

阿蘇世界文化遺産登録推進 「若手研究」成果論文集

第2号

2025年

野草地における放牧が土壌炭素貯留量およびその安定性に与える影響	阿部 しえり	1
阿蘇外輪山東部における放牧管理が土壌炭素蓄積に与える影響	齋藤 温子	14
阿蘇地域の半自然草原における管理形態の変化による植生動態 ～放牧再開から放牧および野焼き停止後～	高岸 慧	33
淡色化が熊本系褐毛和種の肉質に及ぼす効果に関する研究.....	山下 泰斗	45

野草地における放牧が土壌炭素貯留量およびその安定性に与える影響

阿部 しえり

はじめに

熊本県阿蘇地域の阿蘇カルデラ周辺域には、火山灰を母材とし炭素を多く含む黒ボク土が分布しており、約 22,000 ha に及ぶ広大な面積の半自然草原が広がっている。阿蘇地域の草原は野焼きや放牧、採草などの人為的な管理により維持され、美しい景観を形成するとともに、地域住民の暮らしや農畜産業に利用されてきた。また先行研究では、阿蘇の野草地が重要な炭素吸収源として機能していることが報告されており [1]、土壌への炭素貯留による地球温暖化抑制の観点からも注目されている。しかしながら近年では、農業従事者の減少や高齢化により野焼きや輪地切りといった作業の継続が困難になりつつあり、野草地の面積は減少している。

阿蘇の草原では「あか牛」の放牧が広く行われており、近年は肉用牛としてのブランド化が進んでいる。また、放牧を行うことで防火帯を作る「モーモー輪地切り」は有効な輪地切り省力化技術として期待されており [2]、放牧は草原の維持管理にも大きく貢献できる管理法といえる。一般に牛などの反芻家畜の腸内発酵や糞尿はメタン等の温室効果ガスの排出源であるとされているが、土壌炭素固定機能の高い阿蘇の草原での飼養は排せつ物の炭素が土壌に蓄積することで正味の温室効果ガス排出量を削減できる可能性がある。放牧地では、家畜の摂食による植生の変化、踏圧による土壌物理性の変化、糞尿による土壌化学性の変化が起こると考えられ、面積当たりの放牧頭数（放牧強度）といった管理法の違いは土壌炭素の安定性に大きく影響する可能性がある。したがって、高い炭素固定機能を維持しつつ草原の持続的な利用を行うには適切な管理法を確立することが求められるが、野草地における放牧強度の違いが土壌炭素固定機能に与える影響について評価した研究はない。

以上より、本研究では野草地において放牧強度と土壌炭素貯留量との関係性を明らかにする。また、土壌有機物は分解の過程で安定な形態である腐植に変化し土壌に蓄積する。本研究では放牧強度の違いが腐植物質の量や画分に与える影響についても評価する。以上の研究を通じて阿蘇地域における持続的な草地管理を提案することを目的とする。

第1章 材料と方法

調査地点 ～池の窪牧野・上田第一牧野～

本調査は、令和6年(2024)8～9月に阿蘇山中央火口丘南西部に位置する池の窪牧野および南小国町と小国町にまたがる上田第一牧野(図1)で実施した。池の窪牧野では第二牧野および第二牧野に隣接する野草地を対象とした(図2)。第二牧野はシバが優占する放牧地であり、総面積は114 haである。冬の期間を除き肉牛が放牧され、令和6年(2024)の放牧頭数は115頭、放牧強度は 1.01 頭 ha^{-1} であった。野草地はススキが優占しており、以前は採草地として利用されていたが、現在は放棄地となっている。放牧地・野草地ともに平成28年(2016)までは野焼きを行っていたため、現時点で木本植物などの侵入は見られなかった。

上田第一牧野は、牧野全体が放牧地として利用されており、総面積は204 haである。本牧野では、植生や土性の違いから放牧強度が異なると考えられる2地点を選定し調査を行った。ネザサやシバが優占する放牧強度が比較的強い地点(以下、重放牧地点)とススキが優占する放牧強度が比較的弱い地点(以下、軽放牧地点)を選定した(図3)。例年は5～12月に放牧を行っていたが、令和6年(2024)から周年放牧を行っている。令和6年(2024)の放牧頭数は80頭、放牧強度は 0.39 頭 ha^{-1} であった。毎年3月上旬に野焼きを実施している。

