

ISSN 2435 — 0885

CODEN : SDSKF 6

島根大学生物資源科学部研究報告

Bulletin of the Faculty of Life and Environmental Sciences

Shimane University

No. 30 2025

島 根 大 学

Shimane University

Matsue, Japan

January, 2026

目 次 CONTENTS

[学術論文]

Research Papers

河本苺夏・比嘉真美・内藤一真・西村浩二・地阪光生・清水英寿

エイコサペンタエン酸の抗脂肪形成作用に関する機序検討：PPARs および cAMP シグナル伝達経路に着目して----- 1

Ryousuke Nangel・Makoto Ueno

Inhibitory activity of Shikuwasa peel extract against the Fusarium wilt disease caused by *Fusarium buharicum*----- 8

河合駿介・大野紗椰・菊川裕幸・山下 多聞

副資材に竹チップを利用した堆肥製造の試み----- 13

エイコサペンタエン酸の抗脂肪形成作用に関する機序検討：PPARs および cAMP シグナル伝達経路に着目して

河本苺夏^{1,2}, 比嘉真美³, 内藤一真³, 西村浩二^{2,3,4}, 地阪光生^{2,3,4}, 清水英寿^{2,3,4*}

Mechanistic Insights into the Anti-Adipogenic Effects of Eicosapentaenoic Acid: Focus on PPARs and the cAMP Signaling Pathway

Moka Kawamoto^{1,2}, Manami Higa³, Kazuma Naito³, Kohji Nishimura^{2,3,4}, Mitsuo Jisaka^{2,3,4}, Hidehisa Shimizu^{2,3,4*}

¹ 鳥取県立鳥取西高等学校

² 島根大学生物資源科学部生命科学科

³ 島根大学大学院自然科学研究科農生命科学専攻

⁴ 島根大学学術研究院農生命科学系

*Corresponding author: hideshowmz@life.shimane-u.ac.jp

Abstract The prevalence of obesity and type 2 diabetes in Japan is rising, largely due to the westernization of dietary habits. Controlling adipogenesis is a key strategy for prevention. Eicosapentaenoic acid (EPA), an n-3 polyunsaturated fatty acid, is known to exert anti-adipogenic effects; however, its detailed molecular mechanism during the critical “differentiation induction phase” remains unclear. This study aimed to elucidate how EPA suppresses adipogenesis in 3T3-L1 cells, with a focus on the cAMP signaling pathway. Cells were treated with EPA (50 μ M) exclusively during the 48-hour differentiation induction phase. Lipid accumulation was evaluated by Oil Red O staining, and signaling pathways were analyzed using specific antagonists and Western blotting. EPA treatment markedly reduced lipid accumulation. Since antagonists of PPAR α and PPAR γ also inhibited adipogenesis, EPA is unlikely to exert its effects through activation of these receptors. Mechanistically, EPA decreased PKA phosphorylation, suggesting reduced intracellular cAMP levels. This key finding of cAMP depletion implies a concurrent shutdown of cAMP-dependent pathways, including Epac, which is essential for differentiation. We propose that EPA exerts its anti-adipogenic effect primarily by suppressing cAMP production via a G α i-protein-coupled receptor mechanism, thereby inhibiting the initiation of adipogenesis.

Keywords: Adipogenesis, cAMP, Eicosapentaenoic acid, G α i-coupled receptor, Signal transduction

はじめに

近年、肥満は世界規模での公衆衛生上の深刻な脅威となっている。Seidell and Halberstadt (2015) の報告によれば、肥満は2型糖尿病、心血管疾患、および特定のがんの発症リスクを上昇させ、その疾病負荷は増大の一途をたどっている。日本国内においても、2型糖尿病患者数は増加傾向

にあり、その背景には生活習慣の変化が深く関与しているとされている (Araki et al. 2020)。

2型糖尿病の発症には、遺伝的素因によるインスリン分泌能の低下に加え、環境的要因である生活習慣の悪化が重なることでインスリン抵抗性が惹起される (Kahn et al. 2006)。環境的要因の中でも、食生活の欧米化（動物性脂肪の過剰摂取と魚介類摂取の減少）に伴う肥満は、脂肪組

織からの炎症性サイトカインの分泌異常を引き起こし、全身の代謝恒常性を破綻させる主因となる。Tsugane (2021) によれば、日本人の食生活において肉類の摂取量が魚介類の摂取量を上回る「食事の欧米化」が進行しており、これがn-3系多価不飽和脂肪酸の摂取不足と肥満のリスク増大を招いていると指摘されている。

肥満の組織学的実体は、白色脂肪組織の過剰な蓄積である。これは、既存の脂肪細胞が肥大化する「Hypertrophy」と、前駆脂肪細胞が新たに分化・増殖する「Hyperplasia」の二つのプロセスからなる。特に、過栄養状態においては前駆脂肪細胞の動員と分化が亢進するため、この分化プロセス (Adipogenesis) を分子レベルで制御することは、肥満の予防において極めて重要である。

脂肪細胞分化の研究モデルとしては、Green and Kehinde (1975) によって樹立されたマウス由来3T3-L1細胞が最も広く用いられている。3T3-L1細胞は、適切なホルモン刺激 (分化誘導剤) を受けることで、線維芽細胞様の形態から脂肪滴を蓄積した球形の成熟脂肪細胞へと劇的に変化する。この過程は、(1) 増殖期、(2) 分化誘導期、(3) 成熟期の3段階に厳密に区分され、特に分化誘導期 (MDIカクテル: 3-isobutyl-1-methylxanthine [IBMX], デキサメタゾン、インスリン) 刺激直後の48時間である「分化誘導期」は、細胞運命が決定される不可逆的なフェーズとして知られる。

分化誘導期における分子イベントの中で、最も重要なトリガーの1つがcAMP (環状AMP) シグナルである。MDIカクテルに含まれるIBMXは、ホスホジエステラーゼを阻害して細胞内cAMP濃度を一過性に上昇させる。従来、cAMPの作用は主にcAMP依存性プロテインキナーゼ (Protein Kinase A : PKA) を介して行われると考えられてきた。しかし、PKAが脂肪前駆細胞の分化を抑制するという報告もあり (Li et al. 2008)、その詳細な役割については議論が存在する。加えて、近年の研究により、cAMPの標的分子はPKAだけではないことが明らかになっている。特に注目されているのが、cAMPにより直接活性化されるグアニンヌクレオチド交換因子 (Exchange protein directly activated by cAMP : Epac) である。Ji et al. (2010) の研究によれば、3T3-L1細胞の分化において、PKAの触媒活性自体は必ずしも必須ではなく、Epacの活性化こそがCCAAT/enhancer-binding protein β やPeroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR) γ の誘導に不可欠であるとされている。また、Petersen et al. (2008) も、cAMPによる分化誘導

にはEpac経路とPKA経路の相乗的な作用が必要であることを報告している。

エイコサペンタエン酸 (Eicosapentaenoic acid: EPA) は、青魚に多く含まれるn-3系多価不飽和脂肪酸であり、抗炎症作用やインスリン感受性改善作用を有することが報告されている (Oh et al. 2010; Lorente-Cebrián et al. 2012)。我々の研究グループのNartey et al. (2023) は、3T3-L1細胞においてEPAが抗脂肪形成効果を示すことを報告したが、その詳細な分子メカニズム、特に分化決定段階におけるシグナル伝達への影響については未解明な点が残されていた。そこで本研究では、EPAが脂肪前駆細胞の成熟抑制に効果を発揮するメカニズムを明らかにすることを目的とした。

材料と方法

材料

本研究で使用した各種試薬および抗体は、以下の供給元から入手した。抗 β -アクチン抗体 (C4) はSanta Cruz Biotechnology社 (米国・テキサス州ダラス) から供給された。抗PKAリン酸化抗体はCell Signaling Technology社 (米国・マサチューセッツ州ダンバース) から供給された。ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギIgG (H+L) および抗マウスIgG (H+L) 抗体はJackson ImmunoResearch Laboratories社 (米国・ペンシルベニア州ウェストグローブ) から入手した。プロテアーゼ阻害剤カクテル (EDTAフリー) (100 \times) およびホスファターゼ阻害剤カクテルはナカライテスク株式会社 (日本・京都) から供給された。ペニシリンーストレプトマイシン溶液 ($\times 100$)、ジメチルスルホキシド (Dimethyl Sulfoxide : DMSO)、デキサメタゾン (Dexamethasone)、IBMX、組換えヒトインスリン (Insulin)、低グルコースおよび高グルコースのDulbecco's改変イーグル培地 (Dulbecco's modified Eagle's medium : DMEM) 共に、和光純薬工業株式会社 (日本・大阪) から購入した。EPAはCayman Chemical社 (米国・ミシガン州アナーバー) から供給された。GW6471 (PPAR α アンタゴニスト) とGW9662 (PPAR γ アンタゴニスト) はSelleck Chemicals社 (米国・テキサス州ヒューストン) から入手した。Oil Red OはSigma-Aldrich社 (米国・ミズーリ州セントルイス) から購入した。胎児ウシ血清 (Fetal Bovine Serum : FBS) はMP Biomedicals社 (米国・オハイオ州ソロン) から供給された。

3T3-L1細胞の維持および脂肪形成の誘発

脂肪前駆細胞である3T3-L1細胞の維持は、10%FBSとペニシリン・ストレプトマイシン溶液含有の DMEM-低グルコース培地で行った。また、3T3-L1細胞の脂肪形成誘発および解析は次の手順で行った (図1)。3T3-L1細胞を3.5 cm dishに、細胞数が 2×10^5 となるよう播種した。増殖期では、10% FBSとペニシリン・ストレプトマイシン溶液含有の DMEM-高グルコース培地を用いて合計4日間培養を行った (2日に1度培地交換)。分化期 (Day -2~0) では、10% FBS含有DMEM-高グルコース培地に、分化誘導剤 (0.5 mM IBMX, 1 μ M デキサメタゾン, 10 μ g/mL インスリン) を添加した分化誘導培地を用いた。この際、実験群に応じて溶媒 (エタノールおよびDMSO), EPA (50 μ M), GW6471 (10 μ M), またはGW9662 (20 μ M) をそれぞれ添加し、48時間培養した。成熟期 (Day 0~10) では、10%FBSとペニシリン・ストレプトマイシンに加え、インスリンを DMEM-高グルコース培地に添加し、10日間培養を行った (2日に1度培地交換)。

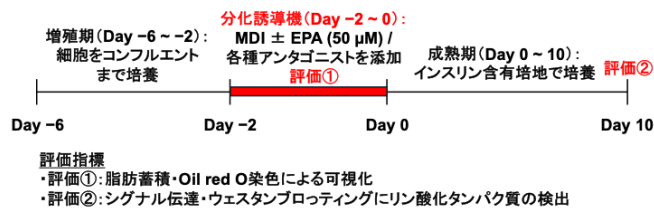


図1. 3T3-L1細胞の分化誘導および実験プロトコルの概略
 図. 3T3-L1前駆脂肪細胞をコンフルエントになるまで培養した (増殖期: Day -6~-2)。分化誘導は、MDIカクテル (0.5 mM IBMX, 1 μ M デキサメタゾン, 10 μ g/mL インスリン) を用いてDay -2からDay 0まで行った (分化誘導期)。EPA (50 μ M) および各アンタゴニスト (GW6471またはGW9662) は、この分化誘導期にのみ処置した。Day 0以降は、インスリンのみを含む成熟培地にて培養した (成熟期)。脂肪蓄積はDay 10にOil Red O染色により評価し、シグナル伝達解析は分化誘導期に実施した。MDI: 3-isobutyl-1-methylxanthine, Dexamethasone, and Insulin。

