎作の発言だけが省かれているのである。夜ばいについて語っているのだが、それが省かれたのは少々露骨な表現であったためであろうか。だが、この部分が他の同様な記述に比べて著しく露骨といえるような表現であったかどうかは疑問である。

変更箇所が集中しているということでは、今見てきた部分よりも43から44にかけての部分にはなほだしいが、その多くはすでに触れた。しかし、まったく触れていないものもある。④24と④11の、追加、省略それぞれひとつずつである。加えていえば、やや立ち入って検討しながらも保留しておいたものがある。△4の構成の変更である。ここではそれらを中心に検討する。

まずは△4の構成の変更から見えていく。ここは単純な前後の入れ替えであった。変更した学会版が特におかしいというわけではないが、初稿の方がむしろ自然な展開だったといえるのではないかと述べた。そして、わざわざ変更したのはおそらく、直前に新たな記述が加えられたことと関わっていることを指摘しておいた。

その記述とは②3である。ここは、ことさらに関する説明の記述としてすでに触れた部分である。うどん屋等を装う密浮売についての説明であったが、学会版ではそのような記述が加えられることによって、それにすぐ続く形でいかがわしいうどん屋に関するやや具体的な記述が記されていたのである。その関係上、そのような店が存在する裏町の細民窟に関する記述があとにまわされたと見ることができる。初稿では、まず細民窟に関する記述があり、次にそうしたなかにうどん屋等の看板をかかげるいかがわしい店があったことが記されていた。その部分だけならば、初稿の方が自然な展開といえるであろうが、新たな部分の追加によって構成を変更した学会版もまた、当然の展開になっていたということができよう。

②4はこれまでにまったく触れなかった記述だが、これは今見た記述にすぐ続けて記されている。すなわち、②3、初稿の記述の前後を入れかえた部分、そして②4の順に並んでおり、それらが43を構成しているのである。うどん屋へ通う郡上兵を憎む人々がそこには描かれているのだが、この追加は、その前までの流れからいっても、また次の44で描かれる内容から考えても何ら不自然な記述ではない。そこには、お光姉妹のいるうどん屋にも言及があり、44への橋わたしのような役割もはたしていたといえるであろう。ただ、是非とも必要な記述であったかどうかは疑問がないわけではない。というのは、そのような記述がない初稿でも、特に不十分な印象は受けにくいからである。初稿では、「郡上の兵士が、かういふ家へちよい／＼出入するらしい事が分つて、忽ち町の評判になつた。」とだけ記されていた。この部分をいわば大幅にふくらませる形で②4の記述はできあがっていたといえなくもないのだが、初稿におけるこのような記述でも十分であったとも考えられるのである。先に会話の記述の追加について述べた際に、そのほとんどすべてがもともとあった会話の記述をふくらませる形で加えられたものであったことを指摘したが、それらも真に必要なものであったのか疑問なものがないわけではない。記述を増せばより豊かになると限らないことはいうまでもない。ただ、その判断は微妙である場合が少なくない。先に、いちいち検討することをしないとしたのはそのためである。今見た部分もまた微妙といえるであろう。

ところで、43に続く次の44の冒頭には②5が加えられている。会話の記述としてあげたもののひとつであるが、これのみが新たな会話場面の創出という唯一の例外であることを指摘しておいた。ここは、町の若衆と火方の会話である。お光姉妹のいるうどん屋へ郡上兵が入ったことを報告しにやってきた町の若衆とそれに應對する火方が、会話を中心として描かれている。以下、お光姉妹の家へ踏み込む火方たちの記述が続いていくわけで、いわばその前段階としてこのような会話の記述は有効であったといえるであろう。会話場面をわざわざ創出するまでして加えた意図をおしはかるにはかたくはない。ただ、そのような記述のない初稿を不十分といい切ることはやはりためらわれる。初稿でも、「或る晩、数名の郡上兵がこの家へ上りこんで、飲んだり騒いだりしてゐるといふ報知が、御坊前の非常詰所にゐた火方たちの耳に入った。」と記されており、このような記述だけでは不十分とはいいたくないからである。

これまでに触れなかったものにもうひとつ、②11の省略がある。お光姉妹が寝ている部屋に火方らが踏み込んでいく場面であるが、そこで火方らは郡上兵を發見する。見つかった郡上兵の一人は「何を致す！ 無礼を致すと容赦せぬぞ。」とわめき大小を探していたが、もう一人の方がいきなり逃げ出したのを見て、急にそのあとを追って逃げていくというのがおおよその内容である。学会版ではその部分が省かれた。すなわち、学会版では火方らが郡上兵を發見する場面はなく、火方らが踏み込んだときにはすでに郡上兵が立ち去つたあとであることになっているのである。いずれの展開がすぐれているかはにわかには判断することはできないであろう。ただ、火方と郡上兵を対面させ、逃げていく郡上兵を直接描くよりも、すでに去つたあとを描くことでそのことをいわば間接的に表現する方がよいと作者が考えたことは確かである。そして、そのような書き方をするることによつて、たとえば次のような会話が生まれることにもなつたのである。

あばたの火方は居直り気味で言つた。

「郡上が居らねば居らぬで構はん。己達ア侍に用がある訳でない。己達ア貴様たちに言ひたい事があるんじや。一躰貴様達ア……」

その時、若い火方の一人が提灯をもつて、部屋の片隅にある小さい床の間に近づいて、紋付の男羽織と、その下に隠された赤鞆の大小を取りあげた、そして勝誇つて叫んだ。

「こゝにこんなものがあるぞ！」

「郡上が逃げ出す時よほどあはてたと見えるナ」もう一人の火方が愉快さうに言った。

「これでも郡上が来なんだと云ふのか。」あばたの火方はいきなりお銀の脇腹を足蹴にしてどなつた。

これは会話の記述としてあげた③0の一部である。残された赤鞆の大小から郡上兵が来ていたことをつきとめ、それまでしばらくお銀と母親の嘘をあげたのである。ちなみに、引用中の「お銀」はお光の妹である。念のためにいっておけば、ここは新たな会話場面の創出ではない。初稿にも姉妹、母親らと火方たちの会話場面はあり、その一部としてこのような記述が加えられていたのである。

43 から 44 にかけての部分の、これまでに触れなかった、あるいは保留しておいたものを検討した。加えて、②3の説明の記述、②5や③0の会話の記述についても補足的に検討した。だが、この部分ではもうひとつだけ触れておかなければならないものがある。②7である。あたりの様子の記述あるいは人々の様子の記述としてあげたもののひとつであるが、この部分には会話の記述もあつた。会話以外の記述を多く含むゆえに会話の記述からは一応除外したのだが、そこに加えられていたのは姉妹の母親と火方の会話であり、初稿にもあつた会話をふくらませるような形での追加であつた。付け加えていっておけば、ここでの様子の記述とは主としてお光姉妹の家の内部の様子である。母親や火方の様子に関する記述もあり、それらは一体化して記されていたといつてよいのだが、内部の様子はたとえば次のように記されていた。

最後に二人の目は、彼等のうしろに立つてゐる二枚折の低い衝立屏風の上に

止まつた。ひどく煤けて、かなり古いものらしいが、そこには嬌めかしい美人の姿態のいろ／＼を描いた江戸絵が一ぱいに張つてある。しどけない寝間着すがたで青蚊帳を吊つてゐる美女があり、豊かな乳房をくつろげて赤ん房に吸はせてゐる年増があり、また赤い湯巻ひとつで裸の海女が波にもぐつてゐる場面などがある。

うどん屋を装うあやしげな店の様子がよく描かれていると同時に、この晩やってきた郡上兵のいかかわしい行為をも暗に示す記述といつてよいであろう。様子の記述は一定の効果をあげていたといえるところには述べたが、この部分もその例外ではない。そして、このような記述のあとに先の母親と火方の会話が記されていたのだが、その会話は次のようなものであつた。

「お前は若い時分にアずみ分男を騒がせたもんじゃないやろ。」

「それア、ちつとはナ、ほつ／＼。」

「いや、今じやつて分らんぬ。皺はあつても美しいでなア。」

「ところが、わしのやうな婆さんは亭主が無うても誰も相手にして呉れぬ事よナ。」

「何を言つとる。きまつた亭主ひとりよか、何人でも浮気しとる方が良えのじゃろ。」

火方は冗談にまぎらわせながらも、秘密の行為の方へと何げなく話を持っていくとしてゐるのだが、先のような、あたりの様子の記述がこのような会話の記述をも生んだといえるのではなからうか。

次に検討するのは③2の追加である。第一部の最後の方には、竹沢寛三郎をはじめ郡中会所や町会所の総代、それに地役人らが大垣にある総督府へ行き、郡上藩退去、天朝直支配を求めてくりかえし嘆願を行なつていたことがかなり長々と記されていた。学会版では、「追繩願」と称して続々と総督府へと向かう百姓たちに関する記述が新たに加えられてもいた。46がその部分で、これは単位レヴェル

での追加であった。しかし、再三の嘆願にもかかわらず、飛驒は自分のあいだ郡上藩のお預けという決定が下されたのである。総代らは愕然とするが、それでも嘆願をくりかえすことをやめなかった。そんななか、急遽竹沢が飛驒取締役に決まったことを知らされるのである。総代らの喜びようはいまでもないが、何とも急な展開ではある。郡上藩お預けをいわれたその日のできごとだったからである。新たに加えられた⊕32は、急にそのようなことになった事情を説明したものであった。つまり、初稿では何の説明もなかったわけで、それは極めて適切な、というよりは当然行なわれてしかるべき追加であったということができる。

竹沢が取締役に決まり、郡上藩は飛驒から退去することになる。あたりの様子や人々の様子の記述としてすでに指摘した⊕33の追加は、その郡上藩退去の様子が記されていた。その最後の部分に、郡中会所での人々の会話、というべきかひとりの発言というべきかは微妙なのであるが、描かれていた。郡上藩退去の様子の記述が中心になっているので、ここも会話の記述からは一応除外したのだが、そこで述べられていたのは郡上藩への悪口であった。念願の郡上藩退去が実現したあとの、満足と喜びにみちた威勢のよいことばでそれはあったが、初稿ではこの付近に別な記述があった。学会版ではそれが省かれたわけだが、それは一言でいえば郡上藩に対するいやがらせに関する記述であった。⊕15がそれである。郡上藩の大砲の「尻のねぢ」を盗んだり、紋のついた高張提灯に火をつけたりしたことが記され、それらの事件を話題にした人々の会話も描かれていた。ただし、高張提灯が燃えたのは郡上兵の過失かららしく、郡上兵が放火されたと思ひ込んだのだと記されていたが、一方人々は強いてそれを否定しようとはしなかったとも記されていた。そのような記述をことさらに省いた理由はよくわからない。少々狡猾にすぎると考えたためであろうか。しかし、この部分だけが特に人々を狡猾に描いていたというわけでは決していないのである。むしろ人々は、すなわち百姓をはじめとするいわゆる民衆は、決して善意の人々としてだけ描かれていたわけではなく、しばしば狡猾でもある人々として描かれており、それがこの作品におけるひとつの大きな特徴でもあったといつてよいのである。

それはさておき、⊕33の記述は、今見た⊕15の省略のいわばかわりとして追

加されたという側面があったと考えられなくもない。郡上藩退去の様子はしかるべき追加といえようが、そのあとに続く郡上藩への悪口に関する記述は、郡上藩に対するいやがらせの記述をいわば別の形で表わしたものと見ることもできるのである。

⊕33の追加の少しあとには⊕34の追加がある。郡上藩退去と入れ替わりに帰ってきた竹沢に、郡中会所が二十箇条の請願を行なうという記述である。このような記述をわざわざ加えた理由もまたよくわからない。その記述の最後の部分には、「御一新、旧弊一洗の号令にも係はらず、彼等の気分はまだ昔ながらに封建的で旧弊で、保守的だつた。」と、郡中会所の請願に対して批判的なことばが記されていたが、そのような批判をするためにわざわざそれを持ってきたというわけではよもやあるまい。郡中会所や町会所、あるいは地役人に対する批判的な記述は他にも決して少なくなく、ここでことさらに加えなければならぬという必然性はないといわざるを得ない。だが、ひるがえって考えるならば、加える必然はないと同時に加えない必然もまたないといべきであろう。理由がよくわからないといったのはそのためである。これまで見てきたものなにもそのような記述は少なくなかった。そして、そのことは単位内における変更のひとつの特徴であったといつてよいかもしれない。単位レヴェルの変更には、そのようなものはごく限られたものを除いてほとんどなかったといつてよいからである。まずは単位レヴェルの変更を明らかにし、そのあとで補足的に単位内における変更を検討するという方法を取ったのはそのためでもあった。

残るのは⊕4と⊕12の二つの省略部分である。加えていえば⊕4の追加と構成の変更△2も保留しておいた部分である。やや断片的にはなるが、最後にこれらについて検討する。

まずは△2の構成の変更を検討する。ここは単純な前後の入れかえであったが、その変更はおそらく直前の記述の省略と関わっていると指摘しておいた。その省略された部分が件の⊕4である。ここは、町年寄の矢島善右衛門から郡中会所に、相談事があるので集まってほしいとの連絡があったことが記され、さらには今しがた矢島と会ってきたばかりの久左衛門という人物が、矢島の話しを人々に伝え

るという記述があった。矢島の話とはむろん郡上藩に関する事で、郡上藩は飛驒を自分たちの所領にしようという野心を持っているらしいという噂についてであった。初稿ではそれにすぐ続く形で飛驒の人々はもともそのことを警戒し何とか郡上藩を追い出すことを考えていたこと、そして朝廷の直支配すなわち天領になることを強く望んでいたことが記されていたのである。そしてそのあとに、矢島から呼ばれた郡中会所の人々が町会所に出かけていき、郡上藩対策を協議するという記述が続いていたのである。

郡中会所の人々が矢島に呼ばれてから町会所へ出向くまであいだに、人々の郡上藩に対する警戒と天領への希望についての記述がはさまっている形になっているわけだが、流れとしては何らおかしな展開ではない。だが、学会版でははじめの部分、曰4の記述が省かれてしまった。すなわち、相談事があるので集まってほしいとの連絡があったという記述が省かれてしまったのである。おそらくはそのために、町会所での郡上藩対策の協議の場面をいきなり最初に持ってきたのである。当然のことながら、人々の郡上藩に対する警戒と天領への希望に関する記述はあとになるわけだが、それはなぜ人々がそれほどまでに郡上藩を追い出そうとしているのかの理由をあとから説明するという形になり、それはそれでひとつの展開のあり方であったといえるであろう。△2の構成の変更はやはり曰4の省略のためであったといつてよいのである。

だが、ひとつの問題が残る。それは、なぜことさらに曰4を省く必要があったのかということである。省かなければ、もとより構成を変更する必要もなかったのである。この部分をどうしても省かなければならなかったかといえ、それはやはり疑問と言わざるを得ないであろう。ただ、町会所での集まりの場面の前に、その集合をうながす矢島からの連絡をわざわざ記すのは無駄とはいわないまでも、やや余計な手続きという感じがしないでもない。また、矢島からの連絡に加えて久左衛門が同じ矢島の話しを伝えにやってくるというのも重複の感を消しがたい。この部分を省いたのはおそらくそう考えたためではなからうか。

次は曰12の省略である。ここは百姓たちの会話の記述である。学会版において新たに加えられたもので最も多かったのが会話の記述であったことはすでに指摘

した。その会話の記述のほとんどすべてが、もともとあった会話の記述をふくらませるような形で加えられたものであったこともすでに述べたが、この部分はいわばその反対のケースになる。すなわち、初稿にあった会話の一部を省いたのであり、そのようなケースはここだけだったといつて差しつかえない。曰3、曰5、曰9が似たケースであったといえるが、すでに見たようにこれらは一人の発言であり、厳密に言えば会話ではなく発言である。また、曰8、曰10、曰11は会話を中心とした記述ではあったが、曰8と曰10は差し替えといつてもよく、いわばその代替としての記述が加えられており、曰11はある場面全体の省略であり、会話の一部を省略したものでなかった。要するに、会話の記述の一部を省いたのはここだけだったのである。では、なぜそのようなことが行なわれたのであるうか。

この百姓たちの記述は48にある。その冒頭には一通の書簡が引用されている。大垣の総督府へ嘆願に赴いた組頭から町会所と郡中会所にあてたものであるが、思わしい成果を得られず難渋している様子の手紙であった。その手紙のことが話題となり、百姓たちの会話をはじめまるのだが、その会話はほどなく冗談や謎かけなどを含んだ軽妙なおしゃべりと化し、48いっぱい続いていく。百姓たちの会話としては極めて長く描かれている記述のひとつといつてよいが、むろんあまりにも長すぎるゆえに省略したというのではあるまい。省略された部分はいわゆる「追願」を話題にした部分であったといつてよい。地役人をはじめ郡中会所や町会所の総代らは次々と総督府へ行き嘆願をくりかえしていたが、百姓たちも「追願」と称して続々と総督府へと向かっていたのである。百姓たちはそのことを話題にし、さらに多くの人数をかけて嘆願する必要性を説いていた。この部分が省かれたのは、百姓たちの「追願」の様子が描かれた部分が学会版において新たに加えられたためではなからうか。先にも述べたが、単位レベルの追加であった46がそれである。もちろん、そこで描かれたからといって、百姓たちの話題にのぼる必要はないというわけではない。ただ、初稿ではそのような記述がなかったためにわざわざここで話題として取りあげたのであろう。そう考えるならば、ここで省略するという発想もわからないではないのである。そうとでも考えない

限り、ここでの省略は理解できないのである。

最後に検討するのは④4の追加である。ここは様子の記述としてすでに触れたが、一部会話の記述を含んでおり、保留しておいた部分である。作品ははじめの方にさかのぼる。郡代の妻子らが一足先に高山を去ることについては先に触れたが、そのすぐ前には新見郡代が先に出発させる妻子の供を地役人に依頼するが拒絶されるできごとが記されていた。郡代に呼ばれた地役人の吉住礼助と田近孫蔵は気のすすまないまま郡代役所へ出向いたが、そこでいきなり元締の浅井豊助から強く叱責を受ける。郡代役所の明け渡しが決まって、地役人の態度に明らかに変化があつたからである。初稿では浅井のことは皮肉程度の軽いものであつたが、それはともかく、それを聞いた吉住と田近の様子とそのあとのふたりの会話が描かれていたのが、すなわち④4の部分である。初稿では、「吉住と田近は思はず顔を見合せた」という記述があるだけである。したがって、会話部分だけに限るならばここは新たな会話場面の創出ということになる。二人は浅井の剣幕に驚くが、郡代が去ることになつた今、そのことばに威力はなく恐れるに足りないものだったのである。「何にしても郡代が立のくまでの事、——もう一兩日の辛抱じや。せいぐ機嫌よく郡代どのを送り出すことが肝要じやと思ふ。」と吉住はいい、田近は「さうして機嫌よく竹沢殿を迎へる事がナ。」と答える。そのような会話が描かれていた。一夜にして豹変した地役人のありようがよく描かれている会話といつてよいであろう。それは、そのあとに続く郡代とのやりとりにおける慙懃さといふ対照をなしている。さらには、浅井の激しい口調ともまた別の意味でよい対照をなしているといつてよいであろう。初稿では皮肉程度の軽い言い方を激しい口調にかえたのもおそらくはそのためであろう。以上のことから、④4の部分はそれなりに効果的な追加であつたといふことができるであろう。

三

以上で、初稿第一編から学会版第一部への単位内における変更を検討した。第二編から第二部へのそれは次稿で検討するが、本稿の末尾には学会版の人名索引

を掲載する。単位レヴェルの変更の場合と同様、第二編から第二部への変更は第一編から第一部へのそれに比べてその程度がはなはだしく、やや大部になることが予想される。今回人名索引を掲載するのは主として便宜的な理由による。索引についてはいくつか注記しておくべきことがある。