土壌サンプリング

各地点で深さ1 mほどの穴を掘り、土壌断面を観察した。土色・土性により層位を決定し、これを代表断面とした。仮比重・土壌三相測定用試料はステンレス試料円筒(DIK-1801、大起理化学工業株式会社)を用いて各層3反復ずつ採取した。土壌特性分析用試料は各層位からスコップで土壌を採取した。また、代表断面を含む周囲3地点を選定し、池の窪牧野では深さ30 cmまで、上田第一牧野では深さ15 cmまでの土壌をステンレス試料円筒により5



図1 調査地点の位置

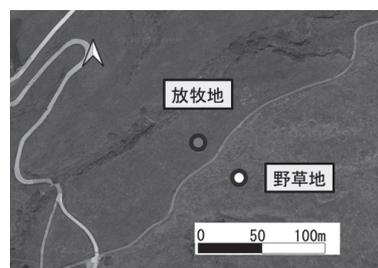


図2 池の窪牧野のサンプリング地点

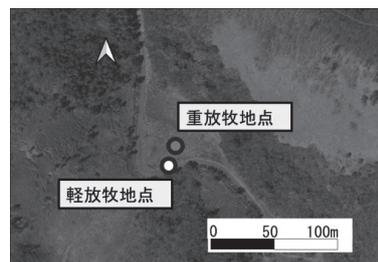


図3 上田第一牧野のサンプリング地点

cm 毎に 3 反復ずつ採取した（表層試料）。上田第一牧野では石礫が多く含まれていたために 15 cm より深い深度の土壌はステンレス試料円筒で採取できなかった。

分析方法

仮比重・土壌三相測定用試料は、実容積計（DIK-1150、大起理化工業）を用いて実容積を測定した後、変水位透水係数測定法（土壌環境分析法編集委員会、博友社 1997）で飽和透水係数を測定し、105°Cの乾燥機で 48 時間以上乾燥させ重量を測定した。

代表断面の土壌特性は、pH (H₂O)、水抽出性有機態炭素 (WEOC)、全炭素含有量、全窒素含有量、選択性溶解アルミニウム (Al)、鉄 (Fe)、ケイ素 (Si) を測定した。土壌 pH は土壌：脱塩水 = 1 : 2.5 の割合で 1 時間混合し、pH メーター (F-53;F-72、HORIBA) で測定した。WEOC は土壌：脱塩水 = 1 : 5 の割で 1 時間混合し、土壌懸濁液を乾燥ろ紙 (No.5C φ 125、ADVANTEC) 及び 0.45 μm のメンブレンフィルター (ADVANTEC) でろ過して得たろ液について全有機態炭素計 (TOC-L CSN、島津製作所) を用いて WEOC 濃度を測定した。全炭素含有量、全窒素含有量は、風乾土からできるだけ植物体を取り除き、高速振動試料粉碎機 (TI-100、CMT) を用いて微粉碎し、全自動元素分析装置 (Vario EL cube、Elementar) を用いて測定した。選択性溶解 Al、Fe、Si 量は、酸性シュウ酸塩溶液、ピロリン酸塩溶液で抽出し測定した（土壌環境分析法、博友社 1997）。酸性シュウ酸塩抽出はアロフェンやイモゴライト（結晶性の低いアルミニウムケイ酸塩）由来の Al (Al_o) や Fe (Fe_o)、Si (Si_o) を抽出できる。ピロリン酸塩抽出では腐植複合体中の Al (Al_p) と Fe (Fe_p) が抽出できる。抽出した Al、Fe は原子吸光光度計（偏光ゼーマン原子吸光分光光度計 Z-5010、日立製作所）、Si はモリブデン青法により定量した。

表層試料は、新鮮重量を測定し、一部を含水率測定用試料とした。残りの試料は室温で 1 週間ほど風乾させ、2 mm の篩に通し分析に供した。含水率は 5 g の土壌を 105°Cの乾燥機で 48 時間乾燥させ、乾燥前後の重量比から求めた。新鮮重量と含水率から乾燥重量を求め、コアの体積で除し仮比重を算出した。表層試料の土壌特性は、全炭素含有量、全窒素含有量、腐植物質量（ヒューミン画分、フミン酸、粗フルボ酸画分）と Al_p、Fe_p の測定も行った。全炭素含有量、全窒素含有量、Al_p、Fe_p の測定は代表断面の土壌試料と同様に行った。