Oil Red O染色による細胞内脂質の可視化

10日間培養を行った成熟細胞に分化した3T3-L1細胞を10%ホルマリンで固定し、その後PBS (-) で2回洗浄した。次に、固定したMDIカクテル誘導分化細胞を60%イソプロパノールで処理した後、60%イソプロパノールに溶解したOil Red Oで染色した。Oil Red Oで処理した細胞は60%イソプロパノールで洗浄し、さらにPBS (-) で2回洗浄した。最後に、Oil Red Oで染色された細胞内脂質を可視化した。

なお、染色の手順はRamírez-Zacarias et al. (1992) の方法に準じて行った。また、本実験は独立して3回実施し、再現性を確認した。図中に示した画像データは、得られた結果の中から代表的なものを提示した。

ウェスタンブロッティング

10%FBS, ペニシリン・ストレプトマイシン, 分化誘導剤 (IBMX・デキサメタゾン・インスリン) をDMEM-高グルコース培地に添加したコントロール溶液, コントロール溶液にEPAを加えたEPA溶液, それぞれを各時間, 増殖期が終了した3T3-L1細胞に処理し, その後に細胞を回収した。回収した細胞は氷上で, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10%グリセロール, プロテアーゼ阻害剤カクテル, ホスファターゼ阻害剤カクテルを含む1% NP-40バッファーで溶解した。調製したタンパク質抽出液はSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し, Immobilon-Pポリフッ化ビニリデン膜 (Millipore Inc., 米国・マサチューセッツ州ベッドフォード) に転写した。膜は次の特異的抗体でインキュベートした: 抗phospho-PKA (PKAリン酸化) 抗体 (1:1000) および抗 β -actin抗体 (C4) (1:5000)。その後, 次の二次抗体を用いてインキュベートした: ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギIgG (H+L) (1:5000) および抗マウスIgG (H+L) 抗体 (1:5000)。標的タンパク質の検出は, Chemi-Lumi One L (ナカライテスク株式会社, 日本・京都) を用いて行い, その後ImageQuant LAS 4010デンストメーター (GE Healthcare Life Sciences, スウェーデン・ウプサラ) で解析した。タンパク質レベルは β -actinを内部標準とした。

結果

分化誘導期におけるEPA処理は成熟脂肪細胞への分化を強力に抑制する

詳細な機序検討に先立ち, まず我々の先行研究 (Nartey et al. 2023) で示されたEPAの抗脂肪形成作用が, 本実験系においても再現されるか検証した。分化のスイッチが入る「分化誘導期」の48時間のみEPA (50 μ M) を添加し, その後は通常の成熟培地で培養した。Oil Red O染色の結果, 対照群 (Vehicle) では細胞全体に高い染色レベルが認められ, 赤色に染色された多数の脂肪滴の蓄積が確認された。一方, 分化誘導期にEPAを処理した群では, 先行研究と同様, 対照群と比較して染色レベルが明瞭に低下しており, 成熟期終了時点においても脂肪滴の形成が抑制されてい

る様子が観察された (図2). 本実験は独立して3回実施し、いずれの場合も同様の結果が得られることを確認した。なお、本実験で用いた50 μ MのEPA濃度は、先行研究において3T3-L1細胞に対し有意な細胞毒性を示さないことが既に報告されている。以上の結果は、EPAが成熟期の脂肪合成酵素を直接阻害したのではなく、分化誘導期における「脂肪細胞への分化決定 (コミットメント)」プロセスそのものを不可逆的に阻害していることを、改めて強く支持するものである。

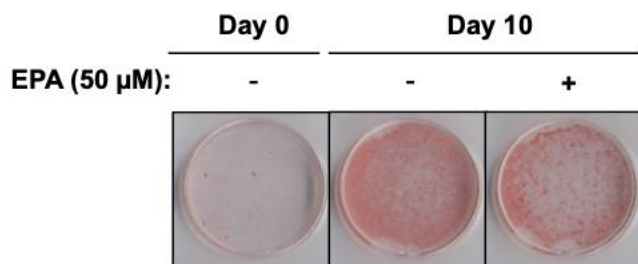


図2. 分化誘導期における脂質蓄積に対するEPAの影響. 3T3-L1細胞に対し、MDIカクテルを用いて分化誘導を行った。EPA (50 μ M) は、分化誘導期のみに添加した。Day 10にOil Red O染色を行い、脂質蓄積を可視化した。EPA処理は、我々の先行研究と同様、MDIカクテルによって誘導される脂質蓄積を抑制した。写真は独立して行った3回の実験のうち、代表的な結果を示している。EPA: Eicosapentaenoic acid; MDI: 3-isobutyl-1-methylxanthine, Dexamethasone, and Insulin.

EPAの抗脂肪形成作用はPPAR α およびPPAR γ の活性化を介さない

EPAはPPAR α およびPPAR γ のリガンド (アゴニスト) として作用することが広く知られている (Krey et al. 1997). そこで、EPAがこれらの受容体を介して抑制効果を発揮しているのかを検証するため、PPAR α アンタゴニスト (GW6471 10 μ M) およびPPAR γ アンタゴニスト (GW9662 20 μ M) を用いた阻害実験を行った。結果として、GW6471 およびGW9662を単独で処理した群では、対照群と比較してOil Red Oによる染色レベルが低下していた (図3および図4). 本実験は独立して3回実施し、いずれの場合も同様の結果が得られることを確認した。このことは、「PPAR α およびPPAR γ の活性化は、3T3-L1細胞の分化に必須である」という生物学的定説を再確認するものである。ここで重要なのは、EPA処理群もアンタゴニスト処理群と同様に脂

肪形成を抑制したという事実である。もし仮に、EPAがPPAR α やPPAR γ を「活性化 (アゴニストとして作用)」することで脂肪蓄積を抑制しているのであれば、アンタゴニストの添加によりその効果は阻害 (キャンセル) されるはずである。しかし実際には、アンタゴニスト単独でも抑制効果を示した。これは、EPAによる抗脂肪形成作用が、PPAR α およびPPAR γ の直接的な活性化を介したものではないことを示している。むしろ、EPAの効果は、これらPPARsの活性化に至るより上流のシグナルが遮断された結果、下流プロセスが起動しなかったためである可能性を示唆している。

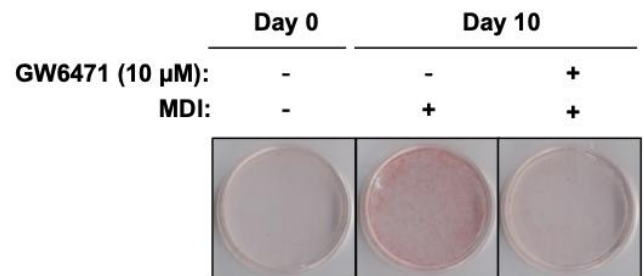


図3. 脂質蓄積に対するPPAR α アンタゴニストGW6471の影響. 3T3-L1細胞に対し、MDIカクテルを用いて分化誘導を行った。PPAR α アンタゴニストであるGW6471 (10 μ M) は、分化誘導期のみに添加した。Day 10にOil Red O染色を行い、脂質蓄積を可視化した。GW6471処理は、MDIカクテルによって誘導される脂質蓄積を抑制した。写真は独立して行った3回の実験のうち、代表的な結果を示している。MDI: 3-isobutyl-1-methylxanthine, Dexamethasone, and Insulin; PPAR α : Peroxisome Proliferator-activated Receptor- α .

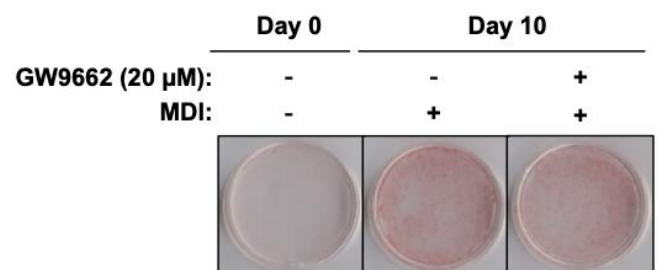


図4. 脂質蓄積に対するPPAR γ アンタゴニストGW9662の影響. 3T3-L1細胞に対し、MDIカクテルを用いて分化誘導を行った。PPAR γ アンタゴニストであるGW9662 (20 μ M) は、分化誘導期のみに添加した。Day 10にOil Red O染色を行い、脂質蓄積を可視化した。GW9662処理は、MDIカクテルによって誘導される脂質蓄積を抑制した。写真は独

立して行った3回の実験のうち、代表的な結果を示している。MDI: 3-isobutyl-1-methylxanthine, Dexamethasone, and Insulin; PPAR γ : Peroxisome Proliferator-activated Receptor- γ .

EPAは分化誘導期のPKAリン酸化レベルを低下させる

PPAR α およびPPAR γ よりも上流のシグナルとして、分化誘導のトリガーであるcAMPシグナルに着目した。通常、MDIカクテルによる刺激(特にIBMX)は、細胞内cAMP濃度を上昇させ、PKAを活性化(リン酸化)する。図5で示すウェスタンブロットティングの結果のように、対照群ではMDIカクテルによる刺激後にPKA基質のリン酸化レベルの上昇が経時的に抑制されていた。一方、EPAを共添加した群では、このPKAリン酸化レベルの上昇が経時的に抑制されていた。本研究では細胞内cAMP濃度の直接測定は行っていないものの、PKAの活性化(リン酸化)が細胞内cAMP濃度の上昇に依存することは細胞生物学的に広く知られている。したがって、本実験で観察されたPKAリン酸化レベルの低下は、EPA処理によって細胞内のcAMPレベルの上昇が抑制されたことを強く示唆するものである。

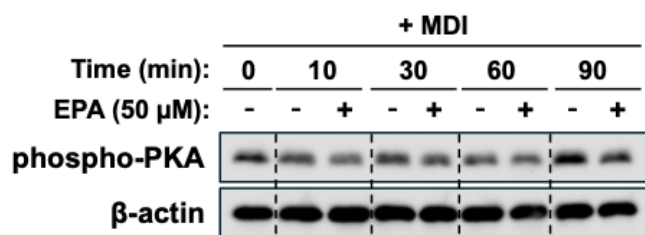


図5. 分化誘導期におけるPKAシグナルに対するEPAの影響。増殖期が終了した3T3-L1細胞に対し、EPA (50 μM)の存在下(+)または非存在下(-)でMDIカクテルによる刺激を行った。指示された時間(0, 10, 30, 60, 90分)で細胞溶解液を回収した。PKAのリン酸化レベルを、抗phospho-PKA (PKAリン酸化)抗体を用いたウェスタンブロットティングにより解析した。β-アクチンはローディングコントロールとして用いた。EPA処理は、MDIカクテルによって誘導されるPKA基質のリン酸化を抑制した。EPA: Eicosapentaenoic acid; MDI: 3-isobutyl-1-methylxanthine, Dexamethasone, and Insulin.