- 一、人名はアイウエオ順に配列し、ページ数は第一部、第二部、第三部に分けそれぞれⅠ、Ⅱ、Ⅲと略記し、その順番に記す。同一ページに複数回出てくる場合も、記すページは一回であることはいうまでもない。
- 二、人名は記載されている限りはフルネームで記すが、そのつどフルネームで記載されているとは限らないことはもちろんである。なお、人名にはいわゆる姓ではない場合がある。村や町の名、あるいは屋号等を冠した場合である。百姓や商人などをはじめとする一般の人々にはまだ苗字がなかったことはいうまでもない。
- 三、人名には（ ）を付して記した場合がある。明らかに同一人物と判断されるが、その表記のちがいを含めて異なっているものである。その場合、いづれを（ ）付けにするかという問題があるが、おおかたは少数の方を（ ）付けとした。
- 四、人物は役職等と呼ばれる場合がある。具体的には梅村速水、新見内膳、靈樹院勝縁の三人であり、それぞれ知事、郡代、連枝と呼ばれる場合である。それらには「」を付し、ページにもまた「」を付して記す。
- 五、人物は同一人物に複数の名がある場合がある。その場合にはページ表記の最後の部分にそれぞれの異名を記す。

人名索引には二百三十あまりの人名が記載されているが、作品に出てくる人物は他にも少なからず存在する。名前が記されていない場合である。人名索引の補足という意味で、次にそれらの人物を記しておく。基本的には作品における記載どおりに記すが、場合によっては「」付けて補足を加える。末尾にはページを記す。なお、基本的には最初に出てくる際の記載にしたがうが、のちにいいかえ

られ、それが頻繁に出てくる場合はへ付でそれをも記す。

第二部

- ・赤ん坊 (4)
- ・たゞならぬ外の様子を覗いてみる者 (4)
- ・炬火持 (5)
- ・人足の一人 (5)
- ・門番の爺 (5、6)
- ・〔寺田潤之助の〕妻 (6)
- ・〔奥田大蔵の〕妻 (29)
- ・お使い (29)
- ・〔安川の〕家内 (30)
- ・迎への使ひ (38)
- ・若い顔立の良い女中 (40)
- ・〔新見内膳の〕奥方 (41、44、II 59)
- ・〔田近孫蔵の〕老母 (43)
- ・〔新見内膳の〕老母 (44)
- ・按摩 (45、46)
- ・小柄な、貧相な、若い百姓 (60、61、63、67、67)
- ・小さい白髪鬚の老百姓 (61、62、63、64、66)
- ・名主らしい老人 (70)
- ・火方の一人 (74)
- ・〔郡中会所〕総代の一人 (77)
- ・近在から奉公に上つてゐた若い女中 (79)
- ・火方の一人 (82)
- ・背の高い若い牛方 (89、90、96、102、103)
- ・五十ばかりの小柄な牛方 (89、90、93、96、99、100)
- ・村役人らしい六十ばかりの老百姓 (93、94、95)
- ・〔茶店の〕老婆 (96、97、98、99、100、102)
- ・大柄な中年の百姓 (97、98、99、100、101)
- ・嬬 (102)
- ・先に立つた飛脚 (105)
- ・もう一人の飛脚 (105)
- ・隊長 (124)
- ・一人の屈強さうな若い侍 (126)
- ・腰の曲つた隠居 (132)
- ・小柄な、はしこい顔付をした火方 (134)
- ・若侍の一人 (138)
- ・〔竹沢寛三郎の〕奥方 (153)
- ・九十一になる隠居 (165、170、171)
- ・瓢箪な、元気な十九くらいの子 (166、169)
- ・八賀村一番といふ綺麗な子 (166)
- ・頑固おやじ (166、167)
- ・若いものゝ一人 (168)
- ・一番年嵩らしい二十三の小柄な百姓 (168、185)
- ・〔広瀬村五郎作の〕死んだ父つあ (175、185)
- ・〔広瀬村五郎作の〕ぢい様 (175)
- ・〔桐山村の〕若者 (179、180、181、182、183、184、185、186)
- ・〔煮うり屋の〕嬬 (201)
- ・江川笠をかぶり、朱鞘の大小をさした三十前後の背の高い侍 (201、202、203、204、205)
- ・〔佐吉の〕母様 (205)
- ・町の若衆の一人 (210)
- ・あばたのある首のひよる長い火方 (あばた) (210、211、214、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225)
- ・女主人 (主婦) (210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、

- ・ 222、224)
 - ・ 別の火方 (212、222)
 - ・ 御坊近くに住む茶商人 (219)
 - ・ 若い火方の一人 (222)
 - ・ 郡中会所の旦那の一人 (232)
 - ・ 一人の若侍 (234、236、239、240)
 - ・ 目上らしい侍 (234)
 - ・ 高原郷の百姓 (243、246、247、249)
 - ・ 「清見村の」中年の百姓 (243、244、245、247、248)
 - ・ 下山中の若い百姓 (243、244)
 - ・ 村の若いもの (244)
 - ・ 「炭焼小屋の」年寄り (244、245)
 - ・ 小柄で、痩せこけた五十位な役人 (253、254)
 - ・ 女中 (257)
 - ・ 「竹沢寛三郎の」成人した長男 (261、II 11、II 40)
 - ・ 「竹沢寛三郎の」供 (267)
- 第二部
- ・ 小柄な十八九の女中 (3、4)
 - ・ 年とつた別の女中 (4)
 - ・ 「益田楼の」亭主 (20)
 - ・ 宿の主人 (55)
 - ・ 「梅村速水の」女中 (59、308、310)
 - ・ 「梅村速水の」母 (60)
 - ・ 「梅村速水の」長兄 (61)
 - ・ 驚くやうに美しい百姓娘 (61)
 - ・ 「桂小五郎の」奥方 (63)
 - ・ 百姓くさい娘 (67、70)
- ・ 「吉住弘之進の」妻 (71)
 - ・ 「おつるの」父親 (76)
 - ・ 「おつるの」母 (76)
 - ・ 二十四五の屈強さうな若い百姓 (若者) (82、84、85、86、88、89、90、91、93)
 - ・ 古い麻の布で髪を巻いた皺だらけの老百姓 (年寄り) (82、84、85、87、88、89、90、91、93)
 - ・ 一人のぼつか (86、87、88、89、90、91、93)
 - ・ こも包にした赤ん坊 (棄て子) (105、106、108、110、150、155、156)
 - ・ 「弥助の」一歳位な赤ん坊 (113、114、115、116、117、124、126)
 - ・ 「おさよの」三つ位の孫 (115)
 - ・ 「弥助の」嬪 (115、117、123、124、126、129)
 - ・ 頬かむりをした若い大男 (119、124、126、134)
 - ・ 一番早乙女 (121、122、126、132、133)
 - ・ 乞食の子 (125)
 - ・ 早乙女の一人 (127)
 - ・ 鋏頭 (129)
 - ・ 酔いで顔を赤黒くした男衆の一人 (131)
 - ・ 若い百姓の一人 (133)
 - ・ 元気な若い男 (134)
 - ・ 「梅村速水の」下男 (150)
 - ・ 一人の老人 (150)
 - ・ 寝間着姿のまゝの中年女 (151)
 - ・ 番頭らしい男 (151)
 - ・ 花売娘 (151、152、153、154、156)
 - ・ 若い男 (159、161)
 - ・ 「角川村七兵衛の」妻 (162)
 - ・ 「角川村七兵衛の」伴 (162)

- ・〔角川村七兵衛の〕 伴の女房 (162)
- ・〔角川村七兵衛の〕 孫の兄 (162)
- ・〔角川村七兵衛の孫の〕 姉娘 (163)
- ・木地師の若い男 (163)
- ・〔柏木徳兵衛の〕 女房 (173、186、187、188)
- ・〔江馬弥平の〕 父親 (182、183、186)
- ・〔江馬弥平の〕 母親 (183)
- ・〔柏木徳兵衛の〕 雇人 (187)
- ・番人 (197)
- ・頬かむりをした中年の下男 (224、225)
- ・〔仁右衛門の〕 嬢 (225)
- ・〔仁右衛門の〕 娘 (225)
- ・若い一人 (226)
- ・二十三四の小柄な男 (228)
- ・百姓風な小使 (234、236)
- ・二十四五で、山袴をはいて大小を挿した地役人 (234、235、236)
- ・ひどく痩せて骨ばった六十近い山伏 (234、235、236)
- ・一人の雲水 (246)
- ・町の旅宿の主人 (246)
- ・組頭 (249)
- ・一人の若い嬢 (264)
- ・別の女 (264)
- ・外の女 (264)
- ・〔宮の八兵衛の〕 嬢 (270、271、272、273、274)
- ・宮村の名主 (272)
- ・紺麻の短着（きせき）をきて、汚ない頬かむりをした中年の百姓 (273)
- ・歯のない年寄 (273)
- ・照蓮寺輪番 (280、281、282、321、322)

第三部

- ・〔寿崎屋おこうの〕 下女 (280)
 - ・〔吉田文助の〕 下女 (280)
 - ・〔寿崎屋和作の〕 女房 (285)
 - ・〔村山三郎の〕 妻 (286、294)
 - ・〔村山三郎の〕 十になる男の子 (286)
 - ・顔なじみの皺くちやな老婆 (286)
 - ・〔岩井屋おえいの〕 夫 (288)
 - ・〔吉住弘之進の〕 妻 (294、298)
 - ・〔吉住弘之進の〕 子 (294)
 - ・白洲の隅に控えてゐた番人 (305)
 - ・あばただらけの醜い男 (316)
 - ・〔相生屋の〕 五十ばかりの後家 (318)
 - ・能登輪島の商人 (318)
 - ・〔ある商家の〕 美しい娘 (319)
 - ・〔ある商家の〕 親類の息子 (319)
 - ・気むづかしい顔付の年とつた番頭 (320、322)
 - ・首から長い紺の前垂をかけた十五六の小僧 (321、322、323、326)
 - ・鼻筋の高い、立派な鬚をもつた美男子の若い百姓 (326、331)
 - ・〔広瀬村五郎作と〕 同じ村のもの (330)
- 赤ん坊 (6)
- ・四十前後の貧しげな女房 (6、7、8)
 - ・町で名高い或る料理屋の女将 (9、10)
 - ・槍持ちの一人の供 (14)
 - ・〔広田屋の〕 おやじ (16、35)
 - ・〔広田屋の〕 女房 (16、35)
 - ・町会の小使 (56)

- ・隊長格 (65)
- ・番太 (76)
- ・ばさ／＼と乱れた髪に麻布をかぶり、ぼろで着ぶくれた鼻 (102)
- ・ひい／＼と泣き立てる赤ん坊 (102)
- ・老婆 (102)
- ・三十前後の女 (103)
- ・嬢 (106)
- ・おどろ髪を振り乱した中年の嬢 (108)
- ・骨組の頑丈らしい、背の高い、白髪の大男 (109)
- ・おどろ髪をした、痩せこけた中年の百姓男 (114)
- ・八十位な小さな老婆 (116)
- ・五十前後の主婦 (116、117、118、119、121、122、123、140、145)
- ・殊にひげで顔の真黒に見える若い方 (116)
- ・顔色の青白い小さな娘 (119)
- ・「おはつ」の父親 (131、132、139)
- ・もの凄いな大きな男 (133)
- ・「おはつ」の兄 (139)
- ・手下 (141)
- ・鉄漿がはげ落ちて、口元の薄汚なく見える五十ばかりの嬢 (142)
- ・十八九の小柄な娘 (143)
- ・「猪の鼻村宇平」の若い嫁 (150、151)
- ・「猪の鼻村宇平」の伴 (151、152、155)
- ・赤ん坊 (151)
- ・「猪の鼻村宇平」の次男 (151)
- ・一人の年寄り (152)
- ・七十位の爺 (152、153)
- ・中年の鼻 (153)
- ・初陣の十五六の少年 (157)
- ・猟の猛者である五十あまりの老人 (157)
- ・八十五になる爺 (158、159)
- ・十六七の年頃の娘 (158)
- ・「大古井村長太郎」の女房 (168、169、170、175)
- ・「大古井村長太郎」の八十を越した半身不随の老母 (169)
- ・幼女とも下女ともつかぬ十四になる小娘 (169)
- ・老婆 (177)
- ・年とつた鼻 (177)
- ・七十近い、よぼ／＼の百姓 (179)
- ・坊様 (184)
- ・「おつる」の父親 (195)
- ・「三川屋市右衛門」の女房 (215、216)
- ・「三川屋市右衛門」の二つになる女の子 (215、216、217、218)
- ・千切屋の主人 (218)
- ・若い役人の一人 (220)
- ・五十ばかりの立派な侍 (220、221)
- ・仲間 (220、221)
- ・別の役人 (221)
- ・百姓の一人 (252)
- ・「松本村藤兵衛」の女房 (254、256)
- ・苗木の城主 (289)
- ・典医 (289)
- ・「江馬弥平」の乳呑子 (292)
- ・下男 (292、293)
- ・「梅村速水」の兄 (331)
- ・「おちかの」父無し子 (338、339)

『山の民』（学会版）索引

ア

- 相生屋おゆう 【Ⅱ】 318
 青山吉郎 【Ⅱ】 303
 【Ⅲ】 281, 282, 283, 284, 301, 314
 青山伴平 【Ⅲ】 283
 青山峯之助 【Ⅰ】 47, 114, 125, 138, 140, 148
 188, 197, 218, 219, 253
 (青山峰之助) 【Ⅰ】 110
 【Ⅱ】 9
 赤田屋瑛次郎 【Ⅱ】 143
 【Ⅲ】 55, 89, 217, 219, 230, 244, 245
 336
 秋元但馬守 【Ⅲ】 25
 浅井豊助 【Ⅰ】 7, 9, 11, 12, 14, 15, 16, 22, 39, 79
 81
 綾小路身内 【Ⅰ】 12
 (綾小路侍従) 【Ⅱ】 15
 荒川玄病 【Ⅲ】 283, 290, 308
 荒木 【Ⅲ】 104, 105, 106, 107, 108, 114, 116
 117, 118, 120, 121, 122, 123, 124, 125
 126, 127, 128, 140, 141, 142, 144, 145
 149, 162, 163, 164, 165, 174, 175
 有栖川宮 【Ⅰ】 250
 阿波侯 【Ⅰ】 107

イ

- 飯田鞭次郎 【Ⅲ】 250, 272, 290, 308, 314, 325, 327
 飯森 【Ⅱ】 300
 生駒主膳正 【Ⅲ】 26
 石黒三太夫 【Ⅰ】 7, 22, 24
 【Ⅱ】 300
 板垣退助 【Ⅰ】 250
 市川 【Ⅱ】 14
 一ノ町喜兵衛 【Ⅱ】 183
 伊藤金太郎 【Ⅲ】 285
 猪の鼻村宇平 【Ⅲ】 11, 12, 14, 15, 17, 18, 19, 21, 22
 23, 35, 37, 40, 47, 48, 49, 50, 51, 63

い

- いめ 【Ⅱ】 162, 163, 172
 岩井屋おえい 【Ⅱ】 288, 289, 290, 302, 303, 305
 岩井屋おすゑ 【Ⅱ】 288, 289
 岩井屋おらく 【Ⅰ】 152, 153, 154, 156
 【Ⅱ】 55, 70, 71, 72, 73, 286, 288, 289
 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299
 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307
 308, 309, 311, 313, 314, 315, 316, 317
 318, 319, 322, 325, 326, 327, 328, 331
 【Ⅲ】 51, 52, 53, 70, 200, 209, 246, 259
 302, 312, 323, 324, 325, 326
 岩井屋儀右エ門 【Ⅱ】 304, 305
 岩倉太夫 【Ⅰ】 8, 108, 241, 250
 岩倉具視 【Ⅰ】 108, 109, 190, 193, 233, 236
 【Ⅱ】 14
 【Ⅲ】 48, 210, 213
 岩倉八千丸 【Ⅰ】 108, 241, 250
 岩水 【Ⅲ】 259

ウ

- 上村木曾右衛門 【Ⅰ】 114, 115
 【Ⅲ】 281, 282, 283, 284, 301, 314
 上村屋又兵衛 【Ⅲ】 217
 魚屋勘十郎 【Ⅱ】 262, 265
 宇田栗園 【Ⅰ】 236, 237, 238, 239, 240, 250, 251
 252, 253, 255, 256, 258
 【Ⅱ】 21
 【Ⅲ】 212, 213, 239, 280, 303, 304, 307
 内山 【Ⅱ】 131
 打保屋彦六 【Ⅰ】 251
 【Ⅲ】 243
 梅村速水[知事] 【Ⅰ】 263
 【Ⅱ】 14, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28
 29, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 38, 39, 40
 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50
 51, 53, 55, 56, 58, 62, 63, 64, 65, 66
 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77

江馬修『山の民』研究序説〔三〕

78, 80, 8990, 95, 96, 97, 98, 99, 100	漆垣内村三郎右衛門	
102, 105, 107, 108, 111, 112, 113, 114		【Ⅱ】 50
115, 116, 124, 125, 126, 127, 128, 131		
132, 138, 139, 141, 142, 143, 144, 145	工	
146, 147, 148, 150, 151, 153, 156, 157	江馬おうた	【Ⅲ】 292
158, 166, 168, 169, 171, 177, 184, 190	江馬弥平	【Ⅱ】 147, 173, 174, 175, 176, 178, 179
191, 195, 196, 199, 204, 205, 207, 208		180, 181, 182, 183, 184, 186, 187, 188
209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216		189, 190, 192, 193, 194, 195, 196, 199
217, 218, 219, 220, 221, 223, 224, 225		216, 226, 263
227, 228, 229, 233, 238, 240, 241, 242		【Ⅲ】 189, 203, 243, 257, 264, 269, 271
243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250		281, 292, 300, 333, 334
251, 252, 254, 255, 256, 257, [261]	円空上人	【Ⅱ】 239
262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 274		
276, 279, 281, 282, 283, 284, 285, 298	才	
303, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311	応挙	【Ⅲ】 316
312, 313, 317, 318, 319, 321, 322, 327	大賀屋くわ	【Ⅱ】 279
328, 329, 330, 332, 333	大賀屋清次郎	【Ⅱ】 279
【Ⅲ】 4, [12], 14, 15, 18, 20, 21, 29, 30	大沢謙介	【Ⅰ】 11, 14, 15, 16, 17, 18, 22, 79, 81
31, 32, 33, 38, 39, 40, 43, 44, 45, 46		126
48, 51, 52, 53, 54, 56, 57, 59, 68, 70		【Ⅱ】 50
75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84	大谷源兵衛	【Ⅲ】 212, 219, 220, 221, 222, 224, 226
85, 86, 88, 89, 90, 92, 93, 94, 95, 96		229
178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185	大坪	【Ⅰ】 32, 33
186, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194	大沼村久左衛門	【Ⅰ】 53, 54, 55, 57, 115, 132, 133, 138
197, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206		140, 141, 143, 144, 156, 157, 158
207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214	(大沼村久兵衛)	【Ⅱ】 50
215, 216, 217, 219, 220, 221, 222, 223		【Ⅲ】 226, 270, 297, 308
224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231	大沼村久左衛門*	【Ⅰ】 53
233, 234, 235, 236, 237, 238, 240, 241	大沼村忠次郎	【Ⅰ】 53
243, 244, 245, 246, 247, [248], 250	大原中納言	【Ⅱ】 65
257, 258, 259, 261, 262, 265, 266, 267	大原彦四郎	【Ⅰ】 50, 51, 52, 53, 61, 98, 238
268, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278		【Ⅱ】 203
279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286		【Ⅲ】 26, 44
287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294	大古井村長太郎	【Ⅲ】 167, 168, 169, 170, 172, 174, 175
295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302		176, 177, 179, 180, 181, 245
303, 308, 309, 310, 311, 314, 315, 321	大村長吉	【Ⅱ】 7, 8, 10, 11, 12
322, 323, 328, 329, 330, 332, 333, 335		【Ⅲ】 276
(= 沼田準次郎、桜井誠一)	岡島善兵衛	【Ⅱ】 14, 246
		【Ⅲ】 269, 280, 293, 328, 329