腐植物質量の測定は NAGOYA 法 [3] に従った。土壌を 0.1 M NaOH で抽出し、抽出液を得た。残渣土壌は非腐植物質を含むヒューミン画分として、風乾後に上記の全自動元素分析装置で全炭素含有量を測定した。抽出液に 3 M H₂SO₄ を加え pH1.0 ~ 1.5 とし、酸不溶の

フミン酸を沈殿させ上澄み液（水溶性の多糖、タンパク質様物質等を含む粗フルボ酸画分溶液）を回収した。フミン酸は 0.1 M NaOH に再溶解させ、約 0.1 M のリン酸一カリウム溶液で弱酸性に調整した。フミン酸溶液および粗フルボ酸画分溶液の炭素濃度を全有機態炭素計で測定した。池の窪牧野については、0-5、10-15、20-25 cm の試料のみ腐植物質量を測定した。

土壌炭素貯留量の比較

放牧強度の異なる地点間では家畜の踏圧の影響で土壌の仮比重が大きく異なることが考えられる。このような場合、同深度での炭素貯留量の比較は評価を誤る可能性がある。そのため、炭素貯留量の比較を正しく行うためには、仮比重の違いを考慮し一定量の鉍質土壌あたりに含まれる土壌炭素量で評価を行う必要がある。各地点で採取した表層試料について、土壌質量均等法（ESM: Equivalent soil mass method）[4] を用い、一定量の鉍質土壌あたりに含まれる土壌炭素量を算出した。基準鉍質土壌質量（RSM: Reference soil mass）は深度約 0-5 cm に相当する 200 Mg ha⁻¹ とした。池の窪牧野については深度約 0-30 cm に相当する RSM 2000 Mg ha⁻¹ でも算出を行った。

各層の鉍質土壌質量は次のように算出した。

$$M=d \times BD \times (100-1.724 \times TC)$$

M は鉍質土壌量 (Mg ha⁻¹)、 d は層の厚さ (cm)、 BD は仮比重 (g cm⁻³)、 1.724 は炭素量を有機物量に換算する係数 [5]、 TC は土壌炭素含有量 (%) である。

統計処理

統計解析は、R (R Development Core Team, 2022; version 4.2.2) で行った。各牧野において、放牧強度の異なる地点間の比較のために t 検定を用いた (有意水準 0.05)。

第 2 章 結果

代表断面の理化学性

池の窪牧野の放牧地で作成した土壌断面を図 4 に示す。池の窪牧野および上田第一牧野の代表断面の各層の厚さや物理性の結果をそれぞれ表 1・2 に示す。上田第一牧野の重放牧地点の A 層は層厚が薄かったため、また軽放牧地点の 3A、3B 層は礫が多かったため、仮比重・土壌三相測定用試料が採取できなかった。

全地点において、黒ボク特徴である「 $Al_0+1/2Fe_0$ が 2.0% 以上」を満たす層が表層 0-50 cm 以内に 25 cm 以上あり、黒ボク土に分類された。また、非アロフェン質黒ボク土の要件である「 Si_0 が 6 g kg^{-1} 未満または Al_p/Al_0 が 0.5 以上、かつ厚さが表層 0-50 cm 以内に 25 cm 以上」と、その他要件を鑑み、池の窪牧野の 2 地点は厚層アロフェン質黒ボク土、上田第一牧野の 2 地点は腐植質褐色非アロフェン質黒ボク土と分類された [6]。

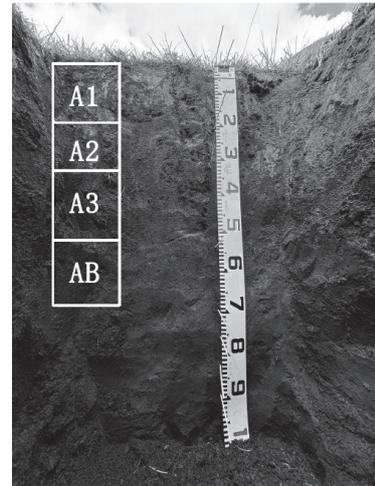


図 4 池の窪牧野 放牧地の
土壌断面

池の窪牧野では、最表層（A1 層）の物理性について 2 地点間で顕著な違いが見られた。野草地の A1 層と比較して、放牧地の A1 層では仮比重が有意に高く、気相率と透水係数が有意に低かった（表 1）。また、A2 層は野草地で仮比重が有意に高かったが、気相率は放牧地で有意に低くなっていた。上田第一牧野では、仮比重は軽放牧地点でやや高い傾向にあったが、気相率と透水係数については池の窪牧野同様、重放牧地点で低い傾向にあった。