考 察

本研究では、EPAが脂肪前駆細胞の分化誘導期において細胞内cAMPレベルを低下させることで、抗脂肪形成作用を発揮する可能性が示された。特に本研究の結果から、

EPAの作用はPPAR α およびPPAR γ の直接的な活性化を介したものではないことが示唆された。さらに、我々の先行研究(Nartey et al. 2023)において、PKA阻害剤H89を用いた解析ではEPAによる分化抑制効果が一部解除されるという結果が得られている。本研究で示唆された細胞内cAMP低下という結果と合わせると、そのメカニズムが単なるPKA経路の遮断に留まらず、PKAとは異なるcAMP依存性経路(Epac経路など)の制御を含んでいる可能性が高いと予想される。

細胞内cAMP産生レベルの低下によるシグナル抑制の意義

脂肪細胞の分化において、初期(分化誘導期)の細胞内でのcAMP濃度上昇は必須のトリガーである。本研究で示された「EPAによるPKAリン酸化の低下」は、EPAが細胞内cAMPレベルを低下させ、このトリガー機構そのものを不活性化したことを示唆している。先行研究(Ji et al. 2010; Petersen et al. 2008)によれば、分化誘導条件として、cAMPの下流ではPKAだけでなく、Epac経路の活性化が必須であるとされる。したがって、EPAによる細胞内cAMPの産生レベルの低下は、PKAおよびEpacの両経路へのシグナル供給の減弱に繋がり、これが分化抑制の主因であると考えられる。前述の通り、PKA阻害剤H89を用いた実験ではEPAの効果が完全には再現されない(Nartey et al. 2023)。このことは、EPAによる細胞内cAMPの産生低下が、H89では阻害できない経路(すなわちEpac経路)をも遮断していることを示唆している。よって、Epac経路の遮断こそが、EPA特有の強力な分化抑制効果の本質である可能性が高い。

Gaiタンパク質共役型受容体の関与の可能性

EPAによる細胞内cAMPレベル低下メカニズムについて、受容体の観点から考察する。脂肪細胞における主要なEPA受容体であるGPR120 (FFAR4)は、主にGaqやβ-アレスチン経路を活性化するが、アデニル酸シクラーゼを阻害するGaiタンパク質との共役は一般的ではない(Yamada et al. 2017)。一方、GPR40 (FFAR1)はGaiタンパク質と共役し、cAMP産生を抑制し得ることが報告されている(Hamdouchi et al. 2016)。3T3-L1細胞におけるGPR40の発現レベルについては議論があるものの、本研究で観察された「EPA刺激による即時的なcAMP産生抑制」は、薬理的にGaiタンパク質共役型受容体の活性化を強く示唆する挙動である。本研究では受容体の特定には至っていないが、

GPR40あるいは類似の特性を持つ受容体がEPAに応答し、Gaiタンパク質を介してアデニル酸シクラーゼを阻害したというモデルが、観測されたデータ (cAMP低下) を最も矛盾なく説明できる。

研究の限界と今後の展望

本研究は、EPAが脂肪細胞の分化誘導期においてcAMPシグナルを抑制するという新規メカニズムを提唱するものであるが、いくつかの限界が存在し、今後の課題として残されている。第一に、EPAが細胞内cAMPレベルを低下させる詳細な分子機構の特定である。本研究ではGaiタンパク質共役型受容体 (GPR40等) の関与を示唆したが、EPAが細胞膜の流動性を変化させ、アデニル酸シクラーゼ活性に直接影響を与えている可能性や、cAMP分解酵素であるホスホジエステラーゼ (PDE) を活性化させている可能性も完全には排除できない。今後、GPR40特異的アンタゴニストやsiRNAを用いた機能阻害実験、あるいはPDE阻害剤を用いた解析を行うことで、上流シグナルの全容を解明する必要がある。第二に、Epac経路の関与に関する直接的な証明である。本研究ではPKA阻害剤の結果からEpac経路の重要性を推察したが、Epac特異的活性化剤 (8-pCPT-2'-O-Me-cAMPなど) を用いたレスキュー実験や、Epac遺伝子のノックダウン実験を行うことで、この仮説をより強固なものにする必要がある。第三に、EPAの代謝産物の影響である。EPAは細胞内で代謝され、COX経路等を介して抗炎症性プロスタグランジン (PGE3など) へと変換される。Nartey et al. (2023) も指摘しているように、EPAそのものではなく、これら代謝産物が受容体を介して作用している可能性についても、COX阻害剤等を用いた検討が待たれる。最後に、生体レベルでの検証である。本研究で得られた3T3-L1細胞における知見が、実際の肥満モデル動物やヒト脂肪組織においても同様に機能しているかを検証することは、臨床応用へ向けた重要なステップとなるだろう。

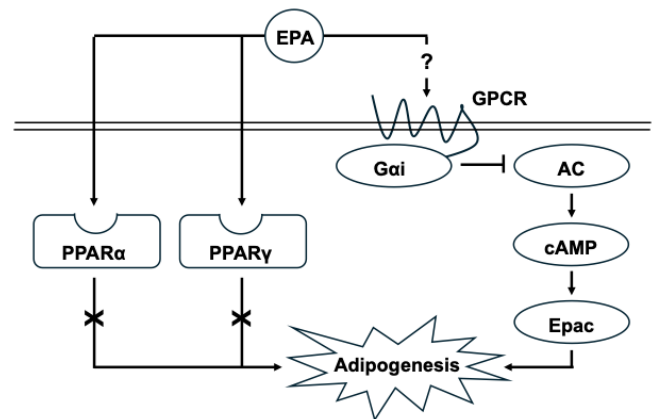


図6. EPAの抗脂肪形成作用に関する想定メカニズムの概略図。EPAは分化誘導期において抗脂肪形成作用を発揮する。本研究の結果から、この作用はPPARαやPPARγの直接的な活性化を介したものではないことが示された。その代わりに、EPAはGaiタンパク質共役型受容体 (GPR40など) を介してアデニル酸シクラーゼの活性を抑制し、細胞内cAMPの産生レベルを低下させる。このcAMPの細胞内での産生低下が、Epac経路などの下流シグナルの不活性化を招き、その結果として脂肪細胞分化の開始が阻害されると考えられる。AC: Adenylate Cyclase; EPA: Eicosapentaenoic acid; Epac: Exchange protein directly activated by cAMP; GPCR: G Protein-coupled Receptor; PPARα: Peroxisome Proliferator-activated Receptor α; PPARγ: Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ。

まとめ

本研究では、EPAが脂肪前駆細胞の分化誘導期において、PPARαおよびPPARγの直接的な活性化を介さずに、抗脂肪形成作用を発揮する可能性を明らかにした。その詳細なメカニズムとして、EPAが受容体 (Gai共役型受容体) を介して細胞内cAMP産生を抑制し、これにより分化に必須なシグナル伝達系 (PKAおよびEpac経路) を遮断するという「EPA-cAMP-Epac軸」の存在が強く示唆された。これらの知見は、EPAが単なる栄養素としてだけでなく、細胞内シグナル伝達のモジュレーターとして機能することを示しており、将来的な肥満予防・治療戦略における新たな分子的基盤を提供するものである。

謝 辞

本研究は、国立研究開発法人科学技術振興機構 (JST) の次世代人材育成事業「グローバルサイエンスキャンパス (GSC)」の支援を受けて実施された。ここに記して謝意

を表する.

参考文献

- Araki, E., Goto, A., Kondo, T., Noda, M., Noto, H., Origasa, H., Osawa, H., Taguchi, A., Tanizawa, Y., Tobe, K. and Yoshioka, N. (2020) Japanese Clinical Practice Guideline for Diabetes 2019. *Journal of Diabetes Investigation*, 11(4): 1020–1076.
- Green, H. and Kehinde, O. (1975) An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell*, 5(1): 19–27.
- Hamdouchi, C., Kahl, S. D., Patel Lewis, A., Cardona, G. R., Zink, R. W., Chen, K., Eessalu, T. E., Ficorilli, J. V., Marcelo, M. C., Otto, K. A., Wilbur, K. L., Lineswala, J. P., Piper, J. L., Coffey, D. S., Sweetana, S. A., Haas, J. V., Brooks, D. A., Pratt, E. J., Belin, R. M., Deeg, M. A., Ma, X., Cannady, E. A., Johnson, J. T., Yumibe, N. P., Chen, Q., Maiti, P., Montrose-Rafizadeh, C. and Chen, Y. (2016) The Discovery, Preclinical, and Early Clinical Development of Potent and Selective GPR40 Agonists for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus (LY2881835, LY2922083, and LY2922470). *Journal of Medicinal Chemistry*, 59(24): 10891–10916.
- Ji, Z., Mei, F. C. and Cheng, X. (2010) Epac, not PKA catalytic subunit, is required for 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *Frontiers in Bioscience (Elite Ed)*, 2(2): 392–398.
- Kahn, S. E., Hull, R. L. and Utzschneider, K. M. (2006) Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*, 444(7121): 840–846.
- Krey, G., Braissant, O., L'horset, F., Kalkhoven, E., Perroud, M., Parker, M. G. and Wahli, W. (1997) Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Molecular Endocrinology*, 11(6): 779–791.
- Li, F., Wang, D., Zhou, Y., Zhou, B., Yang, Y., Chen, H. and Song, J. (2008) Protein kinase A suppresses the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Cell Research*, 18(2): 311–323.
- Lorente-Cebrián, S., Bustos, M., Martí, A., Fernández-Galilea, M., Martínez, J. A. and Moreno-Aliaga, M. J. (2012) Eicosapentaenoic acid inhibits tumour necrosis factor- α -induced lipolysis in murine cultured adipocytes. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 23(3): 218–227.
- Nartey, M. N. N., Shimizu, H., Sugiyama, H., Higa, M., Syeda, P. K., Nishimura, K., Jisaka, M. and Yokota, K. (2023) Eicosapentaenoic Acid Induces the Inhibition of Adipogenesis by Reducing the Effect of PPARgamma Activator and Mediating PKA Activation and Increased COX-2 Expression in 3T3-L1 Cells at the Differentiation Stage. *Life (Basel)*, 13(8): 1704.
- Oh, D. Y., Talukdar, S., Bae, E. J., Imamura, T., Morinaga, H., Fan, W., Li, P., Lu, W. J., Watkins, S. M. and Olefsky, J. M. (2010) GPR120 Is an Omega-3 Fatty Acid Receptor Mediating Potent Anti-inflammatory and Insulin-Sensitizing Effects. *Cell*, 142(5): 687–698.
- Petersen, R. K., Madsen, L., Pedersen, L. M., Hallenborg, P., Hagland, H., Viste, K., Døskeland, S. O. and Kristiansen, K. (2008) Cyclic AMP (cAMP)-mediated stimulation of adipocyte differentiation requires the synergistic action of Epac- and cAMP-dependent protein kinase-dependent processes. *Molecular and Cellular Biology*, 28(11): 3804–3816.
- Ramírez-Zacarias, J. L., Castro-Muñozledo, F. and Kuri-Harcuch, W. (1992) Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil red O. *Histochemistry*, 97(6): 493–497.
- Seidell, J. C. and Halberstadt, J. (2015) The global burden of obesity and the challenges of prevention. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 66 Suppl 2: 7–12.
- Tsugane, S. (2021) Why has Japan become the world's most long-lived country: insights from a food and nutrition perspective. *European Journal of Clinical Nutrition*, 75(6): 921–928.
- Yamada, H., Umemoto, T., Kakei, M., Momomura, S. I., Kawakami, M., Ishikawa, S. E. and Hara, K. (2017) Eicosapentaenoic acid shows anti-inflammatory effect via GPR120 in 3T3-L1 adipocytes and attenuates adipose tissue inflammation in diet-induced obese mice. *Nutrition & Metabolism (Lond)*, 14: 33.

Inhibitory activity of Shikuwasa peel extract against the Fusarium wilt disease caused by *Fusarium buharicum*

Ryousuke Nange¹, Makoto Ueno^{1,2*}

Abstract: Fusarium wilt, caused by *Fusarium buharicum*, is an emerging disease of okra in Japan, first reported in 2018. It causes severe damage to seedlings. Current control strategies rely on chemical fungicides, but repeated use may reduce pathogen sensitivity. Plant secondary metabolites are promising sources of natural fungicidal compounds. In this study, we evaluated the inhibitory activity of Shikuwasa peel extracts on *F. buharicum*. High-pressure extracts of Shikuwasa peel prepared at 200 °C for 1–3 h showed a time-dependent inhibition of conidial germination. Furthermore, volatile compounds from these extracts, tested using a two-compartment Petri dish method, significantly inhibited conidial germination and showed fungicidal activity. A GC–MS analysis identified 16 volatile compounds that increased after 3 h, with eucalyptol showing the largest rise. These findings indicate that Shikuwasa peel extract could serve as a promising natural control agent against Fusarium wilt in okra.