岡田将監	【Ⅱ】 15, 21	お光	【Ⅰ】 209, 210, 211, 221, 223, 224
おかね	【Ⅱ】 295, 302, 303	お安	【Ⅱ】 19, 20
岡本屋清七	【Ⅲ】 55, 217, 219		
おきぬ	【Ⅱ】 132, 133, 134, 135	力	
お銀	【Ⅰ】 210, 211, 221, 222, 223, 224	香川敬三	【Ⅱ】 14
奥田金馬太郎	【Ⅰ】 48, 197	加島	【Ⅱ】 175, 176, 177
	【Ⅱ】 20, 62, 148, 223, 243, 263	柏木徳兵衛	【Ⅰ】 156
	【Ⅲ】 66, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87		【Ⅱ】 40, 145, 168, 170, 171, 172, 173
	90, 203, 219, 332		175, 177, 178, 180, 181, 184, 186, 187
奥田大蔵	【Ⅰ】 21, 28, 30, 32, 33, 159, 256		188, 189, 190, 191, 192, 193, 195, 196
	【Ⅱ】 20		198, 199, 241
おさよ	【Ⅱ】 115, 123, 124		【Ⅲ】 93, 189, 257, 276, 293
押上屋市次郎	【Ⅰ】 55, 57, 115, 131, 132, 135, 139	(角川村徳兵衛)	【Ⅰ】 38, 114, 198, 265
	140, 144, 145, 154, 158, 259		【Ⅱ】 39, 51
	【Ⅱ】 4, 8, 10, 11, 12, 39, 40, 47, 50, 51	柏屋与一郎	【Ⅲ】 244
	【Ⅲ】 92, 222, 243, 271, 290, 291, 336	(柏屋与二郎)	【Ⅲ】 271
押上屋吉兵衛	【Ⅰ】 49, 55, 56, 57, 71, 72, 73, 142	かつ	【Ⅲ】 151, 152, 153, 159, 161, 162, 163
	143, 144		165
おしづ	【Ⅰ】 172, 173, 174, 175, 176	桂小五郎	【Ⅱ】 14, 63
おせつ	【Ⅱ】 63, 64	加藤	【Ⅱ】 66, 69, 73
落合村利助	【Ⅲ】 11, 12, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 22	金森	【Ⅰ】 185, 204
	23, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44		【Ⅱ】 16
	46, 47, 48, 49, 50, 51, 54, 63, 64, 69, 70	加納	【Ⅲ】 182
	71, 72, 75, 76, 87	甲村孫助	【Ⅰ】 57, 132, 133, 141, 142, 143, 144
おちか	【Ⅰ】 177, 178, 180		154
	【Ⅲ】 338, 339, 340		【Ⅱ】 51
おつね	【Ⅲ】 119, 120, 121, 122, 123, 124, 126		【Ⅲ】 92, 93, 95, 96, 98, 100, 106, 189
	127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 148		290
	149	川上斎右衛門	【Ⅰ】 19, 154
おつる	【Ⅱ】 70, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80		【Ⅱ】 299, 301, 303, 306, 308, 313
	105, 108, 109, 131, 150, 151, 152, 153		【Ⅲ】 57, 58, 189, 314
	154, 156, 157, 158, 262, 263, 264, 265	川上屋善右衛門	【Ⅰ】 150, 151, 152, 153, 156
	266, 267, 268, 273, 274, 285, 308, 310		【Ⅱ】 55
	311, 312		【Ⅲ】 36, 37, 38, 42, 43, 44, 45, 46, 47
	【Ⅲ】 4, 11, 52, 53, 78, 89, 190, 191, 192		48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 56, 57, 58, 59
	193, 194, 196, 197, 200, 201, 202, 203		60, 61, 190, 205, 206, 207, 208, 209
	209, 279, 312		210, 211, 212, 214, 215, 216, 217, 218
おはつ	【Ⅲ】 119, 123, 125, 128, 129, 130, 131		219, 200, 221, 222, 223, 224, 225, 226
	132, 133, 136, 139, 140, 148, 154		227, 228, 229, 230, 242, 243, 244, 250

江馬修『山の民』研究序説〔三〕

- 266, 269, 270, 271, 276, 280, 281, 303 笹屋平兵衛 【Ⅱ】 49
 304, 305, 306, 307, 308, 325, 336 指田 【Ⅰ】 81, 86
 川上屋善六 【Ⅲ】 55, 206, 207, 212 沢田孫之丞 【Ⅲ】 283
 河村喜一郎 【Ⅰ】 129, 147, 158 三条実美 【Ⅱ】 15
 勘兵衛 【Ⅱ】 46, 142
- キ**
- 北島喜三太 【Ⅲ】 228
 鬼頭鷲郎 【Ⅲ】 67, 179
- ク**
- 久々野村長三郎 【Ⅰ】 54, 55
- コ**
- 光瑩 【Ⅱ】 97
 光賀屋吉右衛門 【Ⅲ】 55, 206, 207, 210, 217, 219, 270
 孔子 【Ⅲ】 245
 弘法 【Ⅱ】 125
 小林平兵衛 【Ⅱ】 246 (=笹屋才二)
 米屋定吉 【Ⅲ】 229
 米屋庄兵衛 【Ⅲ】 206, 335
 小森治兵衛 【Ⅰ】 78, 250
 【Ⅲ】 45
 小柳小三郎 【Ⅱ】 20
 五郎 【Ⅱ】 314, 317
 【Ⅲ】 87, 89, 90
 権三郎 【Ⅱ】 303
 近藤勇 【Ⅱ】 179
 近藤英一郎 【Ⅰ】 11, 18, 81, 122, 123, 124, 126
- サ**
- 西郷吉之助 【Ⅰ】 250
 (西郷隆盛) 【Ⅱ】 138
 阪井呉作 【Ⅲ】 67
 佐吉 【Ⅰ】 201, 202, 203, 204, 205, 206
 作右衛門 【Ⅲ】 246
 桜井誠一 【Ⅱ】 15, 18, 19, 20, 21, 22
 (=梅村速水)
- 笹屋才二 【Ⅱ】 49, 246 (=小林平兵衛)
- シ**
- 塩谷村作兵衛 【Ⅲ】 223
 次助 【Ⅱ】 246
 島木辰蔵 【Ⅲ】 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 72, 253
 271
 島木ゆき 【Ⅲ】 4, 9, 201
 清水屋長左衛門 【Ⅲ】 206, 269, 281, 303, 335, 336
 庄村翁輔 【Ⅲ】 257, 271, 283, 284, 301, 314, 317
 320, 324, 325, 326
 諸葛亮 【Ⅱ】 139
 新見内膳[郡代] 【Ⅰ】 6, [7], 8, 9, 10, 11, 12, 14, 16
 [17], [18], 19, [20], 22, [24], 25, 26
 31, 35, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, [44]
 [45], [47], [53], [60], [71], [75], 78
 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 94, [97]
 [108], [113], 114, 122, 129
 【Ⅱ】 183, 214, 250
 【Ⅲ】 33, 45, 204, 231, 232, 257, 322
- ス**
- 杉崎屋彦兵衛 【Ⅱ】 241
 杉下外二三 【Ⅰ】 78
 杉下太郎右衛門 【Ⅱ】 241
 助右エ門 【Ⅱ】 115, 116
 寿崎屋おこう 【Ⅱ】 279, 280, 281, 284, 285, 304
 寿崎屋和作 【Ⅱ】 285
 鈴木兵左衛門 【Ⅰ】 110, 113, 117, 123, 124, 126, 131
 132, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142
 143, 145, 146, 148, 162, 188, 189, 190
 191, 192, 193, 194, 195, 197, 225, 233
 241, 260
 【Ⅱ】 54
- セ**

- 清右衛門 【Ⅱ】 254
善助 【Ⅲ】 292
- 夕**
- 高木莊次郎 【Ⅲ】 290, 314, 325, 326
高間源八 【Ⅱ】 14, 23, 29, 62, 63, 64, 65, 111, 113
114, 115, 116, 128, 216, 219, 252, 253
254, 261, 262, 265, 268, 277
【Ⅲ】 93, 219, 227, 228, 269, 280, 288
293, 328, 329
(高間善八) 【Ⅲ】 332
高柳 【Ⅱ】 90
瀧原礼造 【Ⅲ】 206, 208, 222, 269, 270, 281, 303
304, 305, 306, 307, 335, 336
竹沢寛三郎 【Ⅰ】 8, 9, 32, 38, 40, 47, 48, 53, 58, 80
94, 98, 106, 107, 108, 109, 110, 111
112, 113, 114, 115, 116, 117, 120
121, 122, 123, 126, 128, 129, 130, 139
147, 149, 150, 151, 153, 154, 155, 156
157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 170
182, 183, 187, 188, 189, 190, 191, 192
193, 194, 195, 196, 197, 199, 232, 233
234, 241, 242, 243, 246, 247, 252, 255
256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263
264, 265, 267, 269
【Ⅱ】 11, 12, 13, 22, 23, 24, 25, 26, 27
28, 29, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39
40, 41, 42, 44, 47, 48, 49, 50, 52, 53, 54
55, 89, 94, 95, 99, 183, 196, 204, 212
214, 330, 331
【Ⅲ】 29, 39, 42, 48, 51, 211, 240, 257
258, 322 (=新田邦光)
- 武田耕雲齋 【Ⅱ】 14, 15
竹野屋忠右衛門 【Ⅰ】 158
田近方次郎 【Ⅲ】 245, 257
田近孫藏 【Ⅰ】 18, 22, 23, 25, 26, 27, 28, 29, 32
38, 39, 40, 42, 43, 114, 115
【Ⅱ】 303
【Ⅲ】 284, 314
- 田島猪三郎 【Ⅲ】 269
達如上人 【Ⅱ】 101
田中浦三郎 【Ⅱ】 300, 301, 303
田中栄蔵 【Ⅲ】 285
田中大秀 【Ⅰ】 26
【Ⅲ】 274
棚橋衝平 【Ⅱ】 15 (=長沢喜間太)
谷屋甚兵衛 【Ⅲ】 206, 335
田宮 【Ⅱ】 300
- 子**
- 千葉重太郎 【Ⅱ】 14
中呂村久左衛門 【Ⅰ】 256
【Ⅱ】 50
(中呂村久兵衛) 【Ⅰ】 158
長作 【Ⅱ】 231, 132, 134, 236, 237
- ツ**
- 津田正三郎 【Ⅲ】 276, 277, 278, 303, 304, 305, 306
307, 308
角川村七兵衛 【Ⅱ】 168, 169
- テ**
- 寺田潤之助 【Ⅰ】 5, 6, 7, 9, 11, 12, 44, 80
- ト**
- 藤兵衛 【Ⅱ】 321, 322, 323, 324, 325, 326, 328
331
徳川家治 【Ⅰ】 49
徳川斉昭 【Ⅱ】 14
徳川慶喜 【Ⅰ】 35, 162, 250
【Ⅲ】 299
戸谷権十郎 【Ⅲ】 284, 286
鳥谷文二郎 【Ⅲ】 332 (=鳥羽良映)
鳥羽良映 【Ⅱ】 62, 215, 216, 217, 219, 220
【Ⅲ】 183, 271 (=鳥谷文二郎)
土肥謙造 【Ⅲ】 210, 211, 219
富田稻太 【Ⅰ】 11, 18, 26, 128, 197
【Ⅱ】 62, 63, 64, 65, 142, 147, 195, 216

江馬修『山の民』研究序説〔三〕

- 238, 263
【Ⅲ】 178, 223, 238, 245, 248, 257, 262
- 267, 273, 275, 292, 314, 332
- 豊岡 【Ⅲ】 269, 303, 304, 305
- 豊田藤之進 【Ⅱ】 213
【Ⅲ】 231, 232, 233
- ナ
- 長沢喜間太 【Ⅱ】 15, 21 (=棚橋衝平)
- 長瀬屋清八 【Ⅱ】 279
- 長瀬屋茂八 【Ⅱ】 279
- 長瀬屋たか 【Ⅱ】 279
- 長瀬屋とく 【Ⅱ】 279
- 中村助三郎 【Ⅲ】 222, 243, 250
- 名張村五郎左衛門 【Ⅱ】 165, 167, 168, 172, 173, 260
【Ⅲ】 223, 290
(五郎左エ門) 【Ⅱ】 168, 169, 170, 171, 186, 188
189, 190, 194, 199
- ニ
- 西田秋作 【Ⅲ】 221, 226, 228
- 西村翁輔 【Ⅰ】 22, 23, 25, 27, 28, 29, 32, 48, 204
205, 206
- 新田邦光 【Ⅰ】 106 (=竹沢寛三郎)
- 二宮尊徳 【Ⅱ】 183
- 丹羽三兵衛 【Ⅲ】 289
- 仁右衛門 【Ⅱ】 224, 225, 228, 237
(仁右エ門) 【Ⅱ】 229, 231, 232, 233, 234, 235, 236
- 又
- 沼田準次郎 【Ⅱ】 14 (=梅村速水)
- 沼田久次郎 【Ⅱ】 197, 198, 199
- ノ
- 野瀬 【Ⅱ】 66, 70, 73
- ハ
- 長谷川忠崇 【Ⅱ】 201, 202
- 服部哲太郎 【Ⅰ】 126
- 林盛次郎 【Ⅱ】 14
- ヒ
- 平川和太郎 【Ⅰ】 236, 239
- 平松雪枝 【Ⅱ】 15, 18, 21, 61
- 広瀬淡窓 【Ⅱ】 62
- 広瀬村市助 【Ⅰ】 167, 168, 177, 178, 185, 186
【Ⅲ】 338, 340
- 広瀬村五郎作 【Ⅰ】 59, 60, 61, 62, 63, 65, 66, 67, 68
69, 167, 168, 169, 170, 171, 173, 175
176, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184
185, 186
【Ⅱ】 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330
332
【Ⅲ】 265, 338, 339, 340
- 広瀬村利兵衛 【Ⅰ】 143, 144
【Ⅱ】 7, 8, 10, 11
- フ
- 福井侯 【Ⅰ】 148
- 藤屋ぎん 【Ⅱ】 279, 280
- 藤屋利八 【Ⅱ】 279
- 舟坂長蔵 【Ⅰ】 242, 243
- 船阪屋半右衛門 【Ⅱ】 282, 283, 284
【Ⅲ】 45, 59, 60, 61, 179, 183, 186, 187
236, 276, 293
(船阪半エ衛門) 【Ⅱ】 313
- 冬木屋小平次 【Ⅲ】 24, 25
- 古川町方周左衛門 【Ⅱ】 3, 7, 12, 50
- ヘ
- 平作 【Ⅱ】 117, 119, 121, 122, 124, 126, 127
128, 131, 134, 135
- 平助 【Ⅲ】 186, 187
- ホ
- 本郷村善九郎 【Ⅱ】 179
- 本多光之輔 【Ⅲ】 250, 272, 290, 308, 314, 325

- マ**
- 孫助 【Ⅱ】 77
- ます 【Ⅱ】 279, 282
- 松平右近将監 【Ⅰ】 50, 51
- 松本村藤兵衛 【Ⅲ】 254, 255, 256, 257
- ミ**
- 三川屋市右衛門 【Ⅲ】 214, 215, 216, 217, 218, 303, 305
- 水野屋おたか 【Ⅲ】 213
- 水野弥太郎 【Ⅱ】 15
- 水戸烈公 【Ⅱ】 197, 198, 228
- 源実朝 【Ⅱ】 198
- 宮田 【Ⅱ】 303
- 宮田村房吉 【Ⅲ】 337
- 宮の八兵衛 【Ⅱ】 270, 271, 272, 273, 274
- 宮之前村久兵衛 【Ⅰ】 132, 141, 154, 156, 234, 237, 238
252, 254, 255, 258, 265
【Ⅲ】 189
- 宮原大輔 【Ⅲ】 32, 270, 283, 290, 293, 294, 295
297, 298, 302, 309, 310, 313, 314, 315
316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323
326, 327, 328, 332, 335, 336
- 宮村忠七 【Ⅰ】 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 70
- ム**
- 村上俊介 【Ⅱ】 138, 147, 208, 223, 263, 280, 281
300, 301, 302, 303, 307, 308, 309, 312
314
【Ⅲ】 12, 13, 58, 75, 76, 77, 79, 80, 81
178, 203, 273, 278, 280, 281, 291, 292
314, 328, 329, 332
- 村山三郎 【Ⅱ】 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292
293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300
301
- モ**
- 毛利 【Ⅱ】 228
- 茂住宗貞 【Ⅱ】 194
- ヤ**
- 屋貝権四郎 【Ⅰ】 19, 132, 135, 136, 137, 138, 141
142, 145, 154
【Ⅱ】 147, 148
【Ⅲ】 57, 314
(矢貝) 【Ⅲ】 182
- 矢島善左衛門 【Ⅰ】 19, 149, 150, 151, 152, 153, 154
157
【Ⅱ】 145, 278, 281, 303, 306, 307, 308]
【Ⅲ】 324
(矢島茂右衛門) 【Ⅰ】 73
(矢島善右衛門) 【Ⅰ】 147
- 安川 【Ⅰ】 29, 30, 31
- 弥助 【Ⅱ】 115, 117, 123, 124, 126, 127, 129
132
- 山岡鉄太郎 【Ⅰ】 162
- ユ**
- ゆき
湯之島村彦兵衛 【Ⅰ】 251
- ヨ**
- 吉住弘之進 【Ⅱ】 66, 70, 71, 72, 73, 223, 293, 294
295, 296, 297, 298, 300, 301, 302, 307
308, 309, 317, 321, 322, 326
【Ⅲ】 259, 302, 323, 324
- 吉住礼助 【Ⅰ】 7, 8, 11, 18, 24, 25, 26, 27, 29, 32
33, 38, 39, 40, 42, 43, 197
【Ⅱ】 50, 66, 105, 107, 108, 142, 179
180, 195, 294, 301, 307
【Ⅲ】 55, 211, 245, 257, 259, 271, 283
284, 299, 300, 301, 302, 314, 315, 317
318, 319, 320, 321, 323, 324
- 吉田忠太郎 【Ⅱ】 277
【Ⅲ】 67, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 100
101, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109
110, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120
121, 122, 123, 125, 126, 127, 140, 141
142, 144, 145, 148, 149, 162, 163, 164

江馬修『山の民』研究序説〔三〕

- 165, 174, 175, 176, 179, 180, 265, 279
 293, 319, 328, 329, 332
- 吉田文助 【Ⅱ】 50, 62, 63, 64, 77, 78, 79, 147, 207
 215, 216, 219, 223, 262, 280, 281, 282
 303, 304, 305, 306, 307
 【Ⅲ】 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 178, 186
 223, 238, 239, 249, 262, 267, 271, 272
 273, 278, 280, 281, 291, 292, 299, 301
 314, 328, 329, 332
- 吉田屋安兵衛 【Ⅲ】 333
- 頼親 【Ⅲ】 331
- 頼房 【Ⅲ】 331

レ

- 霊樹院勝縁〔連枝〕 【Ⅱ】 97, 98, [99], 100, 101, [102]
 [103], [104]