土壌 pH は池の窪牧野放牧地で 5.31 ~ 5.93、野草地では 5.57 ~ 5.99、上田第一牧野重放牧地点では 4.86 ~ 5.39、軽放牧地点では 5.16 ~ 5.37 であった（表 2）。いずれの牧野においても、放牧強度が強い地点の表層で pH が低い傾向にあった。

池の窪牧野の層位毎の全炭素含有量は、A1 層では野草地が有意に高く、A2 層以下では放牧地が有意に高い結果となった。全窒素含有量は地点間に差はみられなかった。上田第一牧野では、重放牧地点の A、B、2A、2B 層の全炭素・全窒素含有量が、それぞれ軽放牧地点の A、B ~ 2B、3A、3B 層の値に近しく、2 地点の対応関係が確認された。深度方向への炭素・窒素の分布は 2 地点で似た傾向を示した。

WEOC は、いずれの牧野でも放牧強度の弱い地点の最表層で高かった。

表 1 池の窪牧野（放牧地と野草地）の代表断面の理化学性（平均値）

層位	深度 (cm)	仮比重 (g cm ⁻³)	気相率 (%)	透水係数 (cm sec ⁻¹)	pH (H ₂ O)	WEOC (mg kg ⁻¹)	TC (%)	TN (%)	C/N比	Al ₀	Fe ₀	Si ₀	Al _p	Fe _p	Al ₀ +1/2Fe ₀	Al _p /Al ₀	(g kg ⁻¹)		
																	Al ₀	Fe ₀	
放牧地	A1	0-20	1.093	14.8	3.00 × 10 ⁻⁴	5.31	42.13	3.03	0.35	8.6	6.84	10.28	2.16	5.06	5.95	1.20	0.74		
	A2	20-32	0.694	12.0	1.23 × 10 ⁻⁴	5.41	33.20	4.87	0.38	12.7	20.17	18.46	7.19	7.28	5.70	2.94	0.27		
	A3	32-54	0.599	18.6	7.18 × 10 ⁻⁴	5.66	32.91	5.09	0.36	14.2	22.66	20.64	8.04	5.27	4.39	3.30	0.23		
	AB	54-69	0.712	9.7	1.04 × 10 ⁻³	5.93	33.36	3.25	0.25	13.0	24.75	26.57	11.31	4.29	1.31	3.80	0.17		
野草地	A1	0-8	0.676	35.3	1.52 × 10 ⁻²	5.57	95.50	4.04	0.36	11.3	5.35	9.00	1.28	3.27	3.46	0.98	0.60		
	A2	8-26	0.979	22.8	1.63 × 10 ⁻²	5.98	41.30	4.74	0.36	13.0	19.36	17.76	6.92	3.80	3.20	2.82	0.20		
	A3	26-53	0.619	23.3	2.56 × 10 ⁻³	5.93	43.16	4.84	0.33	14.5	22.70	19.10	8.69	5.38	2.57	3.23	0.24		
	AB	53-68	0.586	15.1	2.54 × 10 ⁻³	5.99	41.39	2.60	0.22	11.9	25.52	25.73	13.40	3.85	1.31	3.84	0.15		