Keywords: *Fusarium buharicum*, Fusarium wilt disease, Inhibitory activity, Shikuwasa peel extract

¹ Graduate School of Natural Science and Technology, Shimane University

² Laboratory of Plant Pathology, Faculty of Life and Environmental Sciences, Shimane University

*Corresponding author. E-mail address: makoto-u@life.shimane-u.ac.jp

Introduction

Okra (*Abelmoschus esculentus*), a member of the *Malvaceae* family, is an important vegetable crop cultivated worldwide. In Japan, okra production reached 11,100 t in 2022 (MAFF, 2022). Production is concentrated in Kagoshima, Kochi, and Okinawa Prefectures, which together account for 74% of the national output. In Okinawa, annual production reaches about 985 t, underscoring its regional significance. According to the List of Plant Diseases in Japan (Phytopathological Society of Japan, 2025), 18 diseases have been reported on okra. In Okinawa, damping-off during the seedling stage is primarily caused by *Pythium* spp. and *Rhizoctonia* spp., while *Phytophthora* spp. is associated with post-pruning decline (Hokama, 1983, 1990). More recently, Fusarium wilt caused by *Fusarium buharicum* was added to the disease list following surveys in 2015–2016 (Kotani et al., 2018). Although several fungicides were previously shown to be effective (Hokama, 1983), some are no longer registered, and excessive chemical use may lead to resistance, highlighting the need for alternative control strategies.

Plants naturally produce an estimated 200,000 to 1,000,000 secondary metabolites, many of which exhibit antimicrobial

properties and serve as potential leads for novel agrochemicals (Ahn et al., 1991; Dixon & Strack, 2003; Serit et al., 1991a, 1991b; Ueno & Yoshikiyo, 2014). Shikuwasa (*Citrus depressa*), a specialty citrus fruit of Okinawa, is produced at approximately 3,270 tons annually (MAFF, 2022), with nearly 50% of the biomass discarded as waste (Okamoto & Okamoto 2025). Its peel contains bioactive compounds such as nobiletin, a polymethoxylated flavonoid (Wada et al., 2017), and aroma constituents including limonene and γ -terpinene, which exhibit antibacterial activity against *Escherichia coli* (Okamoto & Okamoto, 2025). However, antifungal activity against plant pathogens remains unexplored. Previous studies have demonstrated that extracts obtained using high-pressure reaction and decomposition systems can be utilized for plant disease control (Okido et al., 2022). This study aimed to evaluate the inhibitory and fungicidal effects of high-pressure extracts from shikuwasa peel against *F. buharicum*, the causal agent of okra Fusarium wilt.

Materials and Methods

Shikuwasa peel extract

Segments of Shikuwasa peel were cut with a sterile blade. One

gram of peel was placed on gauze suspended above 5 mL of sterile distilled water in a high-pressure reaction vessel (HU-25; SAN-AI Kagaku Co. Ltd., Aichi, Japan) to avoid direct contact with water. The vessel was sealed and heated at 200 °C for 1, 2, or 3 h. The resulting extract was filtered through a 0.22- μ m nylon syringe filter (AS ONE Corp., Osaka, Japan) and used for subsequent assays.

Pathogen

Fusarium buharicum strain OKI-1, isolated from diseased okra roots in Okinawa Prefecture, was maintained on potato sucrose agar (PSA: 200 g/L potato, 2% sucrose, 2% agar) slants at 25 \pm 2 °C. For inoculation tests, the pathogen was cultured on PSA or rice bran agar (RBA: 50 g/L rice bran, 2% sucrose, 2% agar) for 14 days to induce sclerotia formation.

Inhibitory activity assay

Conidial suspensions ($4.5\text{--}5.0 \times 10^4$ conidia/mL) were mixed with Shikuwasa peel extracts prepared under different conditions (200 °C for 1, 2, or 3 h) and placed on glass slides in a moist chamber at 25 \pm 2 °C. After 24 h, conidial germination was assessed microscopically. Sterile distilled water served as a control. Three hundred conidia per treatment were examined. Data represent means from three independent experiments, each with three replicates. Germination percentage was calculated as: Percentage of conidial germination = (number of germinated conidia / total number of conidia) \times 100.

Antagonistic assay of volatile compounds

Conidia of *F. buharicum* ($1.5\text{--}2.0 \times 10^4$ conidia/mL) suspended in phosphate buffer (pH 7.4) were placed onto glass slides and positioned on one side of a divided Petri dish. Then, 2 mL of Shikuwasa peel extract was added to the other side. As a control, 2 mL of distilled water was added instead of the peel extract. The Petri dish was sealed with parafilm and maintained in a moist chamber at 25 \pm 2 °C for 24 h after which conidial germination was observed by light microscopy. Two hundred conidia per experiment were assessed for germination in each treatment. Data are the means of results from three independent experiments. The percentage of conidial germination was calculated using the following formula: Percentage of conidial germination = (number of conidia germinated/total number of conidia) \times 100.

In vitro fungicidal assay of volatile compounds

Conidia of *F. buharicum* ($1.5\text{--}2.0 \times 10^4$ conidia/mL) suspended in phosphate buffer (pH 7.4) were placed onto glass slides and positioned on one side of a divided Petri dish. Then, 2 mL of Shikuwasa peel extract was added to the other side. As a control, 2 mL of distilled water was added instead of the peel extract. The Petri dish was sealed with parafilm and maintained in a moist chamber at 25 \pm 2 °C. After 24 h incubation, the glass slide was transferred into a plastic case containing a moist chamber without Shikuwasa extract and re-incubated at 25 \pm 2 °C. After 24 h, conidial germination was observed by light microscopy. Two hundred conidia per experiment were assessed for germination in each treatment. Data are the means of results from three independent experiments. The percentage of conidial germination was calculated using the following formula: Percentage of conidial germination = (number of conidia germinated/total number of conidia) \times 100.

GC-MS analysis

Volatile compounds were analyzed using HS-SPME coupled with GC-MS. An SPME fiber (50/30 μ m DVB/Carboxen/PDMS) was exposed to the headspace at 60 °C for 40 min, then desorbed at 250 °C onto a DB-Heavy WAX column (60 m \times 0.25 mm, 0.25 μ m). The oven program was: 40 °C (5 min), ramp to 135 °C at 4 °C/min, then to 270 °C at 12 °C/min (hold 5 min). MS was operated in scan mode (33–500 m/z). Compounds were identified using the NIST17 library.

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm SD. Differences among treatments were analyzed using Tukey–Kramer test (SPSS Statistics v22.0; IBM, Armonk, NY, USA). Significance was set at $p < 0.05$.

Results

Inhibitory activity of Shikuwasa peel extract on conidial germination of *F. buharicum*

To evaluate the direct effect of Shikuwasa peel extract, conidial germination was examined under different extraction conditions (200 °C for 1, 2, and 3 h). Morphological deformation and disintegration of conidia were observed in sample treated with extracts obtained after 2 and 3 h (Fig. 1). Shikuwasa peel extract inhibited conidial germination in a time-dependent manner. In

the extract conditions at 200 °C 1 h, 2 h, and 3 h, conidial germination rates were $14.4 \pm 21.9\%$, 0% , and 0% , respectively. In the control (distilled water), germination was $48.4 \pm 28.7\%$.

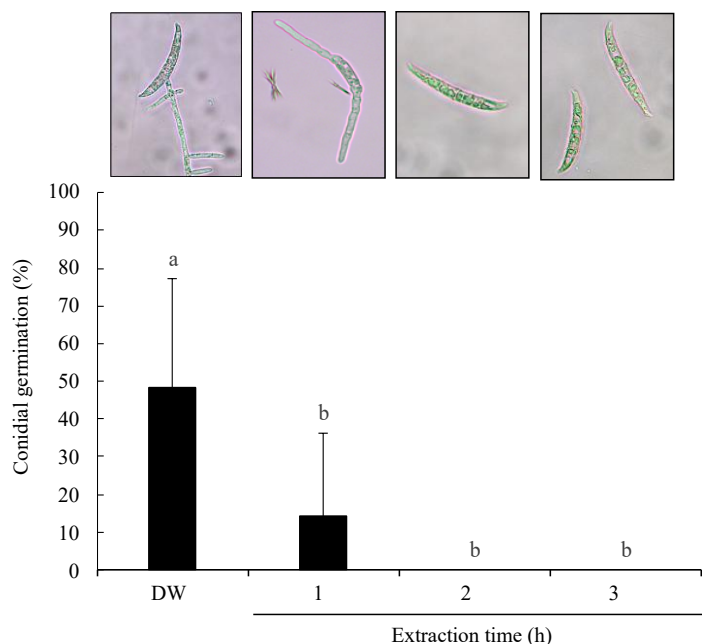


Fig. 1. The effect of Shikuwasa peel extract on conidial germination of *Fusarium buharicum*. Conidial suspensions ($4.5\text{--}5.0 \times 10^4$ conidia/mL) were treated with Shikuwasa peel extracts prepared at 200 °C for 1, 2, or 3 h, incubated at 25 ± 2 °C for 24 h, and examined for germination by light microscopy. Distilled water served as the control. Values represent means of three independent experiments with three replicates each. Error bars indicate standard deviation. Means followed by the same letter are not significantly different (Tukey-Kramer test, $p < 0.05$).

The effect of volatile compounds from Shikuwasa peel extract on the conidial germination rate of *F. buharicum*

To evaluate the inhibitory activity of volatile compounds from Shikuwasa peel extract, conidial germination of *F. buharicum* was assessed. Germination was markedly reduced compared to the control (distilled water) (Fig. 2). Germination rates were $78.3 \pm 22.1\%$ for the control and $47.7 \pm 21.6\%$, $0.6 \pm 1.5\%$, and 0% for extracts obtained after 1, 2, and 3 h, respectively (Fig. 2)

Fungicidal effect of volatile compounds from Shikuwasa peel extract on the conidial germination rate of *F. buharicum*

To evaluate the fungicidal activity of volatile compounds from Shikuwasa peel extract, conidial germination of *F. buharicum* was assessed. Germination was markedly reduced compared to the control (distilled water) (Fig. 3). Germination rates were $76.1 \pm 15.3\%$ for the control and $55.7 \pm 23.2\%$, $3.3 \pm 5.4\%$, and 0% for extracts obtained after 1, 2, and 3 h, respectively (Fig. 3).

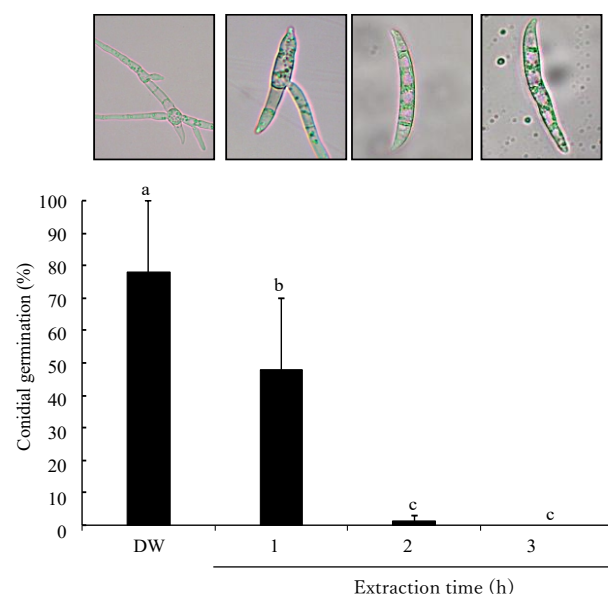


Fig. 2. The effect of volatile compounds from Shikuwasa peel extract on conidial germination of *Fusarium buharicum*. Conidial suspensions ($1.5\text{--}2.0 \times 10^4$ conidia/mL) were placed on one side of a divided Petri dish, and 2 mL of Shikuwasa peel extract (prepared at 200 °C for 1, 2, or 3 h) was added to the opposite side. Distilled water served as the control. Plates were sealed and incubated at 25 ± 2 °C for 24 h, after which germination was assessed by light microscopy. Values represent means of three independent experiments with three replicates each. Error bars indicate standard deviation. Means followed by the same letter are not significantly different (Tukey-Kramer test, $p < 0.05$).