ワ

- 若狭屋権兵衛 【Ⅲ】 214
- 脇田頼三 【Ⅰ】 258, 259, 261
 【Ⅱ】 11, 23, 30, 31, 32, 33, 36, 38, 40
 49, 53, 55, 246
 【Ⅲ】 48, 51, 54, 55, 205, 206, 208, 210
 211, 212, 213, 229, 276

アフリカ大陸東部の乳加工体系

平田昌弘¹⁾、門平睦代¹⁾、水谷文美²⁾、松本葉²⁾、小疇浩¹⁾、内田健治³⁾、元島英雅³⁾

(受理：2006年4月17日)

Milk processing systems in east Africa

Masahiro HIRATA¹⁾, Mutsuyo KADOHIRA¹⁾, Fumi MIZUTANI²⁾, Kazuha MATSUMOTO²⁾, Hiroshi KOAZE¹⁾, Kenji UCHIDA³⁾ and Hidemasa MOTOSHIMA³⁾

要旨

ケニア高原における農牧民・牧畜民の乳加工体系を把握し、その特徴を分析するために、ケニア高原でキクユ農牧民とマサイ牧畜民の世帯で観察とインタビューによる調査をおこなった。ケニア高原での乳加工技術は、1) 発酵乳系列群とクリーム分離系列群の両方の乳加工技術を採用し、2) 乳脂肪の分画・保存のためのバター・バターオイル加工技術はあるが、乳タンパク質の分画・保存のためのチーズ加工技術は欠落する構造をとっていた。アフリカ大陸東部とケニア高原との乳加工体系の比較検討により、ケニア高原の乳加工体系はクリームを分離していること自体が特徴であることが明らかとなった。このようなケニア高原の乳加工体系の特徴を形成させた状況設定を論考することが今後の課題である。

キーワード：乳加工体系、ケニア高原、牧畜民、

1. はじめに

「搾乳」と「去勢」の発明により牧畜が成立したとの仮説が今西（1968）や梅棹（1976：119）によって提起されている。福井（1987：30）も、「牧畜社会が牧畜を生業として成立させたもっとも大きな要因は、トナカイ牧畜民のぞけば、搾乳であったといえる。乳が全哺乳動物の子どもを育てる完全栄養であることを牧畜民が見逃すはずはなかった。」と総括している。牧畜とは、「動物の群を管理し、その増殖を手伝い、その乳や肉を直接・間接に利用する生業（福井、1987：10）」のことであり、生活様式、つまりくらしのたて方の一つの類型である（梅棹、1967：85

-86）。乳を利用することで、人は家畜に生活の多くを依存できるようになったのである。搾乳の発明が牧畜を成立させたという概念をグランドセオリーとして、著者らは今までに西アジア（平田、1999；平田ら2004）、中央アジア（平田、2002b）、北アジア（平田、2002a；2006）、南アジア（平田、2003；2004c；2005）、青藏高原（平田、2004a；2004b）で乳文化の調査をおこなってきた。

今回、ケニア高原での乳文化の調査機会に恵まれた。初めてのアフリカ大陸での調査に胸が高鳴るのを感じながら、アジア大陸の乳文化との関連性、更に搾乳・牧畜の起源と伝播への論考展開を念頭においてケニア高原の乳

¹⁾帯広畜産大学畜産学部 〒080-8555 帯広市稲田町

School of Agriculture, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Obihiro, Hokkaido, 080-8555, Japan

²⁾International Livestock Research Institute (ILRI), P.O.Box 307090, Nairobi, Kenya

³⁾よつ葉乳業中央研究所 〒061-1264 北海道北広島市輪厚 465-1

Research Center, Yotsuba Milk Products Co.LTD., Kitahiroshima, Hokkaido, 061-1264, Japan

加工体系を調査した。ケニア高原での乳加工体系を把握するために、キクユ農牧民をライキピア県ムラマティ集落（事例1）で、マサイ牧畜民をライキピア県マクリャン集落（事例2）、イルポレイ集落（事例3）、ナロック県シエナ集落（事例4）で観察とインタビューを2005年6月11日から6月26日までおこなった（図1）。インタビューは、乳加工を主に担当している女性、および、家長におこなった。キクユの人々はバンツー諸語族に、マサイの人々はナイル諸語族に属しており、言語的には出自が異なっている（Andrew and Cynthia, 1980）。

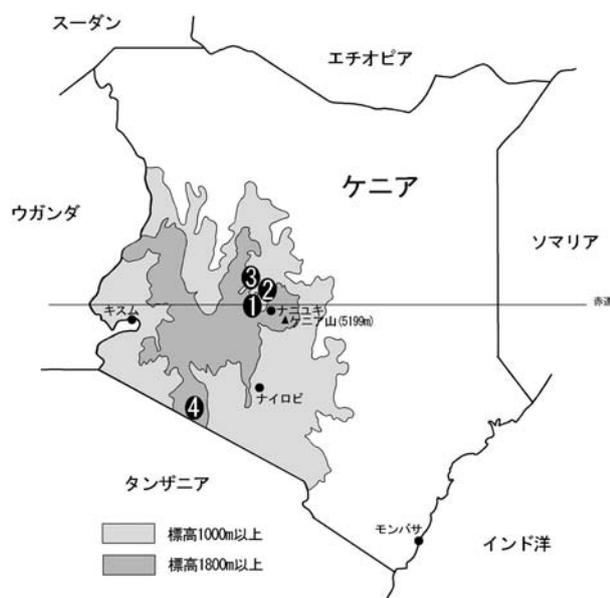


図1 ケニアの標高と調査地（●）
出典）Ojani and Ogeno, 1973

牧畜民の乳加工体系を類型分類し、その特徴を分析するために、中尾（1972：159-163）の4つの系列群分析法を用いた。つまり、生乳をまず酸乳にして加工が展開する発酵乳系列群¹⁾、生乳からまずクリームを分離してから加工が展開するクリーム分離系列群、生乳に凝固剤を添加してチーズを得る凝固剤使用系列群、生乳をゆっくり加熱し濃縮することを基本とする加熱濃縮系列群の4類型である。

本稿の目的は、第一にケニア高原における農牧民・牧畜民の乳加工体系を把握し、第二に周辺地域と比較することによりケニア高原の乳加工体系の特徴を分析することにある。

2. 調査地の気象

調査したライキピア県は赤道直下にある。そのため、日

長と気温が一年を通してほぼ一定している（図2）。日長の年較差は年間10分以内である。気温は1,800m以上の高地にあるため（図1）、平均気温が年間を通して15°C前後と冷涼な高山気候帯にある（図2）。日中には25°C前後となる。

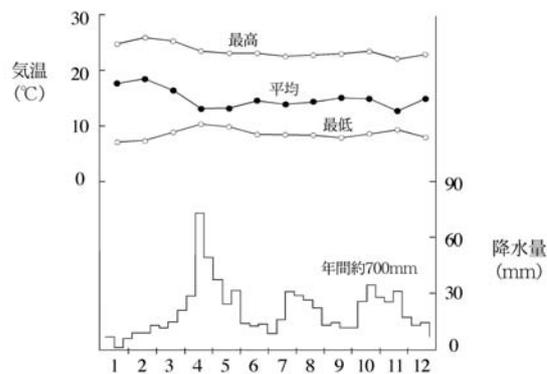


図2. ライキピア県ナクuru市の月平均気温と年間降水量
出典）Jaetzold and Schmidt, 1983

ケニアの降水量は、インド洋沿岸部、および、標高が高くなるにつれて多くなる。ケニア北部の低地では年間降水量が300mmを下回るが、ケニア高原では700mm以上、ケニア山周辺などでは2,000mm以上もある。降雨時期は、4月～5月にかけての大雨季、10月～11月の小雨季の年間2回の雨季がある（図2）。この2回の雨季の期間が、草本植物がよく生育し、家畜の搾乳量も多くなる。7月から8月にかけて降水が多くなるのは、大陸性の低気圧の影響である。これら以外の季節は降雨が相対的に少なくなる。ケニア高原の気象環境の特徴をまとめると、主に年2回の雨季があり半湿潤で、年間を通して冷涼であるといえる。

3. ケニア高原における乳加工体系

ケニア高原におけるキクユ農牧民もマサイ牧畜民も、ヒツジとヤギからは搾乳しておらず、ウシからのみ搾乳している。以下の乳加工は全て、ウシの生乳に対する技術である。

3-1. キクユ農牧民の乳加工体系

キクユの人々は、発酵乳系列群とクリーム分離系列群の乳加工技術を利用している（図3）。キクユの人々は、生乳をイリアiriaと呼ぶ。発酵乳系列群の乳加工技術は、イリアを加熱せず、そのままヒョウタン（キンヤkinya）に入れることから始まる。ヒョウタンの内壁には、前回の酸乳

アフリカ大陸東部の乳加工体系

がこびりついており、これが酸乳つくりのためのスターターとなる。ヒョウタンに非加熱生乳を3日~4日かけて少しずつ追加続け、日陰に静置しておく。静置している間に乳酸発酵が進み、酸乳のイリア・イマタ *iria imata* ができる。イマタはキクユ語で、“ネバネバした、ドロリとした”の意である。キクユの人々は、このイリア・イマタを食

べる際に、ヒョウタンを必ず振る。ヒョウタンから注ぎ込まれた酸乳は、固まっていた酸乳が崩されてゲル状となり、まさにイマタの状態となっている。イリア・イマタの味は、ヒョウタンの内側を炭で燻してあるため、泥臭くて酸っぱい。キクユの人々は、イリア・イマタを更に加工することはなく、ウガリ²⁾ などと一緒にそのまま食する。

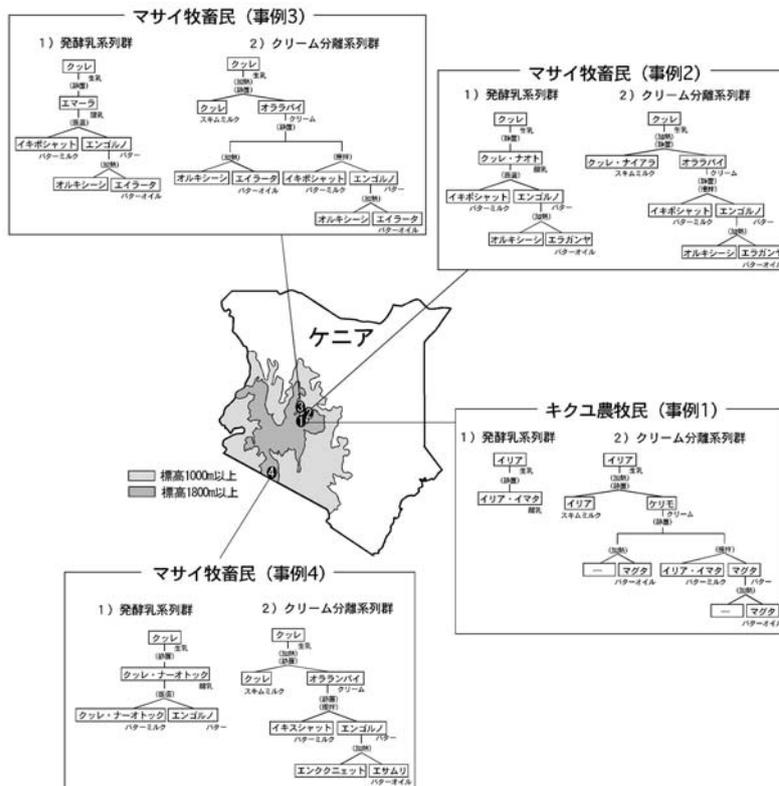


図3 ケニア高原のキクユ農牧民(事例1)とマサイ牧畜民(事例2、3、4)における乳加工体系

□ 生産物 () 処理 — 名称無し

一方、クリーム分離系列群の乳加工技術は、生乳のイリアを先ず加熱し、一晚静置させる。翌朝、表面に浮上したクリームであるケリモ *kirimo* を掬い取り、別の容器に移す。ケリモを掬い取った後に残るスキムミルクも、生乳と同じくイリア *iria* と呼ばれている。スキムミルクのイリアからは、乳加工が更に展開することはない。そのまま飲むか乳茶や料理に用いるという。クリームのケリモは、2日~3日分をためて、まとまった量になったら、加工へと回す。ケリモからは二つの加工系列が展開する。一つは、ケリモをキビリー *kibiri* と呼ばれる攪拌棒で攪拌して、バターを生成させる。バターはマグタ *maguta* と呼ばれる。バターを掬い取った後に残るバターミルクを、イリア・イマタと呼んでいる。バターミルクに、発酵乳系列群の乳加工で生じた酸乳と同じ語彙が与えられている。ケリモは2

日~3日分ため置きしているため、その間に乳酸発酵が進行している。このサワークリーム状になったケリモを攪拌し、生じたバターミルクが酸っぱくなっているため、バターミルクの名称に酸乳と同じ語彙が付しているものと考えられる。バターのマグタは、加熱してバターオイルにし、乳加工が終結する。バターオイルも、バターと同じくマグタ *maguta* と呼ばれている。バターを加熱した際に生じる乳タンパク質の焦げた残渣には、名前が付与されていない。もう一つの系列は、ケリモを直接加熱して、バターオイルのマグタにする。

キクユの人々は、毎日、発酵乳系列群の乳加工技術を利用して、酸乳のイリア・イマタをつくっている。ヒョウタンに生乳を少量ずつ追加合わせるだけなので、加工のための手間がほとんどかからない。一方、クリーム分離系列群

の乳加工技術は、稀にしかおこなわないという。キクユの人々の乳加工技術は基本的に、発酵乳系列群の乳加工技術、つまり、生乳を乳酸発酵させるためにヒョウタンに入れて静置させるだけである。キクユの人々の生業は農耕が主である。家畜飼養と乳加工とが副次的な生業となると、乳加工への労働投下がこれほどまでに簡略化されている。

以上、ケニア高原でのキクユ農牧民の乳加工体系は、発酵乳系列群とクリーム分離系列群の乳加工技術を利用し、乳加工の中心は発酵乳系列群の乳加工技術であるとまとめることができる。

3-2. マサイ牧畜民の乳加工体系

マサイの人々も、発酵乳系列群とクリーム分離系列群の2系列の乳加工技術を利用している(図3)。マサイの人々は、生乳のことをクツレ kule と呼んでいる。発酵乳系列群の乳加工技術は、生乳のクツレを加熱殺菌しないまま、ヒョウタン(エンククリ enkukuri)に入れ、3日~5日静置し、先ず酸乳にする。酸乳はクツレ・ナオト kule naoto(事例2)、クツレ・ナーオトック kule naaotok(事例4)、エマーラ(事例3)と呼ばれている。ナオトは、“寝かした”の意である。マサイの人々は、酸乳の位置づけを、生乳を静置して寝かし、適度な酸味となって飲むのに準備のできた乳としている。ヒョウタンは、キクユと同様に、内壁は炭で燻してある。クツレを食するときには、必ずヒョウタンを揺すってから供する。マサイの場合、クツレを頻繁に食すると共に、更に加工へと回す。ヒョウタンを使ってクツレを振り続けるとバターができてくる。バターをエンゴルノ enguruno(事例2、3、4)と呼んでいる。バターミルクは、イキボシャット ikiposhat(事例2、3)、クツレ・ナーオトック(事例4)と呼んでいる。事例2、3では、バターを加熱し、バターオイルのエラガンヤ eraganya(事例2)、エイラータ eilata(事例3)へと加工している。ここでできる、乳タンパク質の残渣は、オルキシーシ orkishish と呼ばれている。事例4の場合では、このバターのエンゴルノをバターオイルへ加工することは無いという。

マサイの人々によるクリーム分離系列群の乳加工技術は、キクユの人々とほぼ同一の工程を経る。生乳のクツレを加熱殺菌し、一晩静置させる。翌朝、表面に浮上したクリームであるオララパイ olarapai(事例2、3、オララン

パイ olarampai(事例4)を掬い取る。オララパイ/オラランパイは別の容器に取り分け、2日~5日分をためる。オララパイを掬い取った後に残るスキムミルクは、クツレ(事例3、4)、もしくは、クツレ・ナイアラ iria naiara(事例2)と呼ぶ。ナイアラは、“沸騰させた”の意である。スキムミルクのクツレ/クツレ・ナイアラからは、乳加工が展開することはない。乳茶にしたり、ウガリと共に消費したりする。クリームからは、攪拌することによって、バターのエンゴルノ enguruno(事例2、3、4)、バターミルクのイキボシャット(事例2、3)、イキスシャット ikisushat(事例4)へと展開する。クリームの攪拌には、ヒョウタン(事例3)か、ナベ(エモティ emoti:事例2、4)と木ベラ(エルメルシ olmersie:事例2、オルクルテット orkurutet:事例4)を用いる。容器と木ベラを用いてクリームをバターへ加工する動作を、マサイの人々は、アショル ashor という。アショルは、“撫でる”という意である。マサイの人々は、クリームを木ベラで攪拌するというよりも、クリームを木ベラで撫で回して、バターへと加工すると解している。バターのエンゴルノを加熱すると、乳脂肪と乳タンパク質が分離してくる。乳タンパク質が熱せられて茶色くなり、乳脂肪が白色から黄金色へと変色したら、加熱を止める。加熱時間は、おおよそ30分くらいである。ここで生じるバターオイルをエラガンヤ(事例2)、エイラータ(事例3)、エサムリ esamuli(事例4)、乳タンパク質の残渣をオルキシーシ(事例2、3)、エンククニェット enkukunyet(事例4)とそれぞれ呼ぶ。バターミルクのイキボシャット/イキスシャットから、加工が展開することはない。一方、クリームのオララパイを直接加熱して、バターオイルへ加工するのは事例3でのみみられた。事例2と事例4とでは、攪拌・加熱によるクリームからバターオイルへ加工する系列のみ用いられている。

マサイの人々は、ヒョウタンに生乳を毎日入れて酸乳へと加工すると共に、生乳を加熱・静置してクリームを毎日集めている。発酵乳系列群もクリーム分離系列群も、毎日おこなっている乳加工技術なのである。ただし、発酵乳系列群の乳加工技術は、主に酸乳を得るためだけに主に採用されている。事例4では、酸乳のクツレ・ナーオトックからバターを分画することをほとんどおこなっていないという。事例2と事例3の場合でも、酸乳のクツレ・ナオト

アフリカ大陸東部の乳加工体系

／エマーラからバターエンゴルへと加工するのは、4月～8月と10月～12月の雨季で、生乳生産量が多い時期のみであるという。発酵乳系列群の乳加工技術で、バター／バターオイルを積極的に加工しないのは、酸乳からバターを生成させるには攪拌に長時間を要するためだという。発酵乳系列群の乳加工技術でバター／バターオイルを分画しない代わりに、クリーム分離系列群の乳加工技術によってバター／バターオイルの分画を主におこなっている。むしろクリーム分離系列群の乳加工技術が、バターオイルを得るために用いられている。攪拌によってバターを加工するには、全乳³⁾による酸乳よりもクリームを用いる方が格段に効率がいい。

以上、ケニア高原でのマサイ牧畜民の乳加工体系は、発酵乳系列群とクリーム分離系列群の乳加工技術を利用し、クリーム分離系列群の乳加工技術を積極的にこなってバターオイルを分画しているとまとめることができる。

3-3. ケニア高原での乳加工体系

キクユ農牧民とマサイ牧畜民の乳加工体系は共通して、発酵乳系列群とクリーム分離系列群の両方の乳加工技術が存在していた。この両方の技術は、出自系統を越えて、ケニア高原という地域に居住する人々に共有されている。このように、乳加工技術という文化項目は、出自系統を越え、ある地域の人々に共有される地域的なまとまりを形成する。著者は、この特定の乳加工技術の複合と結びついた特定の地域的なまとまりを乳文化圏と定めている(平田、1999)。