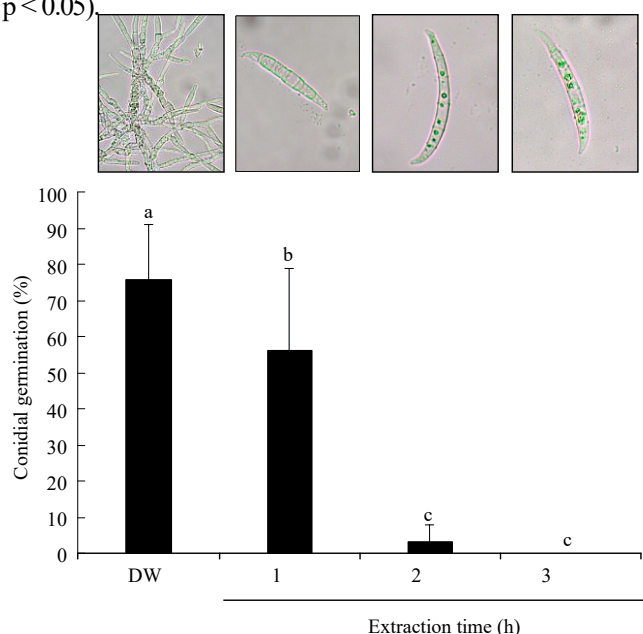


Fig. 3. Fungicidal effect of volatile compounds from Shikuwasa peel extract on conidial germination of *Fusarium buharicum*. Conidial suspensions ($1.5\text{--}2.0 \times 10^4$ conidia/mL) were placed on one side of a divided Petri dish, with 2 mL of Shikuwasa peel extract (200 °C for 1, 2, or 3 h) on the opposite side. Distilled water served as the control. Plates were incubated at 25 ± 2 °C for 24 h, then slides were transferred to a fresh moist chamber without extract for another 24 h. Values are means of three experiments with three replicates. Error bars indicate SD. Means with the same letter are not significantly different (Tukey-Kramer test, $p < 0.05$).

Table 1. The effect of extraction time on the production of volatile compounds from Shikuwasa peel

Chemical compounds	Extraction time		Fold-change (vs 1h)
	1h	3h	
Eucalyptol	203086	3784998	18.6
Bicyclo[2.2.1]heptan-2-ol, 1,3,3-trimethyl-, (1R-endo)	54557	708919	13
Ethanone, 1-(2-furanyl)	41243	500387	12.1
Phenol, 4-ethyl-2-methoxy	20634	233618	11.3
7-Oxabicyclo[2.2.1]heptane, 1-methyl-4-(1-methylethyl)	202722	1916896	9.5
2,4-Cycloheptadien-1-one, 2,6,6-trimethyl	214956	1731236	8.1
Cyclohexanol, 1-methyl-4-(1-methylethenyl)	96430	479937	5
Furfural	2673718	13000000	4.9
Isoborneol	193036	797464	4.1
Benzaldehyde, 4-(1-methylethyl)	65091	197343	3
Phenol, 2-methyl-5-(1-methylethyl)	190256	526364	2.8
Phenol, 2-methyl-5-(1-methylethyl)	76048	208232	2.7
1H-Pyrrole-2-carboxaldehyde	60706	155894	2.6
Cyclohexanol, 1-methyl-4-(1-methylethenyl)	555217	1118070	2
Phenol, 2-methyl-5-(1-methylethyl)	597342	1081581	1.8
Phenol, 3,5-bis(1,1-dimethylethyl)	633481	831617	1.3

Effect of extraction time on the production of volatile compounds from Shikuwasa peel

Volatile compounds in Shikuwasa peel extracts after 1 and 3 hours of extraction were analyzed by headspace GC-MS. Sixteen compounds detected an increase in peak area at 3 h compared to 1 h, with fold changes ranging from 1.3 to 18.6. The compound exhibiting the greatest increase was Eucalyptol, which increased by 18.6-fold (Table 1).

Discussion

The use of synthetic pesticides has long been the primary method for preventing crop losses caused by plant diseases. However, excessive use has led to resistant strains, complicating sustainable disease management (FRAC, 2018). Therefore, compounds with different modes of action are needed to develop alternative strategies. While microbial metabolites have traditionally been explored, plants also produce diverse secondary metabolites with antimicrobial properties. For example, ethanol extracts of bamboo containing 2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone inhibited rice blast infection (Ueno & Yoshikiyo, 2014), and high-pressure extracts from Sasa leaves suppressed rice blast disease (Okido et al., 2022).

This study evaluated the inhibitory effect of high-pressure extracts from *Citrus depressa* (Shikuwasa) peel against *F. buharicum*, the causal agent of okra wilt. Extracts obtained at 200 °C suppressed conidia germination, with longer extraction times (2–3 h) showing stronger activity. These findings indicate that extraction time is critical for obtaining antifungal compounds, consistent with previous reports that time, temperature, and pressure influence antimicrobial yield (Li et al.,

2009; Rodrigues et al., 2003).

A notable feature of high-pressure extracts is the retention of volatile compounds. Volatile organic compounds from essential oils of *Origanum vulgare* and *Thymus vulgaris* inhibit fungal growth (Álvarez-García et al., 2023), and our results similarly showed that volatile organic compounds in Shikuwasa peel extracts suppressed conidia germination and exhibited fungicidal activity. GC-MS analysis revealed 16 compounds that increased with extraction time, with Eucalyptol showing the greatest increase. Previous studies reported that Shikuwasa peel contains d-limonene, γ -terpinene, and Eucalyptol (Teramoto et al., 2010), and essential oils from Shikuwasa residues inhibited *Escherichia coli* (Okamoto & Okamoto, 2025). These findings suggest that Eucalyptol and other volatile organic compounds may contribute to antifungal activity, warranting further investigation.

In conclusion, Shikuwasa peel extracts prepared under high-pressure conditions suppressed *F. buharicum*, highlighting their potential for soil disinfection and sustainable disease management.

Acknowledgement(s)

The authors thank the Faculty of Life and Environmental Science at Shimane University and SDGs Research Project of Shimane University for their financial support in publishing this report.

References

- Ahn, Y.J., Kawamura, T., Kim, M., Yamamoto, T., Mitsuoka, T. (1991) Tea polyphenols: selective growth inhibitors of

- Clostridium* spp. Agricultural and Biological Chemistry, **55**: 1425–1426.
- Álvarez-García, S., Mounni, M., Romanazzi, G. (2023) Antifungal activity of volatile organic compounds from essential oils against the postharvest pathogens *Botrytis cinerea*, *Monilinia fructicola*, *Monilinia fructigena*, and *Monilinia laxa*. Frontiers in Plant Science, **14**: 1274770.
- Common names of plant diseases in Japan (2025) Phytopathological Society of Japan.
- Dixon, RA., Strack, D. (2003) Phytochemistry meets genome analysis, and beyond. Phytochemistry, **62**: 815–816.
- FRAC (2018) Publications. Fungicide Resistance Action Committee.
- Hokama, K. (1983) Occurrence of okura damping-off and its chemical control on Okinawa Prefecture. Proceeding of the Association for Plant Protection of Kyushu, **29**: 36–39.
- Hokama, K. (1990) On the root rot disease of okura by *Phytophthora* spp. Proceeding of the Association for Plant Protection of Kyushu, **36**: 52–55.
- Kotani, Y., Yamamoto, K., Ooshiro, A., Ajitomi, A., Yamashiro, M., Hirooka, Y. (2018) Fusarium wilt of okra caused by *Fusarium buharicum*. Japanese Journal of Phytopathology, **84**: 201.
- Li, Z., Lin, H., Yamasaki, N., Kamitakahara, M., Ioku, K. (2009) Extraction of organic compounds from Sugi (*Cryptomeria japonica*) leaves using superheated steam and evaluation of the antimicrobial activity of the extracts. Journal of Material Cycles and Waste Management, **20**: 361–370.
- MAFF (2022). Statistics on specialty vegetables. Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan.
- Okamoto, T., Okamoto, T. (2025) Bactericidal effect of essential oil of Shiikuwasha squeezed juice residue and estimation of its mechanism. Bulletin of the Center for Research in Science Education Faculty of Education Ehime University, **4**: 44–48.
- Okido, T., Ino, M., Kamada, I., Kihara, J., Ueno, M. (2022) Biological activity of Kuma bamboo grass (*Sasa veitchii*) extract against the fungal causal agent (*Pyricularia oryzae*) of blast disease. Advances in Bamboo Science, **1**: 100004.
- Rodrigues, MRA., Caramao, EB., Dos Santos, JG., Dariva, C., Oliveira, JV., (2003). The effects of temperature and pressure on the characteristics of the extracts from highpressure CO₂ extraction of *Majorana hortensis* Moench. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **51**: 453–456.
- Serit, M., Okubo, T., Hagiwara, N., Kim, M., Nonaka, GI., Nishioka, I., Yamamoto, T. (1991a) Comparative antibacterial activity of quercitol gallates. Agricultural and Biological Chemistry, **55**: 1893–1894.
- Serit, M., Okubo, T., Su, R. H., Hagiwara, N., Kim, M., Iwagawa, T., Yamamoto, T. (1991b) Antibacterial compounds from Oak, *Quercus acuta* Thunb. Agricultural and Biological Chemistry, **55**: 19–23.
- Teramoto-Inafuku, S., Yamamoto, M., Kinjyo, H., Kitajima, A., Wada, K., Kawamitsu, Y. (2010) Local citrus genetic resources and their polymethoxyflavones content in northern part of Okinawa island. Horticultural Research (Japan), **9**: 263–271.
- Ueno, M., Yoshikiyo, K., (2014) 2,6-Dimethoxy-1,4-benzoquinone enhances resistance against the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. Journal of Phytopathology, **162**: 731–736.
- Wada, K. (2017) Shiikuwasha (*Citrus depressa* Hayata): Biological function and aroma. Journal of Analytical Bio-Science, **40**: 271–278.

副資材に竹チップを利用した堆肥製造の試み

河合 駿介¹・大野 紗椰^{2,3}・菊川 裕幸⁴・山下 多聞²

¹島根大学大学院自然科学研究科, ²島根大学生物資源科学部, ³現 兵庫県立農業高校, ⁴神戸学院大学現代社会学部

Trial for compost production using bamboo chips as an auxiliary material

Shunsuke KAWAI¹, Saya ONO^{2,3}, Hiroyuki KIKUKAWA⁴ and Tamon YAMASHITA²

¹Graduate School of Natural Science and Technology, Shimane University, ²Faculty of Life and Environmental Sciences, Shimane University, ³Present: Hyogo Prefectural Agricultural High School, ⁴Faculty of Contemporary Social Studies, Kobe Gakuin University

Abstract Abandoned bamboo forest is expanding and causes the social and environmental problems in Shimane Prefecture. We tried to find the way to utilize the expanding bamboo forest as resources, not as a troublemaker. Producing cow dung compost using bamboo culm chips is one of potential usage of bamboo in collaboration with husbandry in that area. We investigated the compost quality produced with various mixing ratio of fresh bamboo chips as an auxiliary material to cow dung. As results, highest temperature of the mixture of dung and bamboo chip was about 70°C during the first stage of fermentation. However, aerating operation following the first fermentation resulted lowering temperature during secondary fermentation or later. Lower temperature following the first fermentation suggested that composting processes seemed to end incompletely. Produced compost was served for cultivation experiments with Japanese mustard spinach. These cultivation experiments showed that compost produced with higher proportion of bamboo chip led greater biomass of plants, implying the compost with bamboo chip might enhance the growth rate. Our results revealed the bamboo chip has certain potential to replace the rice straws or husks when the chips were used as an auxiliary material to produce the cow dung compost.