キクユとマサイの人々に共通した重要な乳加工技術が更にもう一つある。乳タンパク質の分画・保存の欠落、つまり、チーズをまったく加工していないのである。酸乳を脱水するか、もしくは、バターミルクを加熱凝固・脱水すれば、チーズを生成することができる。生乳から乳脂肪の分画はおこない、乳脂肪をバターオイルという保存できる形態まで加工する技術は存在している。しかし、生乳から乳タンパク質の分画・保存をおこなう技術は欠落しているのである。

以上、キクユ農牧民とマサイ牧畜民の事例を通して、ケニア高原での乳加工技術をまとめると、1) 発酵乳系列群とクリーム分離系列群の両方の乳加工技術が存在し、2)

乳脂肪の分画のためのバター・バターオイル加工技術はあるが、乳タンパク質の分画のためのチーズ加工技術は欠落していると結論できる。

4. アフリカ大陸東部との比較

前章では、ケニア高原における乳加工体系の構造把握に努めた。次に、ケニア高原とアフリカ大陸東部との乳加工体系を比較考察し、ケニア高原の乳加工体系の特徴を明らかにしてみたい。比較検討に用いた事例は、クシユ諸語族に属するレンディーレ牧畜民(比較事例1)(佐藤、1992)、マサイと同じナイル諸語族に属するトゥルカナ牧畜民(比較事例2)(Galvin, 1985)、ボディ牧畜民(比較事例3)(福井、1992)、ナーリム牧畜民(比較事例4)(福井、1992)、ヌアー牧畜民(比較事例5)(Evans-Pritchard, 1940)である(図4)。図4での比較のために、ケニア高原からは事例3のマサイ牧畜民の乳加工体系を示した。

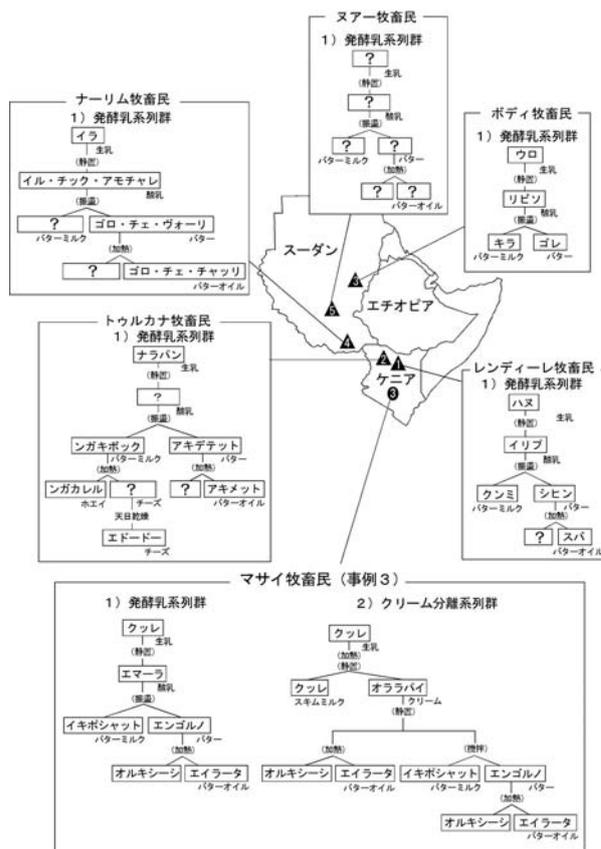


図4 アフリカ大陸東部の乳加工体系
 □ 生産物 () 処理 ? 名称記載無し

4-1. ケニア高原周辺地域の乳加工体系

レンディーレ、トゥルカナ、ボディ、ナーリム、ヌアー⁴⁾のいずれの牧畜民も共通して、発酵乳系列群の乳加工技術のみを用いている。生乳を加熱せずに、そのままヒョウタンなどに入れ、静置して酸乳にし、酸乳を振盪してバターへ日常的に加工している。ボディの場合、乳脂肪の分画がバターまでで終了するが、レンディーレ、トゥルカナ、ナーリム、ヌアーの人々は、バターを加熱してバターオイルにまで加工している。

注目すべきは、トゥルカナの人々がチーズを加工していることである。トゥルカナ牧畜民は、バターミルクを天日で一日加熱してから、ホエイを除去し、凝乳を天日乾燥させてチーズを加工するという (Galvin, 1985)。このように、アフリカ東部の多くの事例では生乳から乳タンパク質の分離・保存をおこなっていなかったが、トゥルカナ牧畜民のみチーズ加工をおこなっている。Galvin (1985) によると、生乳が酸乳・バター加工の必要量以上に生産された年のみ、トゥルカナ牧畜民はチーズ加工をおこなうという。チーズを加工するのは、約 10 年に一度くらいであり、決して毎日・毎年ではない。これは、かつてはチーズを日常的につくっていたものが、何等かの状況設定でチーズをつくらなくなってきていることを意味しているのかもしれない。少なくとも言及できることは、トゥルカナの乳加工体系は、酸乳・バター加工に重点が置かれ、チーズ加工の優先度は極めて低いという事実である。このように、現在のアフリカ東部ではチーズ加工はおこなっていない、もしくは、おこなわなくなってきているといえよう。

以上、アフリカ大陸東部の乳加工体系をまとめると、1) 発酵乳系列群の乳加工技術のみを用い、2) 酸乳の振盪によるバター加工、バターの加熱によるバターオイル加工の技術は日常的に用いているが、3) チーズへの加工はおこなっていない、もしくは、おこなわなくなってきているといえる。

4-2. ケニア高原の乳加工体系の位置

アフリカ大陸東部とケニア高原の乳加工体系とを比較すると、牧畜を主とする人々においては、発酵乳系列群は同じ乳加工技術に則っていることが理解される (図 3、図 4)。つまり、酸乳の振盪によるバター加工は全ての事例で

共通し、バターの加熱によるバターオイル加工の技術がレンディーレ、トゥルカナ、ナーリム、マサイの人々によって共有されている。

一方、明確に異なった特徴を呈している乳加工技術は、ケニア高原ではクリーム分離系列群の乳加工技術を用いていることである。生乳を加熱殺菌すること、加熱殺菌した生乳を静置して、クリームを浮上・分離させる技術は、ケニアからスーダンにかけてはケニア高原のみにみられる乳加工技術となっている。ボディやナーリムでは、生乳を加熱することがタブー視されており (福井, 1992)、ケニア高原でのマサイやキクユの人々が生乳を加熱する行為自体、生乳に対する価値観が周辺地域の人々と異なっていることを示している。

ケニア高原では、クリームを分離してからは2つの乳加工系列群が展開している。クリームを攪拌してバターにし、バターを加熱してバターオイルにする系列と、クリームを直接加熱してバターオイルにする系列である。後者のクリームを直接加熱してバターオイルにする乳加工技術は、クリーム分離系列群に独自にみられる加工技術である。酸乳を加熱してもバターオイルには成らない。対象とする乳製品がクリームであるからこそ、直接に加熱することによって乳脂肪が分離してくる。

以上、ケニア高原の乳加工体系を周辺地域と比較した結果、ケニア高原の乳加工体系はクリームを分離すること自体が特徴であることが把握された。そして、クリームを分離するようになった必然の結果として、クリームを直接加熱してバターオイルへ加工することがケニア高原の乳加工体系に新たに付け加わることとなったといえる。

5. おわりに

ケニア高原における乳加工体系は、1) 発酵乳系列群とクリーム分離系列群の両方の乳加工技術が存在し、2) 乳脂肪の分画のためのバター・バターオイル加工技術はあるが、乳タンパク質の分画のためのチーズ加工技術が欠落した構造であるとまとめることができる。そして、ケニア高原における乳加工体系の特徴は、クリームを積極的に分離し、クリームから乳加工の展開が発達していることであると結論できる。

本研究により、ケニア高原における乳加工体系の構造と

アフリカ大陸東部の乳加工体系

特徴が把握できた。次の課題としては、ケニア高原で何故にクリーム分離系列群の技術が発達したか、また、何故に乳タンパク質の分画のためのチーズ加工技術が欠落したのかを論考することにある。このケニア高原に特徴的な乳文化を成立させた理由を論考することは、その地域特有の状況設定、つまり、地域の個性を象徴するような概念を抽出する作業に等しい。ここに、地域の総合像を描き出そうとする地域研究（立成、1996）の論考に寄与することができる。この地域特有な状況設定は、乳文化だけに留まることなく、農耕や様々な経済活動の特徴をも説明してくれることであろう。乳文化を事例に、ケニア高原における地域特有の状況設定を論考するには多くの頁を必要とするため、稿を改めて論考したい。

そして、アフリカ東部の乳文化におけるもう一つ重要な課題が残されている。それは、アフリカ大陸東部に伝播した当初の乳加工体系、そして、現在の乳加工体系へと至る変遷過程を明らかにすることである。牧畜の発達には西アジアや中央アジアで先ず展開したとされる（松原、1992:192）。この仮説に従うならば、アフリカ大陸における牧畜は時間軸的にはより新しいということになる。陸路を通して西アジアからアフリカ大陸に乳加工技術が伝播したとするならば、西アジアでおこなわれていた乳加工技術がアフリカ大陸東部の乳加工体系の土台の多くを形成したはずである。伝播論の立場に立脚した上で、アフリカ東部と西アジアとの乳加工体系を比較検討し、そして、アフリカ東部の乳加工体系の変遷過程を今後論考していきたいと考えている。これは、牧畜の起源と伝播へと展開する重要テーマとなることであろう。

謝辞

本研究は、平成 17 年度文部省科学研究費補助金（基盤研究(B)(2)）『南部アフリカ 3 ヶ国における小規模農家レベルでの畜産振興を妨げる要因の研究』（代表・門平睦代）のもとにおこなわれた。ライキピア県とナロック県のキクユ農牧民やマサイ族牧畜民の人々は調査に快く協力してくれた。これらの方々に深く感謝する。

注

1) 中尾は酸乳系列群とした。しかし、中尾が提示した酸

乳系列群にはアルコール発酵の乳加工も含まれる。畜産学では、乳酸発酵を主体とした酸乳とアルコール発酵を主体としたアルコール発酵乳を合わせて発酵乳と総称している。そこで筆者は、酸乳系列群を発酵乳系列群と呼び改めて使用することになっている。

- 2) ウガリとは、穀物やイモの粉を、少な目の湯で煮て、固ゆでにしたもの（和崎、1981）。地方によりトウモロコシ、モロコシ、コムギ、マニオクと材料が異なるが、現在のケニア高原ではトウモロコシ粉が普及している。
- 3) 搾乳したままの乳を全乳という（鷹尾、1993）。全乳の乳脂率は4%前後と、クリームの乳脂率よりも格段に低いので、振盪してバターを生成するのに全乳はクリームよりも多くの時間と労力を要する。
- 4) テキストには「ホエー」「チーズ」という語彙が用いられている。しかし、乳加工の状況から判断すると、「ホエー」はバターミルク、「チーズ」はバターもしくはバターオイルのことを指している。従って、ヌアー牧畜民の場合も、バター・バターオイルは加工するが、チーズはつくっていないことになる。

引用文献

- Andrew, F. and Cynthia, S. 1980. *Peoples and Cultures of Kenya*. Transafrica, Nairobi.
- Evans-Pritchard, E. E. 1940. *THE NUER*, The Clarendon Press, Oxford. (向井元子訳、エヴァンス=プリチャード、1978。『ヌアー族』、岩波書店。)
- 福井勝義 1987 「牧畜社会へのアプローチと課題」福井勝義・谷泰編『牧畜文化の原像-生態・社会・歴史』日本放送出版協会、3 - 60 頁。
- 福井勝義 1992 「スルマ系社会における乳の利用と象徴性-エチオピア・スーダン南部のウシ牧畜民-」雪印乳業健康生活研究所編『乳利用の民族誌』中央法規出版株式会社、87-106 頁。
- Galvin, K. 1985. *Food procurement, diet, activities and nutrition of Ngisonyoka, Turkana pastoralists in an ecological and social context*. State University of New York, Binghamton.
- 平田昌弘、2006。「アルタイ地域における乳加工体系-中国

平田昌弘・門平睦代・水谷文美・松本葉・小嶋浩・内田健治・元島英雅

新疆ウイグル自治区イリ・カザフ自治州アルタイ地区
での事例を通して-」『北海道民族学会会報』(印刷中).

平田昌弘、2005. 「インド西部の乳加工体系」『沙漠学会』
15-2: 65-77.

平田昌弘・原隆一、2004. 「イラン南部における乳加工体
系の多様性」『沙漠学会』14-2: 115-120.

平田昌弘、2004a. 「青蔵高原西部における乳加工体系」『言
語文化学会論集』22: 159-176.

平田昌弘、2004b. 「青蔵高原東部における乳加工体系の変
遷」『エコソフィア』14: 81-100.

平田昌弘、2004c. 「インド西部での都市や農村における乳
製品とその加工技術-(後編)」『食の科学』312: 52 -
60.

平田昌弘、2003. 「インド西部での都市や農村における乳
製品とその加工技術-(前編)」『食の科学』310: 24 -
32.

平田昌弘、2002a. 「モンゴル国ドンドゴビ県における乳加
工体系」『沙漠研究』12-1: 1-11.

平田昌弘、2002b. 「中央アジアの乳加工体系-カザフ系牧
畜民の事例を通して-」『民族學研究』67/2: 158-182.

平田昌弘 1999 「西南アジアの乳加工体系-シリア北東部
のアラブ系牧畜民バグラーの事例をとおして」『エ
コソフィ』4: 189-203.

今西錦司 1968 『人類の誕生』河出書房新社。(1993 『増
補版 草原行-遊牧論そのほか』今西錦司全集2、講談
社。)

Jaetzold, R. and Schmidt, H. 1983. *Farm Management
Handbook of Kenya, Vol. II.* Ministry of
Agriculture, Nairobi.

松原正毅、1988. 『青蔵紀行-揚子江源流域をゆく』中央公
論社.

三宅裕 1999 「The Walking Account: 歩く預金口座-西ア
ジアにおける家畜と乳製品の開発」常木晃編『食糧生
産社会の考古学』朝倉書店、50-71 頁。

中尾佐助 1972 『料理の起源』日本放送出版協会。

Ojani, F. F. and R. B. Ogeno 1973. *Kenya: A Study in
Physical and Human Geography.* Longman Kenya,
Nairobi.

佐藤俊 1992 「レディーレ族と乳-北ケニアのラクダ遊牧

民の事例から-」雪印乳業健康生活研究所編『乳利用
の民族誌』中央法規出版株式会社、107-122 頁。

鷹尾享 1993 『牛乳・乳製品の実際知識』東洋経済新報社。

立本成文 1996 『地域研究の問題と方法(地域研究叢書3)』
京都大学学術出版会。

梅棹忠夫 1976 『狩猟と遊牧の世界』講談社。

和崎洋一 1981 「バンツ-系農耕民の食事」『朝日百科世
界の食べ物』朝日新聞社、46: 163-168 頁。

Summary

To understand milk processing systems in the Kenya highland and analyze those characteristics, field surveys were conducted in the households of Kikuyu agro-pastoralists and Massai pastoralists. The milk processing systems in the Kenya highland are consisted of both techniques of the fermented milk processing series and the cream separating series. Although butters and butter oils are made for milk fat preserving, there is no cheese processing system for a milk protein preserving. By comparison of milk processing systems in the Kenya highland with East Africa, it appears that the characteristic of milk processing systems in the Kenya highland is to adopt the technique of cream separating. Further studies on the analyses of the milk processing systems are needed to discuss the background which these kinds of the milk processing systems had been established in the Kenya highland.

Key words: milk processing system, Kenya highland, pastoralist

Res. Bull. Obihiro.,27(2006):105~112

平成17年度 帯広畜産大学研究業績

☆原著論文

分野	題 目	著 者 名	誌 名	発行年月
獣 医 学	Prevalence of <i>Toxoplasma gondii</i> and <i>Neospora caninum</i> in Sika deer from eastern Hokkaido, Japan	Y. OMATA N. ISHIGURO R. KANO Y. MASUKATA A. KUDO H.KAMIYA H. HUKUI M. IGARASHI R. MAEDA M. NISHIMURA A. SAITO	J. Wildlife Dis. 41(2): 454-458	2005年4月
	Antibodies against <i>Toxoplasma gondii</i> in the Pacific Bottlenose Dolphin (<i>Tursiops aduncus</i>) from the Solomon Island	Y. OMATA T. HAMMOND K. ITOH K. MURATA	J. Parasitol. 91(4): 965-967	2005年8月
	<i>Toxoplasma gondii</i> does not persist in Goldfish (<i>Carassius auratus</i>)	Y. OMATA U. UMESHITA T. MURAO R. KANO H. KAMIYA A. KUDO Y. MASUKATA Y.KOBAYASHI R. MAEDA A. SAITO K. MURATA	J. Parasitol. 91 (6): 1496-1499	2005年12月
	Surveillance of chronic wasting disease in Shika deer, <i>Cervus Nippon</i> , from Tokachi district in Hokkaido	N. KATAOKA M.NISHIMURA N.HORIUCHI N.ISHIGURO	J. Vet. Med. Sci. 67: 349-351	2005年
	Genetic profile and serosurvey for virus infections of Japanese wild boars in Shikoku island	N.ISHIGURO M.NISHIMURA	J. Vet. Med. Sci. 67: 563-568	2005年
	Preference for safflower oil in rats exposed to a cold environment under free-feeding conditions	M. SAITOH T. ISHII T. TAKEWAKI M. NISHIMURA	J. Vet. Med. Sci. 67: 653-658	2005年
	The mesencephalic trigeminal sensory nucleus is involved in the control of feeding and exploratory behavior in mice	T. ISHII H. FURUOKA T. ITOU N. KITAMURA M. NISHIMURA	Brain Res. 1048: 80-86	2005年4月
	Comparison of growth and exploratory behavior in mice fed an exclusively milk formula diet and mice	T. ISHII T. ITOU	Life Sci. 78: 174-179	2005年4月

fed a food-pellet diet post weaning	M. NISHIMURA		
A competitive effect of androgen signaling on male mouse attraction to volatile female mouse odors.	Y. MUROI T. ISHII S. KOMORI M. NISHIMURA	Physiol. Behav. 87:199-205	2005年10月
A histological study of the cardiac conduction system in a heifer with complete atrioventricular block	N. MACHIDA S. KATSUDA Y. KOBAYASHI K. MITSUMORI	J. Comp. Pathol. 133(1): 68-72	2005年7月
腹大動脈血栓症を呈したキャバリア・キング・チャールズスパニエルの1例	小原 公成 古林与志安	獣医畜産新報 58(8): 645-648	2005年8月
顕著な結合組織の増生を伴う牛の腎細胞癌の1例	立石 識子 古林与志安 黒沢 重人 大林 哲 古岡 秀文 松井 高峯	日本獣医師会雑誌 58(10): 676-679	2005年10月
Surgical and radiotherapy treatment of a spinal cord ependymoma in a dog	H. UENO M. MORIMOTO Y. KOBAYASHI T. HIZUME N. MURAYAMA Y. UZUKA	Aust. Vet. J. 84(1-2): 36-39	2005年12月
Insulin-like growth factor-I as a follicular growth promoter during early pregnancy in thoroughbred mares	R. DERAR S. HARAMAKI MD. SHAFIQU L HOQUE T. HASHIZUME T. OSAWA K. TAYA G. WATANABE Y-I. MIYAKE	J. Vet. Med. Sci. 67(1): 19-23	2005年
外陰部刺激が牛の子宮収縮および発情開始からLHサージまでの時間に及ぼす影響	小野 守 大澤 健司 三宅 陽一	獣畜新報 58(6): 473-474	2005年6月
Postnatal developmental changes in immunohistochemical localization of alpha-smooth muscle actin (SMA) and vimentin in bovine testes.	B.DEVKOTA M. SASAKI K.TAKAHASHI S. MATSUZAKI M. MATSUI S.HANEDA M. TAKAHASHI T. OSAWA YI. MIYAKE	J. Reprod. Dev. 52(1): 43-49.	2006年2月
Extracranial meningioma in a dairy cow	K. YAMADA K. ISHIHARA I. YASUTOMI Y. KOBAYASHI	Veterinary Record 156: 652-653	2005年5月