Keywords: Abandoned bamboo forest, Bamboo culm chip, Composting, Cow dung,

はじめに

タケ類は古くから工芸品や建材などの材料やタケノコを食用として利用されてきた。林野庁 (2024) によれば日本の竹林面積は 2022 年時点で約 17 万 5000 ha であり、九州地方と中国地方の竹林面積が大きい。島根県においても竹林面積は増加している (山中・笠松 2007)。各地で増加している竹林を構成するタケはイネ科マダケ属に属するマダケ *Phyllostachys reticulata* (Rupr.) K.Koch, ハチク *P. nigra* (Lodd. ex Loud.) Munro var. *henonis* (Mitford) Stapf ex Rendle, モウソウチク *P. edulis* (Carrière) Houz. などが知られている。それらのうちモウソウチクは1700年代に中国から移入され、カゴなどの日用品の原材料やタケノコ栽培のために利用されてきた。しかし、1970 年代にはいと安価な輸入タケノコやプラスチック製品の普及などによって竹林は利用されなくなった (柴田 2003, 鳥居 2003)。管理放棄された竹林は放置竹林と呼ばれ、社会学的、生物学的に様々な問題を引き起こしている。放置竹林の増加は生物多様性の減少 (阿久津ら 2012) や森林の公益的機能の発揮に支障を生じる可能性 (石賀ら 2001, 日浦ら 2004) が指摘されている。

近年、放置竹林の整備・伐採が行なわれており、伐採後の竹資源の有効利用法として、竹チップや竹炭などの農業分野への利用が検討されるようになった。例えば、竹炭の土壌改良資材としての利用 (南雲ら 2014)、竹チップのマルチング資材としての利用 (菊川 2016)、竹粉や竹炭から製造した水稻苗箱培土の開発 (矢内ら 2016) など数多くの報告がされている。竹チップを堆肥の副資材として利用した例としては、坂井ら (2005)、竹下・小山 (2014) や中村ら (2016) があり、竹チップが堆肥副資材として十分に使用できることを指摘した。環境保全的利用方法としては、竹炭を含むバイオ炭を農地へ施用することによって炭素を農地土壌に貯留させることにより、大気中の CO₂ 濃度の低減につなげることが期待されている。竹炭は炭素隔離だけでなく、土壌への施用により、作物の収量を増加させること (磯部ら 1996)、保水性や保肥性を増加させること (亀山ら 2016) などが報告されている。

本研究では、副資材としての竹チップの混和率が異なる複数種類の牛糞堆肥を作製し、堆肥の副資材としてタケを用いる場合の最適混和率を検討した。作製した堆肥

は、その化学性を調べ、植物種子発芽阻害試験を実施するとともに、コマツナ *Brassica rapa L. var. perviridis L.H.Bailey* を用いた栽培試験を行うことで副資材の混和率の異なる堆肥の肥効を評価した。

材料と方法

1) 供試試料

牛糞は新鮮な乳牛糞を脱水し含水率を 65% に調整したものを使用した。竹チップおよび竹炭は、島根県飯石郡飯南町の放置竹林において伐採した 2~3 年生および 5 年生のモウソウチク稈を使用した。竹チップはチップパーを用いて破碎を行った。竹炭は炭焼き施設で加工を行った。竹チップと竹炭の大きさは 5 mm~3 cm になるように破碎した。

2) 堆肥の作製

堆肥は牛糞と竹チップ、竹炭、モミガラのそれぞれの混和率を変えて 8 実験区を作製した。牛糞と副資材の混和率は重量比で行ない、各実験区の合計重量は 100 kg とした。牛糞と稈齢 2~3 年の竹チップはそれぞれ 9:1, 8:2, 7:3, 6:4 (以下, 9:1 区, 8:2 区, 若 7:3 区, 6:4 区), 稈齢 5 年の竹チップは 7:3 (以下, 老 7:3 区) とした。牛糞と竹炭の混和率は 9.5:0.5 (以下, 竹炭区) とした。対照区として牛糞のみの試験区を設定した (以下, 10:0 区)。また、比較対象として副資材としてモミガラを使用したモミガラ堆肥の試験区も設置した (以下, モミガラ区)。モミガラ堆肥は一般に販売されているものを使用した。

混和は 2022 年 9 月 26 日に行い、風雨の影響を受けない屋根の下で 46 日間の堆肥化を行った。乳牛糞は含水率が 65% になるように調整し、副資材は水分の調整を行わず竹チップは 40%, 竹炭は 7% の水分を含んでいた。牛糞と副資材が均一になるようにトロ舟の中で混和した後、コンクリート床に積み上げた。堆肥作製期間中、おんどり (TR-71wb, ティアンドディ社, 松本, 日本) とステンレス保護管センサー (TR-1220, ティアンドディ社, 松本, 日本) を使用した。積み上げた堆肥の中腹から中心部にむけてセンサーを挿入し、温度を 1 時間間隔で記録した。切り返しは 9 月 26 日の混和以降, 10 日目, 23 日目, 37 日目に行った。堆肥作製開始時, 終了時および切り返し時に、理化学性分析および発芽阻害試験のための試料を上部, 中部, 下部の 3 ヶ所から 100 g ずつ採取した。

3) 堆肥の理化学性分析

堆肥作成の主資材である牛糞, 副資材である竹チップと竹炭の含水率および pH(H₂O), リン, カリウム, 全窒素, 全炭素を測定した。含水率は採取した試料を 105℃ で 48 時間乾燥させ、乾燥前生重量と乾燥後重量から算出した重量含水率を求めた (1 式)。pH(H₂O) はガラス電極法を用いた pH メータ (HORIBA D-21LAB, 京都, 日本) を使用して測定した。リンおよびカリウムの測定は, 8 実験区で作成した堆肥をそれぞれ 65℃ で 48 時間乾燥後, 電動ミルで粉碎した試料 50 mg に硝酸 3 mL を加えて湿式灰化した。灰化した試料を超純水で希釈し, ICP-MS 8800 Triple Quad (Agilent Technologies 社, Hanover, Germany) を用いて測定した。全窒素と全炭素濃度は NC アナライザー (SUMIGURAPH NC-22F, 住化分析センター, 大阪, 日本) を用いて乾式燃焼法で測定し, そこから C/N 比を算出した。

$$\text{含水率}[\%] = \frac{\text{生重}[\text{g}] - \text{乾重}[\text{g}]}{\text{生重}[\text{g}]} \times 100 \quad \cdots 1 \text{ 式}$$

4) 発芽阻害試験

混和率 8 実験区の堆肥化 0 日目, 10 日目, 23 日目, 37 日目そして 46 日目の試料を大学に持ち帰り実験に供した。乾燥堆肥 5 g に熱水 50 mL を加えて振とうしたのち, ろ紙 (Advantec No.6, 東洋濾紙, 東京, 日本) によってろ過し熱抽出液を得た。発芽阻害試験にはコマツナ種子を用いた。シャーレ中に発芽試験シート (たねピタ!, 富士平工業, 東京, 日本) を敷き, コマツナの種子を 50 粒ずつ播種し, 熱抽出液 10 mL を添加した。インキュベーターを 30℃ に設定し, 暗黒条件下で培養を行った。10 mL の蒸留水を添加した対照区の発芽が十分に確認できた時点で発芽種子数を記録した。

5) 堆肥肥効評価

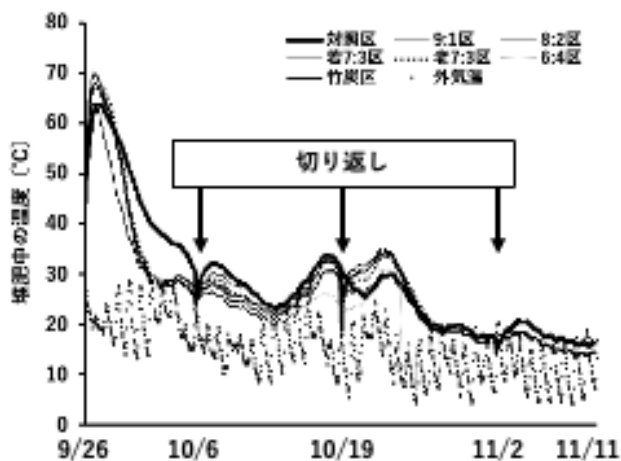
栽培試験には 1/10,000 アールのワグネルポットを使用し, 培土には市販の栽培用培土 (チッソ 270 mg L⁻¹, リン酸 400 mg L⁻¹, カリウム 270 mg L⁻¹) を用い, 堆肥化 46 日目のそれぞれの堆肥を 7.57 g (75.7 kg a⁻¹) 供試した。各ポットに市販のコマツナ種子 (夏楽天, タキイ交配) を 9 粒播種した。栽培は島根大学生物資源科学部 3 号館屋上で行い, ポット上部を遮光率 22% の白色寒冷紗で覆い, 灌水は土壌表面が乾燥した場合に適宜行った。2024 年 7 月 5 日に播種し, 3 週間栽培後, 収穫した。堆肥実験区ごとに 2 ポットで栽培した。収穫後, 全個体の最大葉長, 生重量を測定した。また, 通風乾燥機を用い 65℃ で 48 時間乾燥させ, 合計乾重量を測定した。各個体の乾重量に関して, 乾燥の際, 一部個体が破

損したため、各ポットの含水率をそれぞれの生重量に掛け合わせることで各個体の乾重量を求めた。統計解析をする際、2ポット合計で最大18株が得られこれらの株ごとの葉長と乾重量を用いた。Tukeyの $IQR \times 1.5$ 基準での外れ値を示した個体は解析から除いた。

結 果

1) 堆肥化

堆肥化に伴う発酵温度の推移を図1に示す。いずれの試験区でも混和から24時間内に発酵温度は 60°C まで上昇した。すべての試験区において混和後、24時間前後で最高温度に到達した。各試験区の最高温度は 63.7°C (10:0区)～ 70.2°C (6:4区)であった。最高温度に達したのち、徐々に発酵温度は低下し、10日目および23日目の切り返し後は 30°C 前後まで再び上昇したが、31日目以降の発酵温度は外気温の最高温度である 20°C とほぼ同等の値で推移した。



線で示した。堆肥の切り返しは2022年10月6日、10月19日、11月2日の3回行った。6:4区は10月24日から11月2日の切り返し時までセンサーが露出していたため外気温を測定していた。

2) 堆肥の理化学性

含水率は全実験区において、混和後の日数経過に伴って徐々に低下した (表1)。混和0日目の含水率は各試験区において $54.8 \sim 64.2\%$ で、最大10%程度の違いが見られた。46日目には $35.8 \sim 55.3\%$ となり、試験区によって含水率のばらつきが生じた。10:0区と比べて、竹チップを混和した試験区では、含水率が低くなった。

46日間の堆肥化後の堆肥の化学性を表2に示した。すべての実験区において $\text{pH}(\text{H}_2\text{O})$ はアルカリ性を示した。

C/N比は竹チップの混和率が高くなるにつれNの含有率の低下を反映し大きくなった。PとKも竹チップの混和率の増加にともない減少傾向にあるが、減少の程度はC/N比ほど顕著ではなかった。

表1 堆肥化に伴う含水率の推移 (%)

実験区	堆肥化日数				
	0日	10日	23日	37日	46日
10:0	64.2	59.8	59.1	56.2	55.3
9:1	61.8	56.1	51.8	48.8	46.5
8:2	59.3	54.1	52.3	48.1	44.6
若7:3	57.6	50.5	48.4	43.9	44.2
老7:3	57.2	52.6	46.7	43.5	40.3
6:4	54.8	48.7	45.1	40.5	35.8
炭9.5:0.5	60.7	56.2	53.8	47.8	44.3

注: 含水率は重量含水率とし、生重にしめる水分の重量百分率を1式により求めた。

表2 堆肥化後の堆肥の化学性

実験区	$\text{pH}(\text{H}_2\text{O})$	N%	C%	C/N比	P%	K%
10:0	8.4	2.2	41.1	18.4	0.6	1.9
9:1	8.4	1.8	42.2	24.0	0.6	1.6
8:2	8.4	1.6	43.2	27.0	0.5	1.5
若7:3	8.3	1.4	42.7	31.3	0.4	1.2
老7:3	8.5	1.1	40.9	35.8	0.5	1.4
6:4	8.3	1.0	44.1	43.8	0.4	1.3
炭9.5:0.5	8.4	1.5	40.2	26.8	0.4	1.5

表3 堆肥化日数の異なる堆肥の熱水抽出液浸漬によるコマツナ種子発芽率の変化

実験区	堆肥化日数				
	0日	10日	23日	37日	46日
10:0	89 ± 5	94 ± 4	91 ± 10	89 ± 3	93 ± 2
9:1	75 ± 17	93 ± 5	95 ± 2	90 ± 4	94 ± 4
8:2	74 ± 11	93 ± 2	94 ± 9	94 ± 5	77 ± 19
若7:3	89 ± 3	91 ± 5	92 ± 5	91 ± 7	91 ± 3
老7:3	73 ± 9	91 ± 1	86 ± 12	93 ± 3	86 ± 6
6:4	85 ± 6	93 ± 4	97 ± 1	91 ± 6	81 ± 1
炭9.5:0.5	90 ± 5	97 ± 3	97 ± 1	93 ± 3	87 ± 3

注) 表中の数値は3反復の平均値±標準偏差SDを示す。

3) 発芽阻害試験

発芽阻害試験の発芽率の変化を表3に示した。牛糞と副資材の混和0日目の堆肥は、9:1区や8:2区、老7:3

区において発芽率が低かった。混和 10 日目以降のすべての実験区において発芽率が 90% 前後まで上昇したが、混和 46 日目の堆肥では一部の試験区で 80% 程度まで低下した。

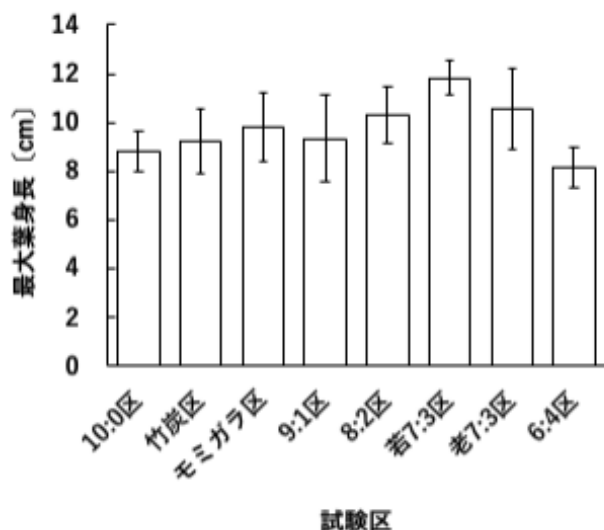


図2 各実験区で作製された堆肥を施用されたポットで栽培されたコマツナの最大葉長。図中のエラーバーは標準偏差SDを示す。サンプル数は10:0区から6:4区の順で16, 14, 17, 15, 12, 11, 15, 17である。

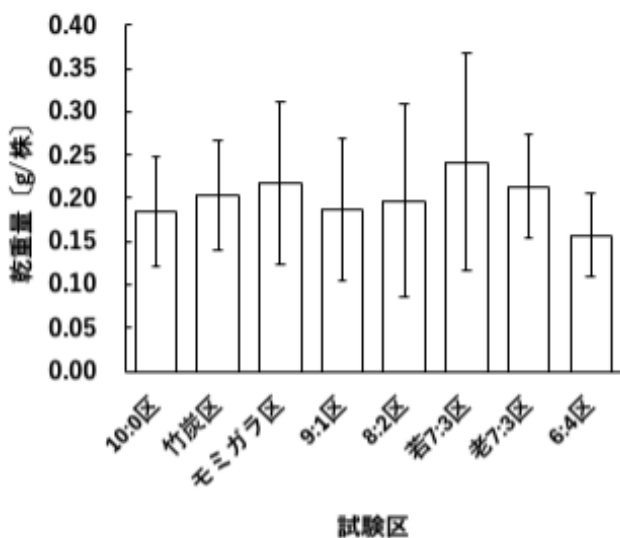


図3 各実験区で作製された堆肥を施用されたポットで栽培されたコマツナの乾重量。図中のエラーバーは標準偏差SDを示す。サンプル数は10:0区から6:4区の順で17, 14, 18, 15, 15, 14, 15, 18である。

4) コマツナ栽培試験

コマツナの栽培試験における最大葉長、乾重量の結果を図2、図3に示した。一元配置の分散分析の結果、最大葉長は有意に異なる実験区があることを示し

($p < 0.05$)、乾重量は実験区間で有意な差は認められなかった($p > 0.05$)。最大葉長は、最大で若7:3区 11.8 ± 0.7 cm、最小で6:4区 8.2 ± 0.8 cm、堆肥のみの10:0区で 8.8 ± 0.8 cm となった。竹チップの混和割合 0% から 30% までは混和割合に比例して最大葉長も大きくなった。しかし、7:3 区の老竹と若竹の比較によれば老竹区は若竹区よりも有意に最大葉長は小さくなった ($p < 0.05$, t-検定)。6:4 区の平均値は竹チップを含まない10:0区よりも小さな値を示した。

各試験区の乾重量は、最大葉長と同様に若7:3区が最大、6:4区が最小となった。6:4区以外の実験区では、10:0区よりも大きな値を示した。

考 察

いずれの実験区でも混和から24時間内に発酵温度は60～70℃まで上昇し一次発酵が生じたと考えられる。混和23日目前後の35℃程度までの温度上昇は二次発酵であると考えられる。一次発酵は最高温度が60℃以上で明確であったが、二次発酵は最高温度が35℃程度にとどまり不明瞭であった。これは一実験区当たりの作製量が100 kgと少なく、発酵による発熱量に対して外気への放熱量が比較的大きかったためであると考えられる。一次発酵では急激に温度が上昇したため、発熱量に対して放熱量の割合が比較的小なく温度が上昇したが、二次発酵では温度上昇が緩やかであったことから、発熱量に対して放熱量の割合が大きく、あまり温度が上昇しなかったと考えられた。また、3回目の切り返し後に若干の温度上昇が見られたが、同様の理由および含水率の低下(表1)によって十分に温度が上昇しなかったと考えられた。各実験区において最大温度まで上昇したのち、1回目の切り返しまで温度は低下したが、10:0区は他の試験区と比べ緩やかに温度が低下した。これは副資材が混和されていないことで、牛糞の中に孔隙ができず、外気に触れる面積が少なかったことによって温度の降下が抑制されたと考えられた。竹チップ自体には堆肥化過程での温度上昇効果があることが報告されており(坂井ら2005, 中村ら2016)、竹チップの混和により発酵温度が低くなったとは考えにくい。ただし、6:4区において28日目に発酵温度が急激に低下したのは、野生動物によって堆肥が掘り返され温度センサーが露出したためである。そのため、温度センサーを再設置した34日目までは外気温と同様の温度が記録されている。

宮竹ら(2007)は、堆肥化において資材の含水率が60%で反応速度および微生物増殖が最大を示すことを報告

している。本研究では全実験区において混和後の日数経過とともに含水率は徐々に低下し、46日目には35.8～55.3%になった（表1）。各実験区における含水率の順位は0日目と46日目ではほぼ変わらず10:0区が一番高く、竹チップの混和率が大きくなるにつれて含水率は低くなった。これは副資材の牛糞にくらべ竹チップの含水率が低かったためであると考えられる。資材に十分な水分が残っていた混和後24時間以内に発酵温度が最大値を示したと考えられる。本研究で用いた主資材としての牛糞は水分調整により含水率は約65%、チップの含水率はさらに低く40%程度であったことから、混和により全体の含水率の低下が生じ、二次発酵以降の発酵が十分に進まなかったと考えられる。堆肥化の過程で含水率が10～15ポイント低下することから、混和時には牛糞で70%程度の含水率を確保することと、竹稈を伐採後すぐに破碎し含水率60%程度のものを牛糞に混和することで、堆肥化過程で必要な水分を維持する必要があると考えられる。さらに堆肥の乾燥具合を確認しながら繰り返し時に水分を補充することも有効だと考えられる。

土壌に竹炭を混和するとその表面細孔などによって微細な間隙が増加することが知られている（茂呂 2022）。そのため、10:0区以外の試験区では、牛糞に副資材が混和されることによって孔隙が生まれ、表面積が増加し、蒸発が行なわれやすくなったと考えられる。一方、10:0区では孔隙が少なかったと考えられ、含水率の低下が抑えられたと考えられた。そのため、副資材の大きさを変えるなどの調整が必要であると考えられる。

堆肥の腐熟度を検討する発芽阻害実験の結果、混和0日目では、9:1区や8:2区、老7:3区において発芽率が低かったが、それ以降はすべての試験区において発芽率が90%前後まで上昇した（表3）。しかし、46日目では一部の試験区で80%程度まで低下した。また、図1に示したように一次発酵以降の発酵が十分な温度に達していないため、十分な発酵が行なわれなかった可能性が考えられたがコマツナ種子の発芽率を大きく低下させるほどではなく、6週間あまりの堆肥化の結果、発芽を阻害する有害物質は多くは残されていないことが示唆された。竹下・小山（2014）は竹粉砕物はオガクズに比べ易分解性有機物の比率が高く5週間で完熟するとし、本研究の堆肥化期間6週間は適当な時間であったと考えられる。

堆肥化実験終了時の堆肥は、表2に示すようにPやKの含有率に大きな違いはみられなかった。一方、Nについては竹チップの混和率の大きな実験区で含有量低下が生じ、C/N比の上昇も認められた。中村ら（2016）は竹粉

の混和率の小さな実験区におけるC/N比の低下を報告し、チップと粉の違いはあるが、本研究の結果を支持するものである。堆肥化46日後の堆肥を用いたコマツナの栽培試験の結果、6:4区を除く竹チップを混和した試験区では、竹チップの割合が増加すると最大葉長と乾重量は増加する傾向が見られた。6:4区では10:0区よりも最大葉長と乾重量は低くなった。また多く利用されるモミガラを副資材に作製された堆肥を施肥した場合に比べ、最大葉長と乾物重は竹チップを副資材とした堆肥を施肥した実験区において大きくなる傾向にあった。本研究とは異なり、竹下・小山（2014）は葉菜類への施用では十分な効果がえられないとした。本研究では、竹チップの混和率によらずPとKの含有量に大きな違いがなく、竹チップの混和率の上昇にともないNの含有率は低下（C/N比は上昇）することから、竹チップ堆肥の肥効は主要肥料成分であるN、P、Kの付加によるものでない別の要因によるものである可能性が示唆された。本研究では稈齢を2～3年の比較的若い稈と稈齢5年以上の比較的古い稈を分けて実験に供した。無機肥料成分とは異なる若い稈に含まれるコマツナの生育を促進する何かが存在すると考えられる。