		H. UENO K. MIYAHARA H. FURUOKA		
	Effect of positioning in dorsal recumbency on venous return from the vertebral venous system of a dog	T. ISERI K. YAMADA I. LEE N. YAMAGISHI H. UENO E. R. WISNER	Aust. Vet. J. 83(8): 511	2005年8月
	Fossorial adaptation of the shoulder muscles in the three species of Insectivore	H. ENDO S. ODA S-W. CHANG S-L. YUAN L-K. LIN T. OSHIDA	Jpn. J. Zoo Wildl. Med. 10(1): 39-41	2005年
	Immunization with recombinant surface antigen P50 of <i>Babesia gibsoni</i> expressed in insect cells induced parasite growth inhibition in dogs	S. FUKUMOTO Y. TAMAKI H. SHIRAFUJI S. HARAKAWA H. SUZUKI X. XUAN	Clin. Diagn. Lab. Immunc 12(4): 557-559	2005年4月
	Fatal experimental transplacental <i>Babesia gibsoni</i> infections in dogs	S. FUKUMOTO H. SUZUKI I. IGARASHI X. XUAN	Int. J. Parasitol. 35(9): 1031-1035	2005年8月
	Ethyl acetate extract from black tea prevents neuromuscular blockade by botulinum neurotoxin type A in vitro.	E. SATOH	Int. J. Food Sci. Nutr. 56(8): 543-550	2005年12月
	Comparison of the antioxidant activity of roasted tea with green, oolong, and black teas.	E. SATOH N. TOHYAMA M. NISHIMURA	Int. J. Food Sci. Nutr. 56(8): 551-559	2005年12月
医	学 A rat model for arrest of alveolarization induced by antenatal endotoxin administration	K. UEDA K. CHO T. MATSUDA S. OKAJIMA M. UCHIDA Y. KOBAYASHI H. MINAKAMI K. KOBAYASHI	Pediatr. Res. 59(3): 396-400	2006年3月
	Isolation of gene sets affected specifically by polyglutamine expression: implication of the TOR signaling pathway in neurodegeneraton	B. NELSON S. NISHIMURA H. KANUKA E. KURANAGA M. INOUE G. HORI H. NAKAHARA M. MIURA	Cell Death Differ. 12(8): 1115-1123	2005年8月

Gain-of-function screen identifies a role of the Sec61alpha translocon in <i>Drosophila</i> postmitotic neurotoxicity	H. KANUKA T. HIRATOU T. IGAKI H. KANDA E. KURANAGA K. SAWAMOTO T. AIGAKI H. OKANO M. MIURA	Biochim. Biophys. Acta 1726(3): 225-237	2005年11月
<i>Drosophila</i> caspase transduces Shaggy/GSK-3beta kinase activity in neural precursor development	H. KANUKA E. KURANAGA T. HIRATOU H. OKANO M. MIURA	EMBO J. 24(21): 3793-3806	2005年11月
<i>In vivo</i> targeting of vaccinating tumor cells to antigen-presenting cells by a gene therapy method with adenovirus containing the α 1,3galactosyltransferase gene	L. DERIY H. OGAWA G. P. GAO U. GALILI	Cancer Gene Ther. 12(6): 528-539	2005年8月
Protective effect of central thyrotropin-releasing hormone analog on cerulein-induced acute pancreatitis in rats	M. YONEDA M. GOTO K. NAKAMURA T. SHIMADA H. HIRAISHI A. TERANO M. HANEDA	Regul. Pept. 125: 119-124	2005年2月
Effect of central corticotropin releasing factor on hepatic circulation in rats: the role of the CRF2 receptor in the brain	M. YONEDA K. NAKAMURA Y. NAKADE M. TAMANO T. KONO H. WATANOBE T. SHIMADA H. HIRAISHI A. TERANO	Gut 54: 282-288	2005年3月
Macrophage inflammatory protein-1a plays a crucial role in concanavalin A-induced liver injury through induction of proinflammatory cytokines in mice	S. OKAMOTO S. YOKOHAMA M. YONEDA M. HANEDA K. NAKAMURA	Hepato. Res. 32: 38-45	2005年5月
Central thyrotropin-releasing hormone increases hepatic cyclic AMP through vagal-cholinergic and prostaglandin-dependent pathways in rats	M. YONEDA T. KONO Y. NAKADE H. WATANOBE M. TAMANO T. SHIMADA H. HIRAISHI K. NAKAMURA	Peptides 26: 1573-1579	2005年9月
Thyrotropin-releasing hormone in the dorsal vagal complex stimulates pancreatic blood flow in rats	M. YONEDA M. GOTO	Regul. Pept. 131: 74-81	2005年11月

- K. NAKAMURA
T. SHIMADA
H. HIRAISHI
A. TERANO
M. HANEDA
- 非アルコール性脂肪性肝炎に対するアンギオテンシンII受容体拮抗薬の治療効果 横浜 吏郎 日本臨床生理学会誌 2005年10月
玉木 陽穂 35: 191-198
岡本 聡
伊藤 拓
岡田 充巧
麻生 和信
中村 公英
羽田 勝計
徳差 良彦
三代川齊之
米田 政志
- 畜産学 Optimization of the processing conditions for the production of cooked pork sausage as a ready-to-serve product K. OHBA Korean J. Food Sci. Ani. 2006年3月
C. J. LIVERA Resour. 26(1): 15-19
R. W. SENEVIRATNE
D. SERJMYADAG
K. SHIMADA
M. FUKUSHIMA
K. H. HAN
C. H. LEE
M. SEKIKAWA
- Effect of the well of the well (WOW) system on in vitro culture for porcine embryos after intracytoplasmic sperm injection M. TAKA J. Reprod. Dev. 2005年8月
H. IWAYAMA 51: 533-537
Y. FUKUI
- Difficulties in publishing research results from scientific whaling Y. FUKUI Mar. Mamm. Sci. 2005年10月
H. ISHIKAWA 21: 781-783
S. OHSUMI
- Relationship between equilibration times and the presence of cumulus cells, and effect of Taxol treatment for vitrification of in vitro matured porcine oocytes T. FUJIHIRA Cryobiology 2005年 12月
H. NAGAI 51: 339-343
Y. FUKUI
- Comparison of estrus induction and subsequent fertility with two different intravaginal devices in ewes during the non-breeding season H. KOUNO J. Reprod. Dev. 2005 年12月
C. OKAMOTO 51: 805-812
K. IIDA
E. KANEKO
C. KAWAHIMA
A. MIYAMOTO
Y. FUKUI
- Effects of dithiothreitol and boars on pronuclear formation and embryonic development following intracytoplasmic sperm injection in porcine oocytes H. WATANABE Theriogenology 2006年 2月
Y. FUKUI 65: 528-539
- Effects of dietary protein and growth hormone- H. G. LEE Domest. Anim. 2005年2月

- | | | | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|----------|
| releasing peptide (GHRP-2) on plasma IGF-1 and IGF-BPs in Holstein steers | Y. J. CHOI
S. R. LEE
H. KUWAYAMA
H. HIDARI | Endocrinol.
28(2): 134-146 | |
| Effects of fasting and refeeding on plasma concentrations of leptin, ghrelin, insulin, growth hormone and metabolites in swine | H. INOUE
M. WATANUKI
H.
T. ITO
H. KUWAYAMA
H. HIDARI | Anim. Sci. J.
76(4): 367-374 | 2005年8月 |
| Effects of snow depth on intake and grazing behavior of Hokkaido native horses in winter woodland | M. KAWAI
H. ONO
Y. YAMAMOTO
S. MATSUOKA | Proc. 39th
International Cong.
ISAE
163 | 2005年8月 |
| Change in nitrogen fractions and ruminal nitrogen degradability of orchardgrass at various moisture contents and the subsequent effects on nitrogen utilization by sheep | H. V. NGUYEN
M. KAWAI
J. TAKAHASHI
S. MATSUOKA | Asian-Aust. J. Anim.
Sci.
18(9): 1267-1272 | 2005年9月 |
| Genetic differentiation among Andean camelid populations measured by blood protein markers | Y. KAWAMOTO
A. HONGO
Y. TOUKURA
Y. KARIYA
E. TORII
T. INAMURA
N. YAMAMOTO | Rep. Soc. Res. Native
Livestock
22: 41-51 | 2005年 |
| The role of a cleft upper lip of alpacas in foraging extremely short grasses evaluated by grazing impulses | A. HONGO
Y. TOUKURA
J.L. CHOQUE
J.A. ARO
N. YAMAMOTO | Small Ruminant Res.
Online J. on February 8
2006: 1-7 | 2006年 |
| Seasonal movement system of pastoral camps in Dund-Govi Province, Mongolia | M. HIRATA
I. KAIHOTSU
D. BATMUNKH
Y. TOUKURA
A. HONGO | J. Arid Land Studies
15(3): 139-149 | 2005年 |
| 画像処理による牛枝肉品質自動計測装置の開発 | 堀 武司
波 通隆
本間 稔規
口田 圭吾
宝寄山裕直
酒井 稔史
小高 仁重 | 北海道立工業試験場報告
304: 1-8 | 2005年5月 |
| 高解像度デジタルカメラを利用した新しい牛枝肉横断面撮影装置の開発 | 口田 圭吾
高橋健一郎
長谷川未央
堀 武司
本間 稔規
波 通隆 | 肉用牛研究会報
80: 56-62 | 2005年11月 |

		小高 仁重		
	画像解析によるホルスタイン種を用いたBMSナンバー推定法ならびに異なる横断面の脂肪交雑特徴量の比較	浜崎 陽子 口田 圭吾 日高 智 島田謙一郎 関川 三男 丸山 新	日本畜産学会報 75: 431-437	2005年11月
	遠隔地からでもわかる牛枝肉情報フィードバックシステムの開発	口田 圭吾	農家の友 80-82	2005年11月
	牛枝肉横断面の画像解析による第9-11肋骨間ロース部の赤肉割合の推定	長谷川未央 大澤 剛史 日高 智 宝寄山裕直 酒井 稔史 山本 裕介 佐藤 幸信 口田 圭吾	北海道畜産学会報 48: 39-44	2006年3月
	画像解析による牛枝肉横断面の評価とその遺伝	口田 圭吾 大澤 剛史 堀 武司 小高 仁重	家畜育種研究会報 13: 1-14	2006年3月
	N-acetylglucosaminyltransferase I activity of bovine oviduct epithelial cells: Stimulation by luteinizing hormone, vascular endothelial growth factor and tumor necrosis factor α	H. NOZAKI MPB. WIYAYAGUNAWARDANE SP. KODITUWAKKU T.YOSHIDA T. NAKAMURA I.ARAI T.URASHIMA A. MIYAMOTO	J. Reprod. Develop. 51: 229-234	2005年5月
草 地 学	モンゴル草本植物のフェノロジーとバイオマスの年々変動	近藤 昭彦 開発 一郎 平田 昌弘 アザヤドルゴスレン	沙漠学会 14(4): 209-218	2005年7月
農 学	Physical properties of yellow alkaline noodles from near-isogenic wheat lines with Wx protein deficiency	Y. TANAKA H. MIURA M. FUKUSHIMA M. ITO Z. NISHIO S. S. J. N. HASHIMOTO T. NODA S. TAKIGAWA C. TATSUURA-ENDO H. YAMAUCHI	Starch/Starke 58(3): 186-195	2006年3月
	Effects of cutting and grazing on vegetation and productivity of shrub-steppe in the Loess Plateau, north-west China	A. HONGO J. CHENG N. ICHIZEN Y. TOUKURA	Res. Bull. Obihiro Univ. 26: 1-11	2005年

		E. DEVEE M. AKIMOTO		
	Uprooting and shearing resistances in seedlings of four weedy species	Y. TOUKURA E. DEVEE A. HONGO	Weed Biology and Management 6(1): 35-43	2006年
	Introduction of exogenous substance into protoplasts of perennial ryegrass by electroporation	H. UNNO S. YAMAMOTO	Grassland Science 51(2): 165-168	2005年6月
	Mapping QTLs for grain dormancy on wheat 3A and group 4 chromosomes, and their combined effect	M.MORI N.UCHINO M.CHONO K.KATO H.MIURA	Theor. Appl. Genet. 110: 1315-1323	2005年6月
	Comparison of the starch properties of Japanese wheat varieties with those of popular wheat classes from the USA, Canada and Australia	WICKRAMASINGHE,H.A.M. H.MIURA H.YAMAUCHI T.NODA	Food Chemistry 93: 9-15	2005年11月
農芸化学	Fatty acids in must prepared from eleven grapes grown in Japan: Comparison with wine and effect on fatty acid ethyl ester formation	K. YUNOKI Y. YASUI S. HIROSE M. OHNISHI	Lipids 40(4): 361-367	2005年4月
	Production of cerebroside from beet molasses by the yeast <i>Saccharomyces kluyveri</i>	M. TAMURA O. MATSUMOTO N. TAKAKUWA Y. ODA M. OHNISHI	Food Biotechnol. 19: 95-105	2005年
	Component fatty acids of acidic glycerophospholipids in rice grains : Universal order of unsaturation index in each lipid among varieties	S.-K. CHOI E. TAKAHASHI O. INATSU Y. MANO M. OHNISHI	J. Oleo Sci. 54(7): 369-373	2005年7月
	Determination of glucosylceramide contents in crop tissues and by-products from their processing	T. TAKAKUWA K. SAITO M. OHNISHI Y. ODA	Bioresource Technol. 96: 1089-1092	2005年
	醸造酢からの脂溶性成分の分離および逆相HPLCによる構成脂肪酸の分析	藤森 正宏 増田 勉 柚木 恵太 柏川 法隆 塚本 義則 伊藤 精亮 大西 正男	食科工 52(9): 412-419	2005年9月
	Content of lipophilic compounds and HPLC analysis of fatty acid components in wine vinegar	M. FUJIMORI K. YUNOKI T. SHIMIZU T. MASUDA Y. TSUKAMOTO	J. Oleo Sci. 54(10): 559-563	2005年10月

M. OHNISHI

- | | | | | |
|------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|----------|
| | Selection of salt-tolerant yeast strains accumulating glucosylceramide | N. TAKAKUWA
M. OHNISHI
Y. ODA | Food Sci. Technol. Res.
11(2): 184-186 | 2005年4月 |
| | Effect of polyphenol content, polyphenol oxidase activity and pH on blackspot bruise of Japanese potato varieties | K. HIRONAKA
K. ISHIBASHI
H. KOAZE
H. SHIRASAKA
K. MATSUDA
K., SATO
M., KOJIMA
M. MORI
S. TSUDA
A. TAKADA | Food Preser. Sci.
32(2): 67-72 | 2006年3月 |
| | 乳牛ふん尿スラリーの施用が土壌団粒形成および理化学性に及ぼす影響 | 保井 聖一
筒木 潔
明石 憲宗
木村 義彰 | 日本土壌肥科学雑誌
76(3): 269-276 | 2005年6月 |
| | 乳牛ふん尿スラリー施用による土壌団粒形成メカニズムスラリーの物理性と腐植物質組成が有機・無機複合体の形成に及ぼす影響 | 保井 聖一
筒木 潔
明石 憲宗
木村 義彰 | 日本土壌肥科学雑誌
76(3): 277-284 | 2005年6月 |
| | Occurrence of a unique sialyl tetrasaccharide in colostrum of a bottlenose dolphin (<i>Tursiops truncatus</i>) | Y.UEMURA
S. ASAKUMA
T. NAKAMURA
I. ARAI
M. TAKI
T. URASHIMA | Biochim. Biophys.
Acta
1725: 290-297 | 2005年9月 |
| | Characterization of oligosaccharides in milk of a mink, <i>Mustela vison</i> | T. URASHIMA
T. NAKAMURA
A.IKEDA
S. ASAKUMA
I. ARAI
T. SAITO
O.T. OFTEDAL | Comp. Biochem.
Physiol.
A142: 461-471 | 2005年10月 |
| | Capillary affinity electrophoresis using lectins for the analysis of milk oligosaccharide structure and its application to bovine colostrum oligosaccharides | K. KAKAJIMA
M. KINOSHITA
N. MATSUSHITA
T. URASHIMA
M. SUZUKI
A. SUZUKI
K. KAKEHI | Anal. Biochem.
348: 105-114 | 2006年1月 |
| 農業工学 | Yield monitoring system for a head-feeding combine | T. CHOSA
Y. SHIBATA
K. KOBAYASHI
M. DAIKOKU
M. OMINE
K. TORIYAMA | J. Agri. Res. Quart.
40(1): 37-43 | 2006年1月 |

		K.ARAK H.HOSOKAWA		
	A study of quality monitoring by using sampling unit attached to a head-feeding combine harvester	T. CHOSA M. OMINE H. HOSOKAWA Y. SHIBATA	J. Jap. Soc. of Agricul. Mach. 68(2): 100-102	2006年3月
	マルチスペクトルイメージセンサを用いた生育診断システムの構築	石井 一暢 杉浦 綾 深川 知久 野口 伸 柴田 洋一	農機誌 68(2): 33-41	2006年3月
理 学	Phylogeography of the Russian flying squirrel (<i>Pteromys volans</i>): implication of refugia theory in arboreal small mammals of Eurasia	T. OSHIDA A. ABRAMOV H. YANAGAWA R. MASUDA	Mol. Ecol. 14(4): 1191-1196	2005年4月
	A note on a new habitat of the woolly flying squirrel <i>Eupetaurus cinereus</i> in the northern area of Pakistan	T. OSHIDA C. M. SHAFIQUE S. BARKATI	Mammal Study 30(1): 73-76	2005年6月
	A note on karyotypes of <i>Sorex caecutiens</i> (Mammalia, Insectivora) from Cheju Island, Korea	T. OSHIDA D. S. OHDACHI S-H. HAN R. MASUDA	Caryologia 58(1): 52-55	2005年
環 境 科 学	Pollen utilization by <i>Bombus hypocrita sapporoensis</i> colonies in fragmented forests in Hokkaido, Japan	R. TAKEUCHI K. KURAMOCHI T. NAGAMITUSU Y. KONNO	Bulletin of FFPRI 4(2): 167-175	2005年6月
	Approximation method for time-integral of photosynthesis for NPP estimation using remote sensing data: Case study in Mongolia	Y. XIONG K. MURAMATSU M. HIRATA K. OISHI I. KAIHOTSU T. TAKAMURA S. FURUMI N. FUJIWARA	J. Remote Sens. Soc. Japa 25(2): 179-190	2005年7月
食 品 微 生 物 学	An outbreak of food-borne listeriosis due to cheese in Japan, during 2001	S.-I. MAKINO K. KAWAMOTO K. TAKESHI Y. OKADA M. YAMASAKI S. YAMAMOTO S. IGIMI	J. Food Protect. 104: 189-196	2005年2月
細 菌 学	Production of anti-neurotoxin antibody is enhanced by two subcomponents, HA1 and HA3b, of <i>Clostridium botulinum</i> type B 16S toxin-haemagglutinin	J.-C. LEE K. YOKOTA H. ARIMITSU H.-J. HWANG Y. SAKAGUCHI J. CUI	Microbiol. 151: 3739-3747	2005年8月