まとめ

竹チップおよび竹炭を副資材として堆肥の作製を行った結果、一次発酵に伴う温度の上昇は認められた。一方で、その後の堆肥化にともなう温度上昇は外気温より若干高い値を示すにすぎなかった。そのため、本研究の堆肥作製においては腐熟が十分に進んでいないことが考えられた。また、含水率の低い竹チップや竹炭を副資材として使用する場合、堆肥全体の含水率の低下が比較的早く起こる可能性が考えられる。したがって、竹チップ等を副資材として使用するには含水率の調整を行う必要があると考えられた。

竹チップを副資材として作製した堆肥を使用したコマツナの栽培試験では、竹チップの混和率が高いほど最大葉長と乾重量が増加した。しかし、6:4区では10:0区よりも最大葉長、乾重量ともに小さい値を示した。したがって、竹の混和割合が高いほど作物の生育は良好であるが、一定割合を超えると作物の生育を阻害する、もしくは46日の堆肥化期間では腐熟が不十分である可能性が示唆された。本試験では二次発酵温度が十分に上昇しなかった堆肥を使用したため、C/N比も高く堆肥施用の効果が十分に発揮できなかったことが考えられる。今後は堆肥化期間中の含水率を60%以上に維持し、さらには堆肥

化期間を長くした堆肥を作製し、竹チップの堆肥の副資材としての可能性についてさらに検討を行う必要がある。また、適切な竹チップ混和堆肥の施用量を把握するために、堆肥の施用量に関する試験および無機成分以外の要素の探索を行う必要がある。

謝 辞

本研究を実施するにあたり、堀江由起夫氏、加藤誠爾氏をはじめとする株式会社いいの皆様、島根大学森林生態環境学研究室、神戸学院大学現代社会学部菊川ゼミの学生各氏には多大なご協力を頂きました。ここに記して感謝の意を表します。

引用文献

阿久津 瞳・逢沢峰昭・松英恵吾・大久保達弘 (2012) 栃木県那須烏山市におけるモウソウチク林の分布と周辺群落への侵入. 宇都宮大学農学部演習林報告, 48: 139-151.

日浦啓全・有川 崇・ドウラ ドゥルガ バハドゥール (2004) 都市周辺山麓部の放置竹林の拡大にともなう土砂災害危険性. 日本地すべり学会誌, 41 (4): 323-334.

石賀裕明・道前香緒里・小寺洋導・拝藤幸太 (2001) 竹林進入による土壌組成の変化と環境問題. 島根大学地球資源環境学研究報告, 20: 83-86.

磯部勝孝・藤井秀昭・坪木良雄 (1996) 木炭の施用がサツマイモの収量に及ぼす影響. 日本作物学会紀事, 3: 453-459.

亀山幸司・岩田幸良・佐々木康一・成岡道男・宮本輝仁 (2016) 樹皮由来バイオ炭の砂丘地圃場への施用による土壌の保水性・保肥性改善効果. 農業農村工学会論文集, 301: I_65-I_74.

菊川裕幸 (2016) 竹チップのマルチングがダイズ品種 (丹波黒大豆) の栽培と雑草防除に及ぼす影響. 人と自然, 27: 103-108.

宮竹史仁・岩渕和則・阿部佳之・本田善文 (2007) 高い材料水分が堆肥温度および微生物活性に及ぼす影響. 農業機械学会誌, 69(2): 48-54.

茂呂和輝・伊藤直也・古澤 蘭・伊藤睦実・中島一豪・原田芳樹 (2022) 土壌改良資材としての竹炭の冷却効果. 日本緑化工学会誌, 47(4): 495-504.

南雲俊之・安藤真奈実・森 智郁 (2014) 竹炭の成分組成から見た土壌改良資材としての特徴. 日本土壌肥料学雑誌, 85(1): 37-42.

中村和久・瀧澤秀明・柳澤淳二 (2016) 堆肥化副資材としての竹粉の特性. 愛知農総試研報, 48: 153-156.

林 野 庁 (2024) 森林・林業統計要覧2024 https://www.rinya.maff.go.jp/j/kikaku/toukei/youran_mokuzi2024.html (2025 年 1 月 16 日閲覧)

坂井隆宏・脇屋裕一郎・式町秀明 (2005) キノコ廃菌床および竹チップを副資材として利用した乳牛ふんの堆肥化. 西日本畜産学会報, 48: 57-63.

柴田昌三 (2003) モウソウチクと日本人. 日本緑化工学会誌, 28(3): 406-411.

竹下美保子・小山 太 (2014) 乳牛ふん堆肥化における副資材としての竹粉碎物の利用. 福岡県農業総合試験場研究報告, 33: 34-38.

鳥居厚志 (2003) 周辺二次林に侵入拡大する存在としての竹林. 日本緑化工学会誌, 28(3): 412-416.

山中啓介・笠松治樹 (2007) 島根県における竹林拡大の実態とその要因. 島根県中山間地域研究センター研究報告, 3: 27-32.

矢内純太・中尾 淳・大迫敬義・宮藤久士・古田裕三・佐野新悟 (2016) 竹林間伐材を利用した竹粉および竹炭の水稻苗箱培土としての有効性. 日本土壌肥料学雑誌, 87(4): 241-246.

島根大学生物資源科学部研究報告（令和7年度版）

（学術情報委員会）

投稿規定

- （１）島根大学生物資源科学部研究報告は、原則として年1回発行する。
- （２）本研究報告には、島根大学生物資源科学部の教職員、院生、学生、外国人研究者、ならびに学術情報委員会において認めたものが投稿することができる。
- （３）本研究報告に掲載する内容は、原著論文、総説および解説などとする。
- （４）原著論文、総説、解説の執筆要領は、別に定める。
- （５）投稿予定者は、あらかじめ投稿申込書を提出し、所定の期限内に投稿原稿をFormsにて提出する。
- （６）本研究報告の投稿者は、投稿前に共著者全員から以下の内容について同意を得た上で、その同意を証する所定の様式による同意書を、投稿原稿とともに提出すること。
 - ① 共著者として本研究報告に投稿することへの同意
 - ② 採択された場合に、掲載内容が以下の媒体に公開・利用されることへの同意：
 - ・ 生物資源科学部のホームページ
 - ・ 島根大学附属図書館のオンラインリポジトリシステム
 - ・ EBSCO Publishing社が提供するEBSCOhostデータベース
 - ・ 科学技術振興機構（JST）のデータベース
- （７）使用言語は、日本語または英語とする。
- （８）原著論文、総説、解説の長さについては、特に字数制限は設けないが、内容の妥当性および簡潔性に配慮すること。
- （９）投稿原稿の掲載の可否は、学術情報委員会が審査のうえ決定する。
- （１０）本研究報告の記載事項の著作権は、島根大学生物資源科学部に帰属する。
- （１１）本研究報告において認められた利用に関しては、著作者が許諾者である場合は著作者人格権を行使しないものとし、許諾者が著作者でない場合は、著作者に著作者人格権を行使させないものとする。
- （１２）本研究報告の公開方法は、PDF化したものを以下の媒体に掲載することにより行い、学術情報委員会が決定する。
 - ・ 生物資源科学部のホームページ
 - ・ 島根大学附属図書館のオンラインリポジトリシステム
 - ・ EBSCO Publishing社が提供するEBSCOhostデータベース

執筆要領

- （１）原稿はパーソナルコンピュータと汎用されている文書作成ソフトウェア（MS-WORDなど）を用いて作成し、添付ファイル等と出力原稿を提出する。
- （２）図および表の掲載は、論文に必要欠くべからざるものだけに留め、効果的に挿入する。
- （３）図および表は、本文に組み込み、「図（Fig.）1」、「表（Table）1」のようにそれぞれ通し番号を付ける。
- （４）図の題及び説明文は、下部に書く。表の題及び説明文は、上部に書く。図および表の題、説明文、図表中の文字は英文にしてもよい。
- （５）図および表の大きさは、原則として横17cm、または8cm、縦は24cm以内である。

- (6) 1ページは横書き1行25字, 44行の2段組(約2,200字)を基本とする。タイトル、著者名、要旨は段組をしない。上下は2,2cm、左右は1,7cm のマージンとする。島根大学生物資源科学部研究報告No26の論文の体裁に合わせて著者が最終原稿を作成する。句読点は“.”, “”, “”を用いる。
- (7) 和文で提出する場合は, 日本語の表題と著者名, 英語の表題と著者名, 英語の抄録(Abstract)に続き, 緒言(=前書き, はじめに, 序), 材料と方法(=実験方法、実験), 結果, 考察(=結果と考察), 総合論議(=まとめ, 結論), 謝辞, 引用文献, 日本語抄録(省略可)の順に記述することを基本とする。
- (8) 英文で提出する場合は, Title, Author(s), Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Conclusion, Acknowledgement(s), References, 日本語抄録の順に記述することを基本とする。
- (9) 表題ページには以下の項目について記載すること。表題, ランニングタイトル(簡略化した論文表題, 和文20字以内, 英文50字以内), 著者不在中の校正代行者名, 図表の枚数, 連絡事項。
- (10) Abstractは250語程度とし, Abstractの最後の行にKeywords(5語程度, アルファベット順)をつける。
- (11) 和文, 英文を問わず, 動植物の属以下の学名はイタリック体とする。
- (12) 文献は著者のアルファベット順に並べる。雑誌の号数は括弧で囲んで表示する。ただし、巻が通しページである場合は号数を省略する。
- (13) 引用文献は著者名のアルファベット順に, 例えば下記のように, 記載する。

(雑誌)

Aerts, R. and Chapin, F. S. III. (2000) The mineral nutrition of wild plants revisited: a reevaluation of processes and patterns. *Advanced Ecological Research*, **30**: 1–67.

西山嘉寛・吉岡正見(1996) 山火事跡地の復旧に関する調査—被災1年目の玉野試験区の実況—。岡山県林業試験場研究報告, 13: 54–92.

Tilman, D., Knops, J., Wedin, D., Reich, P., Ritchie, M. and Siemann, E. (1997) The influence of functional diversity and composition on ecosystem processes. *Science*, **277**: 1300–1302.

上田明良・小林正秀・野崎愛(2001) カシノナガキクイムシの寄主からの臭いに対する反応の予備調査。森林応用研究, 10(2): 111–116.

(書籍)

Bormann, F. H. and Likens, G. E. (1979) *Pattern and process in a forested ecosystem*. 253pp. Springer-Verlag, New York.

依田恭二(1971) 森林の生態学. 331pp. 築地書館, 東京.

本文中では「——が報告されている(上田ら 2001).」「西山・吉岡(1996)は山火事跡地の——」「——に生物多様性が影響する(Tilman *et al.* 1997).」「Aerts and Chapin (2000)は樹木の養分利用効率を——」のように引用する。

編集委員会

委員長	清水	英寿
委員	西村	浩二
	秋廣	高志
	中務	明
	米	康充
	長門	豪
	石井	将幸
	吉田	真明
	谷野	章

Editorial Board

Chief Editor	SHIMIZU Hidehisa
Associate Editors	NISHIMURA Kohji
	AKIHIRO Takashi
	NAKATSUKA Akira
	YONE Yasumichi
	NAGATO Gou
	ISHII Masayuki
	YOSHIDA Masa-aki
	YANO Akira

令和 8 年 1 月 31 日発行

発 行 者 国立大学法人島根大学生物資源科学部

〒690-8504 島根県松江市西川津町 1060

発行責任者 上 野 誠
(生物資源科学部長)