		K. TAKESHI T. WATANABE T. OHYAMA K. OGUMA		
生殖科学	Changes in follicular vascularity during the first follicular wave in lactating cows.	T. J. ACOSTA K. G. HAYASHI M. MATSUI A. MIYAMOTO	J. Reprod. Dev. 51(2): 273-280	2005年4月
	Effect of the dominant follicle aspiration before or after luteinizing hormone surge on the corpus luteum formation in the cow.	K.G. HAYASHI M. MATSUI T. J. ACOSTA K. KIDA A. MIYAMOTO	J. Reprod. Dev. 52(1): 129-135.	2006年2月
	In vivo evidence that a local cortisol production increases in the preovulatory follicle in the cow.	T. J. ACOSTA M. TETSUKA M. MATSUI T. SHIMIZU B. BERISHA D. SCHAMS A. MIYAMOTO	J. Reprod. Dev. 51(4): 483-489	2005年8月
	Postpartum reproductive management based on the routine farm records of a dairy herd: relationship between the metabolic parameters and postpartum ovarian activity.	M. TAKAGI T. HIRAI N. MORIYAMA M. OHTANI A. MIYAMOTO M. P. B. WIJAYAGUNAWARDANE,	Asian-Aust. J. Animal. Sci. 18(6): 787-794	2005年6月
	Exposure of C57BL/6J male mice to an electric field improves copulation rates with superovulated females.	T. HORI T. YAMSAARD Y.Y. UETA S. HARAKAWA E. KANEKO A. MIYAMOTO X. XUAN Y. TOYODA H. SUZUKI	J. Reprod. Dev. 51(3): 393-397	2005年6月
	Vascular endothelial growth factor system in the cow oviduct: A possible involvement in the regulation of oviductal motility and embryo transport.	M. P. B. WIJAYAGUNAWAI S.P. KODITHUWAKKU Y. YAMAMOTO A. MIYAMOTO	Mol. Reprod. Dev. 72(4): 511-520	2005年12月
	Comparison of estrus induction and subsequent fertility with two different intravaginal devices in ewes during the non-breeding season.	H. KOHNO C. OKAMOTO K. IIDA T. TAKEDA E. KANEKO C. KAWASHIMA A. MIYAMOTO	J. Reprod. Dev. 51(6): 805-812	2005年12月

Y. FUKUI

- Gene expression of glucose transporter (GLUT) 1, 3 and 4 in bovine follicle and corpus luteum. H. NISHIMOTO J. Endocrinol. 2006年1月
R. MATSUTANI 188: 111-119
S. YAMAMOTO
T. TAKAHASHI
K.G. HAYASHI
A. MIYAMOTO
S. HAMANO
M. TETSUKA
- Heat stress diminishes gonadotropin receptor expression and enhances susceptibility to apoptosis of rat granulosa cells. T. SHIMIZU Reproduction 2005年4月
I. OHSHIMA 129(4): 463-472
M. OZAWA
S. TAKAHASHI
A. TAJIMA
M. SHIOTA
H. MIYAZAKI
Y. KANAI
- Alterations in follicular dynamics and steroidogenic abilities induced by heat stress during follicular recruitment in goats. M. OZAWA Reproduction 2005年5月
D. TABAYASHI 129(5): 621-630
A. LATIEF
T. SHIMIZU
I. OHSHIMA
Y. KANAI
- Changes of mRNA expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), angiopoietins and their specific receptors during the periovulatory phase in eCG/hCG-primed immature female rats. K. MIYABAYASHI J. Exp. Zool. Part A 2005年7月
T. SHIMIZU 303(7): 590-597
C. KAWAUCHI
H. SASADA
E. SATO
- Caffeine promotes premature chromosome condensation formation and in vitro development in porcine reconstructed embryos via a high level of maturation promoting factor activity during nuclear transfer. M. KAWAHARA Reproduction 2005年9月
T. WAKAI 130(3): 351-357
KI. YAMANAKA
J. KOBAYASHI
S. SUGIMURA
T. SHIMIZU
H. MATSUMOTO
JH. KIM
H. SASADA
E. SATO
- Hormonal regulation of expressions of growth differentiation factor-9 receptor type I and II genes in bovine ovarian follicle. B. C. JAYAWARDAN Reproduction 2006年3月
T. SHIMIZU 131(3): 545-553
H. NISHIMOTO
K. KANEKO
M. TETSUKA
A. MIYAMOTO
- Hormonal regulation and differential expression of neuropilin (NRP)-1 and -2 genes in bovine granulosa cells. T. SHIMIZU Reproduction 2006年3月
B. C. JAYAWARDAN 131(3): 555-559
H. NISHIMOTO
K. KANEKO
M. TETSUKA

		A. MIYAMOTO		
	Expression of CD44 and its glycosylation with polylectosamine on macrophage during follicular atresia in pig.	Y. MIYAKE H. MATSUMOTO M. YOKOO N. KIMURA W.A. TUNJUNG T. SHIMIZU H. SASADA E. SATO	Biol. Reprod. 74(3): 501-510	2006年3月
生 化 学	Histidine-tagged Shiga toxin B subunit binding assay: simple and specific determination of Gb3 content in mammalian cells	I. SHIN K. NISHIKAWA H. MARUYAMA S. ISHII	Chem. Pharm. Bull. 54(4): 522-527	2006年4月
荣 养 化 学	Fat- and cholesterol-enriched diet feeding affects gene expression related to cholesterol metabolism in rats	K. OHBA M. FUKUSHIMA K. H. HAN A. TAMURA S. WATANABE N. HASHIMOTO K. SHIMADA H. CHIJI M. SEKIKAWA	J. Oleo Sci. 54(8): 453-459	2005年8月
	Effects of adzuki bean extract on hepatic anti-oxidant enzyme mRNAs In D-galactosamine-treated Rats	K. OHBA M. NIREI S. WATANABE K. H. HAN N. HASHIMOTO K. SHIMADA M. SEKIKAWA H. CHIJI M. FUKUSHIMA	Biosci. Biotechnol. Biochem. 69(10): 1988-1991	2005年10月
	The protective effects of isoflavone extracted from soybean paste in free radical initiator treated rats	H. Y. NAM S. G. MIN H. C. SHIN H. Y. KIM M. FUKUSHIMA K. H. HAN W. J. PARK K. D. CHOI C. H. LEE	Food Sci. Biotechnol. 14(5): 586-592	2005年10月
	Adzuki resistant starch lowered serum cholesterol and hepatic HMG-CoA mRNA levels and increased hepatic LDL-receptor and cholesterol 7alpha-hydroxylase mRNA levels in rats fed a cholesterol diet	H. K. HAN M. IJUKA K. SHIMADA M. SEKIKAWA K. KURAMOCHI K. OHBA L. RUVINI H. CHIJI M. FUKUSHIMA	Br. J. Nutr. 94(6): 902-908	2005年11月

	<i>Amylomyces rouxii</i> Strain CBS 438.75 Affects Cholesterol Metabolism in Cholesterol-Fed Rats	M. FUKUSHIMA K. H. HAN Y. TANEICHI S. IJIMA K. SHIMADA K. SAITO Y. ODA H. CHIJI M. SEKIKAWA	J. Nutr. Sci. Vitaminol. 51(6): 453-459	2005年12月
生物有機科学	Stereoselective synthesis of (E)- and (Z)-beta beta-bromostyrene containing trifluoro-methyldiazirine for photoaffinity labeling	M. HASHIMOTO T. KOMANO K. NABETA Y. HATANAKA	Chem. Pharm. Bull. 53(1): 140-142	2005年1月
	Post-biotinylation of photocrosslinking by Staudinger-Bertozzi ligation of preinstalled alkylazide tag	M. HASHIMOTO Y. HATANAKA	Chem. Pharm. Bull. 53(11): 1510-1512	2005年11月
	Diol derivative of 3-trifluoromethyl phenyldiazirine for post-labeling of photocrosslink	M. HASHIMOTO Y. HATANAKA	Heterocycles 66(1): 531-534	2005年12月
文 学	江馬修『山の民』研究序説〔二〕—改稿過程の検討(二)・初稿から学会版へ(中)—	柴口 順一	帯広畜産大学学術研究 報告 26: 39-63	2005年10月
英 文 学	Two Opposing Worlds in <i>Free Fall</i> : A Search for the Boundary between a Painter's Freedom and Fall	H. TOKIOKA	Letters and Essays 3(4): 17-32	2005年11月
文化人類学	アルタイ地域における乳加工体系—中国新疆ウイグル自治区イリ・カザフ自治州アルタイ地区での事例を通して—	平田 昌弘	北海道民族学会会報 2: 2-15	2006年3月
人文地理学	モンゴル国ドンドゴビ県における宿営地の季節移動システム	平田 昌弘 開発 一郎 ダムディン・バトムンフ 藤倉 雄司 本江 昭夫	沙漠研究 15-3: 139-149	2005年7月
新領域法学	University reform and the collaborative activities of the cooperative research center of Obihiro University	H. WATANABE	2005OASERD-APEID 85-94	2005年12月

☆総 説

分 野	題 目	著 者 名	誌 名	発行年月
獣 医 学	雌牛の繁殖管理に有用な腔内留置型黄体ホルモン製剤(PRID)の特性と応用	三宅 陽一	家畜診療 52 (7): 409-428	2005年7月
	子馬の生産—繁殖技術の向上と分娩期の管理—	三宅 陽一	ホースメイト 46: 31-34	2005年11月
医 学	Role of integrin-linked kinase in neuronal cells.	T. ISHII	Curr. Enzyme Inhibition 1: 3-10	2005年4月

	分子寄生虫学入門—分子的アプローチが紐解く生命現象	青木 克己 北 潔 嘉糠 洋陸	細胞工学 24(10): 1100-1104	2005年10月
	寄生虫に対する“食餌”似て非なる者”の認識メカニズム	青沼 宏佳 嘉糠 洋陸	蛋白質核酸酵素 21(2): 131-137	2006年2月
	アンギオテンシンII受容体拮抗剤を用いたNASHの治療	横浜 吏郎 中村 公英 米田 政志 羽田 勝計	消化器科 40: 110-116	2005年1月
	原発性胆汁性肝硬変の管理	中村 公英	日本医事新報 4261: 90-91	2005年12月
農 学	穂発芽耐性小麦の開発	三浦 秀穂	農林水産技術 研究ジャーナル 28(7): 21-26	2005年7月
農 芸 化 学	植物および真菌由来グルコシルセラミドの食品機能性—食餌性植物および真菌由来グルコシルセラミドの発症予防効果—	間 和彦 大西 正男	食品工業 48(8): 28-37	2005年4月
	「植物セラミド素材」の食品機能性	間 和彦 大西 正男	Food Style 21 9(9): 91-94	2005年9月
	なぜ「ラクトース」はミルクの主要糖質となったのか?	浦島 匡 斎藤 忠夫	J. Appl. Glycosci. 82: 65-70	2005年5月
農 業 工 学	エネルギー資源としてのてん菜	柴田 洋一	砂糖類情報 108: 1-6	2005年9月
環 境 科 学	森林の更新とササの生活史	紺野 康夫	森林の科学 62-63	2005年9月
生物有機科学	Cross-linking chemistry and biology: Development of multifunctional photoaffinity probes	T. TOMOHIRO M. HASHIMOTO Y. HATANAKA	Chem. Record 5: 385-395	2005年11月
	トリフルオロメチルフェニルジアジリンを用いた光アフィニティーラベル法の進歩	橋本 誠	化学と生物 43: 375-377	2005年5月
生 殖 科 学	Blood flow: A key regulatory component of corpus luteum function in the cow	A. MIYAMOTO K. SHIRASUNA M. P. B. WIJAYAGUNAWARDANE, M. HAYASHI D. YAMAMOTO M. MATSUI T. J. ACOSTA	Domest. Anim. Endocrinol. 29(2): 329-339	2005年8月
	Manipulation of ovarian follicle development by injecting vascular endothelial growth factor(VEGF) gene	T. SHIMIZU E. SATO	Reprod. Biol. 5 (3): 257-268	2005年11月

- Promotion of ovarian follicular development by injecting vascular endothelial growth factor (VEGF) and growth differentiation factor 9 (GDF-9) genes
T. SHIMIZU
J. Reprod. Dev. 52(1): 23-32
2006年2月
- A potential use of color ultrasound as a tool for reproductive management: New observations using color ultrasound scanning that were not possible with imaging only in black and white.
A. MIYAMOTO
K. SHIRASUNA
K.G. HAYASHI
D. KAMADA
C. KAWASHIMA
K. KANEKO
T. J. ACOSTA
M. MATSUI
J. Reprod. Dev. 52(1): 153-160
2006年2月

☆著 書

- | 分野 | 題 目 | 著 者 名 | 誌 名 | 発行年月 |
|---------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|---------|
| 獣 医 学 | 雌牛の繁殖障害カラーアトラス | 三宅 陽一 | チクサン出版社
東京 | 2005年9月 |
| 医 学 | 今日の治療指針2005年度版 | 中村 公英 | 医学書院 | 2005年1月 |
| 畜 産 学 | ペーパースラッジ炭化物(PSC)を用いた家畜糞尿の堆肥化促進と臭気低減未利用有機性資源のリサイクル「堆肥化→農地還元」を主体に実態と利用を探る(ニューカントリー2005年夏季臨時増刊号), pp. 109-111 | 谷 昌幸
裏 悦次
肝付 義文
鈴木 善人
鈴木 麻友 | 北海道協同組合通信社
札幌
(ISBN 4-938445-21-2) | 2005年5月 |
| | Practical use of anaerobically digested dairy slurry as a soil resource: collaboration with other wastes. 2nd International Conference on Green House Gases and Animal Agriculture GGAA 2005, pp. 188-192 | M. TANI
N. SAKAMOTO
T. KISHIMOTO
K. UMETSU | ETH, Zurich,
Switzerland
(ISBN 3-906466-27-2) | 2005年9月 |
| | Effect of novel covering digested dairy slurry store on ammonia and methane emissions during subsequent storage. 2nd International Conference on Green House Gases and Animal Agriculture GGAA 2005, pp. 529-532 | N. SAKAMOTO
M. TANI
K. UMETSU | ETH, Zurich,
Switzerland
(ISBN 3-906466-27-2) | 2005年9月 |
| | Formation and evaluation of secondary synthesized humic substances during composting of cattle manures. 2nd International Conference on Green House Gases and Animal Agriculture GGAA 2005, pp. 589-592 | X. LI
M. TANI
M. KOIKE
K. KURAMOCHI | ETH, Zurich,
Switzerland
(ISBN 3-906466-27-2) | 2005年9月 |
| 農 芸 化 学 | 最新畜産物利用学'ー牛乳成分のサイエンス, 脂質ー(齋藤忠夫ら編) | 大西 正男 | 朝倉書店
18-23 | 2006年3月 |
| | 土壌サイエンス入門第7章3. 土壌の有機物 | 筒木 潔
(三枝正彦・木村真人編) | 文永堂出版、東京
138-148 | 2005年8月 |
| 理 学 | 滑空性リス類の進化を探る(動物地理の自然史) Pp. 195-209 | 押田 龍夫
(増田 隆一・阿部 永編) | 北海道大学図書刊行会 | 2005年5月 |

環境科学	Oxalic acid perturbation of imogolite formation and the impact on cadmium adsorption. Soil Abiotic and Biotic Interactions and the Impact on the Ecosystem and Human Welfare, pp. 311-331	M. TANI C. LIU P. M. HUAG	Science Pub. Inc., Enfield, NH, USA (ISBN 1-57808-344-3)	2005年9月
公衆衛生学	危機管理: バイオテロリズムへの対応, 細菌毒素	牧野 壮一 武士 甲一	臨床と微生物 東京 32: 621-627	2005年12月
食品微生物学	食品微生物検査の簡易・迅速・自動化に関する最近の動向	牧野 壮一 武士 甲一	資源環境対策 東京 41(12): 74-79	2005年12月
食品衛生学	容器包装詰食品のボツリヌス食中毒対策について	武士 甲一 駒木 勝 牧野 壮一	食品衛生学雑誌 東京 46(3): 210-212	2005年6月

平成17年度
帯広畜産大学大学院畜産学研究科
修士学位論文題目

畜産管理学専攻

1. 枝肉横断面画像を利用した牛枝肉価格に影響を与える要因の検討
(岡本圭介, 家畜育種増殖学)
2. 完全合成培地を用いたブタ卵母細胞の対外成熟培養および体外発生培養に関する研究
(小林真理子, 家畜育種増殖学)
3. サフォーク種の成長に関する最適な遺伝評価モデルの検討
(中川智史, 家畜育種増殖学)
4. ウシ卵巣における糖輸送体 mRNA 発現およびその調節
(西本博美, 家畜育種増殖学)
5. ヒツジおよびクジラ (ニタリクジラ) 精子の凍結用希釈液の改善
(松岡大記, 家畜育種増殖学)
6. 肥育豚に対する PYY 3-36 の生理学的研究
(伊藤哲也, 家畜生産機能学)
7. レプチンレセプター (Ob-R) の構造と機能的特性に関する研究
(菅野恵里, 家畜生産機能学)
8. ルーメンメタン生成及び消化率・窒素出納に及ぼす混合微生物生菌剤 (BLCSルナシータ) の影響
(高浦一希, 家畜生産機能学)
9. 乳牛における季節的な飼養環境の変化が乳中脂肪酸プロファイルと共役リノール酸 (CLA) に及ぼす影響
(セイン ルウィン, 家畜生産機能学)
10. ヤギにおける栄養状態, インスリン及びレプチンがグレリン分泌に及ぼす影響
(ネイラ・ロエル・マタ, 家畜生産機能学)
11. 鹿追町農協の累積負債経営体に対する融資制度
(松田孝志, 畜産経営管理学)
12. 階層的クラスタリング手法を用いた複数の多項母集団の分類に関する研究
(新家康之, 畜産経営管理学)
13. 乳牛の能力評価における DEA 法適用の検討
(加藤彰通, 畜産資源経済学)

The 2005 Academic Year
Index of Master's Theses for
the Graduate School of Obihiro
University of Agriculture and
Veterinary Medicine

Master's Course of Animal Production
and Agricultural Economics

1. Investigation of factor to influence on beef carcass price using carcass cross section image
(Keisuke OKAMOTO, Animal Genetics and Reproduction)
2. Studies on In Vitro Maturation and In Vitro Culture of Porcine Oocytes Using Defined Media
(Mariko KOBAYASHI, Animal Genetics and Reproduction)
3. Investigations of Optimal Genetic Evaluation Models for Growth of Suffolk Sheep
(Satoshi NAKAGAWA, Animal Genetics and Reproduction)
4. The Expression and Regulation of Glucose Transporters in the Bovine Ovary
(Hiromi NISHIMOTO, Animal Genetics and Reproduction)
5. Improvement of Semen Diluents for Cryopreservation of Ram and Bryde's Whale (*Balaenoptera edeni*) Spermatozoa
(Taiki MATSUOKA, Animal Genetics and Reproduction)
6. Physiological effects of PYY 3-36 in pigs
(Tetsuya ITO, Animal Metabolism and Physiology)
7. Studies on Structural and Functional Characterization of Leptin Receptor (Ob-R)
(Eri KANNO, Animal Metabolism and Physiology)
8. Effect of mixed microbial probiotics (BLCS) on rumen methane production, digestibility and nitrogen balance
(Kazuki TAKAURA, Animal Metabolism and Physiology)
9. Effects of Seasonal Changes in Feeding Regime for Dairy Cows on Fatty Acid Profiles and the Conjugated Linoleic Acid (CLA) in Milk
(Sein LWIM, Animal Metabolism and Physiology)
10. Regulatory Effects of Feeding State, Insulin and Leptin on Plasma Ghrelin Levels in Goats
(Neyra Roel MATA, Animal Metabolism and Physiology)
11. The lending system of Shikaoi agricultural cooperative for accumulated debt farmers
(Takashi MATSUDA, Farm Management)
12. A Classification of Multinomial Populations Based on Hierarchical Clustering Methods
(Yasuyuki SHINKA, Farm Management)
13. A study on Individual Evaluation of dairy cattle by Data Envelopment Analysis
(Akimichi KATO, Agricultural Policy and Resource Economics)

畜産環境科学専攻

Master's Course of Agro-Environmental Science

1. プロトプラスト融合による昆虫病原性糸状菌 *Verticillium lecanii* (*Lecanicillium* spp.) の生物防除資材としての育種
(相内大吾, 作物科学)
 2. 遺伝子導入花粉の受粉による組換えトウモロコシの作出に関する研究
(青山文弥, 作物科学)
 3. 花粉ベクター法によるユリの形質転換に関する研究
(中村洋文, 作物科学)
 4. カラムツの落葉が作物および雑草の生長に及ぼす影響
(木村由香, 草地学)
 5. ポテトデンプンの給与が反芻家畜の大腸内発酵に及ぼす影響
(村田 暁, 草地学)
 6. 牧草の異なるバイオメカニクス特性に反応したヒツジの採食行動
(デグァー エンヒー, 草地学)
 7. オーストラリア, クィーンズランド州ノースストラッドブローク島におけるコアラ *Phascolarctos cinereus* の樹木選択性一特に食性に関連して一
(谷崎美由記, 生態系保護学)
 8. 農耕地景観におけるマルハナバチによる花資源の利用
(岡田梨江, 生態系保護学)
 9. イネ科とマメ科牧草の地上および地下部の混在が両草の地上群落の光環境および根系生育に及ぼす影響
(唐渡 愛, 生態系保護学)
 10. 飼育下のヒョウ *Panthera pardus* およびユキヒョウ *P. uncia* における常同行動の発現要因としての採餌欲求の検証
(須田直子, 生態系保護学)
 11. 襟裳岬海岸部でのクロマツ植林後の時間経過と外生菌根菌種組成の変化
(成瀬朝美, 生態系保護学)
 12. 都市型孤立林における地上歩行性甲虫類の生態学的研究一特に分布と環境要因との関連について一
(山本 充, 生態系保護学)
 13. 農業流域小河川を対象とした高校生に対する環境教育の実践とその評価
1. Breeding of Entomopathogenic Fungus *Verticillium lecanii* (*Lecanicillium* spp.) by Protoplast Fusion Using Nitrate Non-utilizing (*nit*) Mutant
(Daigo AIUCHI, Crop Science)
 2. Production of Transgenic Maize (*Zea mays* L.) by Pollination with Bombarded Pollen
(Fumiya AOYAMA, Crop Science)
 3. Transformation of Lily (*Lilium* × *formolongi*) Seedling by Pollen Vector Method.
(Hirofumi NAKAMURA, Crop Science)
 4. Inhibition Effects of Larch Litter on the Growth of Crops and Weeds
(Yuka KIMURA, Grassland Science)
 5. EFFECT OF FEEDING POTATO PULP SILAGE ON FERMENTATION IN LARGE INTESTINE OF RUMINANT
(Satoshi MURATA, Grassland Science)
 6. Sheep Foraging Behaviour in Response to Different Biomechanical Characteristics of Forage
(Devee ENKHEE, Grassland Science)
 7. The Tree Species Preferences of Koalas, *Phascolarctos cinereus*, on North Stradbroke Island, Queensland -With Particular Reference to Diet-
(Miyuki TANIZAKI, Preservation and Management of Ecosystems)
 8. Exploiting flower resources of bumblebees, *Bombus* (Hym., Apidae) in the agricultural landscape
(Rie OKADA, Preservation and Management of Ecosystems)
 9. The Effects of Coexistence of Top and Underground Parts of Grass and Legume on Light Environment and Growth of Root System of Both Species
(Ai KARATO, Preservation and Management of Ecosystems)
 10. Inspection of Relationship between Stereotypic Behavior and Foraging Appetites in Captive Leopards, *Panthera pardus*, and Snow Leopards, *P. uncia*.
(Naoko SUDA, Preservation and Management of Ecosystems)
 11. Ectomycorrhizal fungi proceed with time in reforested *Pinus thunbergii* forest at coastal sand dune in Erimo-misaki in Hokkaido
(Tomomi NARUSE, Preservation and Management of Ecosystems)
 12. Ecological studies of ground beetles in city model fragment forests
-About distribution in particular and connection with an environmental factor-
(Mitsuru YAMAMOTO, Preservation and Management of Ecosystems)
 13. Agricultural brook study with Evaluation of high school environmental education

(芦澤 満, 土地資源利用学)

14. 草本植物の根系を含む土層のせん断特性と斜面保全対策
(持田和寿, 土地資源利用学)
15. 牛糞尿の堆肥化に伴う腐植物質の生成と機能
(李 香珍, 土地資源利用学)
16. ディーゼル混焼型バイオガスエンジンにおけるバイオガス
利用効率向上に関する検討
(青木賢二, 生物生産システム工学)
17. バイオガス燃料電池システムに関する研究
(入江広太, 生物生産システム工学)
18. 十勝地域のバイオマスとその活用に関する研究
(菊池貞雄, 生物生産システム工学)
19. バイオガスプラントにおける大腸菌群及び腸球菌の不活性
化に関する研究
(瀧本淳徳, 生物生産システム工学)
20. 太陽追尾方式ソーラーウォールパネルの集熱特性
(横山広美, 生物生産システム工学)
21. トラクタ用作業機のうね自動追従システムのためのレーザ
式作物列センサの開発に関する研究
(申 宝明, 生物生産システム工学)
22. ソーラーウォールと豆殻燃焼装置の集熱特性と農産残さ物
の乾燥に関する研究
(肉孜 阿木提, 生物生産システム工学)

生物資源化学専攻

1. 酵母由来グルコシルセラミド(GlcCer)特異的抗体の作成と
可変領域の解析
(小出憲一, 応用生命科学)
2. ツクシウロコゴケ(*Heteroscyphus planus*)培養細胞による
多水酸芳香族化合物 bisphenol A とリグニン化合物の生
分解
(大笹 稿, 応用分子生物学)
3. ロケット・サラダの葉に含まれるグルコシノレートに関す
る研究
(川原田 千阿弥, 応用分子生物学)
4. *Klebsiella oxytoca* の植物成長促進効果における高カタ

(Mitsuru ASHIZAWA, Land Resource Science and
Engineering)

14. Shear Characteristics on Soil Specimen Including
Roots of Herbaceous Plants and Measures of Slope
Conservation
(Kazutoshi MOCHIDA, Land Resource Science and
Engineering)
15. Formation and function of humic substances during
composting of cattle manures
(LI Xiangzhen, Land Resource Science and
Engineering)
16. The Efficiency of Biogas Supply Controller for Dual
Fuel Biogas Engine
(Kenji AOKI, Engineering in Agricultural and
Biological Systems)
17. Study on a Biogas Fuel Cell
(Kouta IRIE, Engineering in Agricultural and
Biological Systems)
18. Study one Effective use of Biomass Tokachi region
(Sadao KIKUCHI, Engineering in Agricultural and
Biological Systems)
19. A note on survival of *Coli-aerogenes* group and
Enterococcus during anaerobic digestion and storage
in full-scale biogas plants
(Atsunori TAKIMOTO, Engineering in Agricultural and
Biological Systems)
20. Characteristics of heat collection for sun tracking
type solar wall panel
(Hiromi YOKOYAMA, Engineering in Agricultural and
Biological Systems)
21. Studies on Development of Laser Crop Row Sensor for
Automatic Furrow Guidance System of Tractor
Implements
(Baoming SHEN, Engineering in Agricultural and
Biological Systems)
22. Studies on Drying of Farm Product Residues Using
Solar Energy and Combustion Heat of Bean Husks
(Rouzi AMUTI, Engineering in Agricultural and
Biological Systems)

Master's Course of Bioresource Chemistry

1. Establishment of monoclonal antibodies to yeast
glucosylceramides
(Ken-ichi KOIDE, Applied Life Science)
2. Biodegradation of Polyhydroxylated aromatic compounds,
lignin-substructure model compound and bisphenol A
by liverwort *Heteroscyphus planus*
(Takashi OHSASA, Applied Molecular Biology)
3. Study on Glucosinolates from the Leaves of Rocket
Salad
(Chiami KAWAHARADA, Applied Molecular Biology)
4. Influence of the Enhancement of Catalase Activity on

ラーゼ活性化の影響
(須藤 麻希子, 応用分子生物学)

5. ダイズ種子抽出液に应答するダイズ根粒菌遺伝子の網羅的発現解析
(魏 敏, 応用分子生物学)
6. 植物細胞の分化転換制御メカニズムの研究
(小林はつみ, 応用分子生物学)
7. 伝統的発酵乳由来乳酸菌の炎症モデルにおける機能性
(島津朋之, 生物資源利用学)

畜産衛生学専攻

1. 食肉の熟成とプロテアソーム-ユビキチン系の関連について
(上高原 充, 食肉乳衛生学)
2. 枝肉に付着した中枢神経組織を除去するための枝肉洗浄装置を用いた洗浄方法の検討
(久保直樹, 食肉乳衛生学)
3. 生乳および発酵乳製品からのセレブロシド高蓄積乳酵母の探索
(菅井理子, 食肉乳衛生学)
4. 牛難消化性たんぱく質のラット血清脂質への影響
(ナランゴダ リヤナゲ ブッディルビニ, 食肉乳衛生学)
5. 十勝産農産物に含まれる健康機能性成分の検索
(渡邊荘子, 食肉乳衛生学)
6. ウシ黄体形成と血管新生に関する研究
—VEGF 抗体投与によるウシ黄体形成抑制効果の解析—
(鎌田大地, 家畜生産衛生学)
7. 牛枝肉横断面撮影装置の開発および画像解析を用いた新たな肉質評価法に関する研究
(高橋健一郎, 家畜生産衛生学)
8. ウシ卵巣における卵胞発育の分子メカニズム～Growth differentiation factor-9 (GDF-9) および Bone morphogenetic protein (BMP) の関与～
(バラナ・チャヤワダナ・ジャヤワダナ, 家畜生産衛生学)
9. 分娩後の早期初回排卵に関連する代謝内分泌環境の解析
(吹原早織, 家畜生産衛生学)
10. 3種細胞による混合培養法を用いたウシ黄体退行に関する研究—黄体周辺部血流活動域増加現象におけるPGF_{2α}と一酸化窒素の効果—
(山本 大, 家畜生産衛生学)

the Plant Growth Promoting Effects of *Klebsiella oxytoca*
(Makiko SUDO, Applied Molecular Biology)

5. Expression Analyses of the *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 Induced with Soybean Seed Extracts
(Wei Min, Applied Molecular Biology)
6. Comparative study on somatic embryogenesis between two carrot cultivars
(Hatsumi KOBAYASHI, Applied Molecular Biology)
7. The effect of lactic acid bacteria isolated and identified from traditional fermented milk on inflammatory model
(Tomoyuki SHIMAZU, Food Science and Technology)

Master's Course of Animal and Food Hygiene

1. Relationships between meat conditioning and muscle intracellular proteasome-ubiquitin pathway in beef
(Mitsuru KAMITAKAHARA, Meat and Milk Hygiene)
2. Examination of the washing method using the carcass washing equipment for removing the central-nerves tissue adhering to a carcass
(Naoki KUBO, Meat and Milk Hygiene)
3. Survey of Cerebrosides Accumulation in Lactose-assimilating Yeasts isolated from Milk as well as Natural fermented milk products
(Michiko SUGAI, Meat and Milk Hygiene)
4. Undigested Animal Protein Reduces Serum Lipids in Rats.
(NARANGODA LIYANAGE Buddhi Ruvini, Meat and Milk Hygiene)
5. Research of Health Functional Ingredients in Agricultural Products in Tokachi area
(Shoko WATANABE, Meat and Milk Hygiene)
6. Study of Corpus Luteum and Angiogenesis in the Cow—Suppression of early stage of corpus luteum development and angiogenesis by antibody against vascular endothelial growth factor in the cow—
(Daichi KAMADA, Animal Production Hygiene)
7. Development of photography equipment for the cross section of beef and investigation of new evaluation method of meat quality using image analysis
(Kenichiro TAKAHASHI, Animal Production Hygiene)
8. Molecular Mechanism of Follicular Development in Bovine Ovary: Involvement of Growth Differentiation Factor-9 (GDF-9) and Bone Morphogenetic Protein (BMP)
(Barana C. Jayawardana, Animal Production Hygiene)
9. Analysis of Metabolic and Endocrine Factors Related to Ovulation of the Dominant Follicle at the First Follicular Wave Postpartum in Dairy Cows
(Saori FUKIHARA, Animal Production Hygiene)
10. A study of bovine luteolysis using co-culture system with three different cell types
—The effect of PGF_{2α} and NO in the increase of blood flow surrounding the corpus luteum—

(Dai YAMAMOTO, Animal Production Hygiene)

- | | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>11. 乳牛におけるヨーネ病防疫対策シミュレーションおよびその評価
(窪田さと子, 食品衛生経済学)</p> <p>12. 水産加工企業におけるプロセスコントロールシステム導入の経済的効果と障壁に関する研究
(高橋直嗣, 食品衛生経済学)</p> <p>13. 乳房炎原因菌と搾乳衛生・環境衛生の因果関係に関する研究
(西島瑛佑, 食品衛生経済学)</p> <p>14. 食品における赤痢菌検出法の標準化と感度の向上
(門田修子, 食品有害微生物学)</p> <p>15. スモークサーモン製造施設におけるリステリア汚染調査
(服部憲子, 食品有害微生物学)</p> <p>16. <i>Ornithodoros moubata</i> hemocytes のモノクローナル抗体の特性解明
(伊奈幸恵, 人畜共通感染症学)</p> | <p>11. Simulating and evaluating the Johne's disease preventive measures in dairy cattle
(Satoko KUBOTA, Food Safety Economics)</p> <p>12. Study on the effects of Process Control System in Seafood Industry
(Naotsugu TAKAHASHI, Food Safety Economics)</p> <p>13. Study on a causal relationship between bacillus of Mastitis and hygiene of surroundings and milking
(Eisuke NISHIJIMA, Food Safety Economics)</p> <p>14. Detection of <i>Shigella</i> from oyster by PCR and progress for sensitivity
(Shuko MONDEN, Food Microbiology and Animal Hygiene)</p> <p>15. Survey of <i>Listeria monocytogenes</i> contamination in smoked salmon processing plants.
(Noriko HATTORI, Food Microbiology and Animal Hygiene)</p> <p>16. Characterization of Monoclonal Antibodies Against the Argasid Tick <i>Ornithodoros moubata</i> Hemocytes
(Sachie INA, Zoonotic Infections)</p> |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

平成 17 年度岐阜大学大学院連合獣医学研究科

博士学位論文題目

1. ラットにおける寒冷馴化時の食情報調節に関する研究 齋藤 正二

平成 17 年度岩手大学大学院連合農学研究科

博士学位論文題目

1. 寒冷地におけるアズキ種子と幼植物の特性に関する比較作物学的研究 何 寧
(Comparative study on the characteristics of seeds and seedlings of azuki bean in cool weather regions)
2. マイクロ波減衰量計測による牧草水分の測定 塚本 隆行
(Determination of the Moisture Content of Forage by Microwave Attenuation)
3. ビートモラセスを原料としたセレブロシド高蓄積酵母の培養技術の開発 田村 雅彦
(Studies on cerebroside production by yeasts from beet molasses)
4. 有機ゲルマニウム化合物Ge-132の生理作用に関する研究 中村 宜司
(Physiological Functions of Ge-132, an Organic Germanium Compound)
5. Biological functions of *Chlorella pyrenoidosa* with reference to chemoprevention and excretion of dioxins 竹越 英夫
(化学的発がん予防およびダイオキシン類排泄に関する *Chlorella pyrenoidosa* の生物学的機能に関する研究)
6. アンデス高地のアカザ科雑穀キヌアとカニワの生態と利用に関する研究 藤倉 雄司
(Studies on ecology and utilization of the family *Chenopodiaceae* grains, quinoa and cañihua, of the Andean highland)

帯 大 研 報
RES. BULL. OBIHIRO UNIV.

編集委員 (* 委員長)

秋 本 正 博 押 田 龍 夫 * 北 村 延 夫
木 下 幹 朗 楠 田 尚 史 時 岡 裕 純
弘 中 和 憲 八 重 樫 伸 男 度 会 雅 久
(五十音順)

平成18年10月 発行

編 集
発 行

国立大学法人 帯広畜産大学

北海道帯広市稲田町西2線11番地

RESEARCH BULLETIN OF OBIHIRO UNIVERSITY

CONTENTS

Natural Science

Agronomy

Tensile and shearing properties of leaves in festulolium and perennial ryegrass
Akio HONGO and Devee ENKHEE 1

Position and rate of intestinal fermentation in adult ostrich evaluated by volatile fatty acid
Akio HONGO, Yukiko ISHII, Hidetaka SUZUTA, Devee ENKHEE, Yuji TOUKURA, Masaaki HANADA, Satoshi HIDAHA and Shunzo MIYOSHI 9

Animal Science

Survey on the dispatch of Japan Overseas Cooperation Volunteers in the field of secondary agricultural education -From 1991 to 2001-
Mutsuyo KADOHIRA and Yoshiaki HAYASHI 15

Polyphenols and their antioxidative activities in 8 kinds of edible beans
Michiyuki KOJIMA, Takeshi MORITA, Yusuke SAITO and Shigenori NISHI 23

A comparison of ascorbate peroxidases from varieties of Adzuki bean
Michiyuki KOJIMA, Yusuke SAITO and Shinji YAMASHITA 29

Biological control of *Verticillium* black spot of Japanese radish by entomopathogenic *Verticillium lecanii* (*Lecanicillium* spp.)
Kaori KUSUNOKI, Ayako KAWAI, Daigo AIUCHI, Masanori KOIKE, Masayuki TANI and Katsuhisa KURAMOCHI 39

Biological control of *Verticillium* black spot of Japanese radish using *Bacillus* spp. and genotypic differentiation of selected antifungal *Bacillus* strains with antibiotic marker
Ayako KAWAI, Kaori KUSUNOKI, Daigo AIUCHI, Masanori KOIKE, Masayuki TANI and Katsuhisa KURAMOCHI 49

Environmental Science

Low-molecular-weight aliphatic carboxylic acids in soils incubated with decomposing forest litter
Masayuki TANI, Masanori KOIKE, Katsuhisa KURAMOCHI and Teruo HIGASHI 59

Preliminary survey on the role of large-scale ranch in conserving wild animals and plants -From a case study in Kenya highland-
Masahiro HIRATA, Mutsuyo KADOHIRA, Fumi MIZUTANI, Kazuha MATSUMOTO, Hiroshi KOAZE and Masatoshi SATO 69

Humanities

Literature

An introductory study on Shu Ema “Yama no Tami” [3]: A research on the process of rewriting (3) · From original version to Gakkai version (C-x) · · · · · 77
Jun'ichi SHIBAGUCHI · · · · ·

Human geography

Milk processing systems in east Africa
Masahiro HIRATA, Mutsuyo KADOHIRA, Fumi MIZUTANI, Kazuha MATSUMOTO,
Hiroshi KOAZE, Kenji UCHIDA and Hidemasa MOTOSHIMA · · · · · 105

A List of Academic Contribution In 2005 · · · · · 113

The 2005 Academic Year, Index of Master's Theses for the Graduate School of Obihiro University
of Agriculture and Veterinary Medicine · · · · · 130

The 2005 Academic Year, Index of Dissertation for the United Graduate School of
Veterinary Science, Gifu University · · · · · 135

The 2005 Academic Year, Index of Dissertation for the United Graduate School of
Agricultural Science, Iwate University · · · · · 135