表 2 上田第一牧野（重放牧と軽放牧地点）の代表断面の理化学性（平均値）断面の理化学性（平均値）

層位	深度 (cm)	仮比重 (g cm ⁻³)	気相率 (%)	透水係数 (cm sec ⁻¹)	pH (H ₂ O)	WEOC (mg kg ⁻¹)	TC (%)	TN (%)	C/N比	Al ₀	Fe ₀	Si ₀	Al _p	Fe _p	Al ₀ +1/2Fe ₀	Al _p /Al ₀	(g kg ⁻¹)		
																	Al ₀	Fe ₀	
重放牧	A	0-3	ND	ND	4.86	89.81	8.31	0.64	13.0	14.80	21.87	2.54	15.09	9.28	2.57	1.02			
	B	3-10	0.693	19.2	1.73 × 10 ⁻²	5.02	40.11	3.56	0.38	9.3	16.11	24.28	2.80	17.28	9.70	2.82	1.07		
	2A	10-27	0.541	8.7	7.38 × 10 ⁻⁵	5.17	60.55	10.11	0.88	11.5	31.23	34.97	4.06	28.87	11.54	4.87	0.92		
	2B	27-60+	0.540	11.8	3.60 × 10 ⁻⁴	5.39	55.00	6.04	0.66	9.1	40.79	39.40	7.37	28.08	12.15	6.05	0.69		
軽放牧	A	0-12	0.671	28.2	5.57 × 10 ⁻²	5.37	143.13	8.61	0.67	12.8	16.20	21.44	2.54	14.45	9.44	2.69	0.89		
	B	12-20	0.961	21.4	1.85 × 10 ⁻²	5.27	44.48	2.90	0.30	9.6	21.17	24.79	3.92	18.28	9.39	3.36	0.86		
	C	20-30	0.921	17.0	1.36 × 10 ⁻³	5.27	46.78	4.24	0.45	9.4	25.66	30.74	4.37	21.63	11.37	4.10	0.84		
	2B	30-35	0.896	14.1	2.14 × 10 ⁻⁴	5.16	44.01	3.53	0.40	8.9	17.84	27.08	3.27	18.28	9.88	3.14	1.03		
	3A	35-46	ND	ND	ND	5.23	74.42	9.52	0.85	11.2	29.68	34.24	4.46	26.47	10.97	4.68	0.89		
	3B	46-60+	ND	ND	ND	5.24	43.84	5.72	0.64	8.9	37.33	35.64	5.85	29.26	12.20	5.51	0.78		

ND：データ無し

土壌炭素の深度方向の分布

池の窪牧野との表層試料の全炭素含有量、各腐植画分の炭素含有量（ヒューミン画分、フミン酸、粗フルボ酸画分）をそれぞれ図 5、6 に示す。

池の窪牧野では、0-5、5-10、25-30 cm の全炭素含有量と 0-5 cm のヒューミン画分のみ野草地が高く、その他はすべて放牧地で高かった。0-5 cm のヒューミン画分と 10-15 cm のフミン酸には地点間に有意差がみられた ($p < 0.05$)。腐植物質の分布は 0-5 cm のフミン酸と粗フルボ画分を除き、全炭素含有量と同じ傾向を示した。

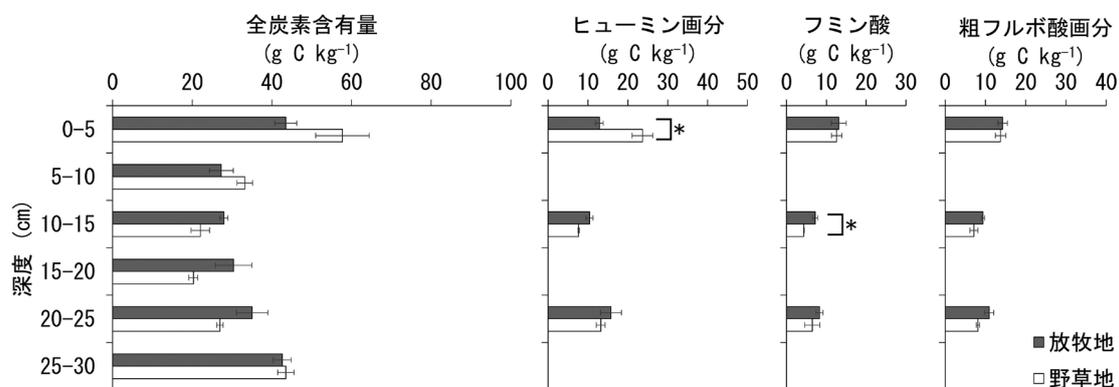


図 5 池の窪牧野の全炭素および各腐植画分の深度分布
エラーバー：標準誤差 * 間で有意差あり ($p < 0.05$)

上田第一牧野では、地点間に有意差は見られなかったが、全画分・全深度で重放牧地点で高かった。また、軽放牧地点ではいずれの画分も深度が深くなるにつれて低下していた。

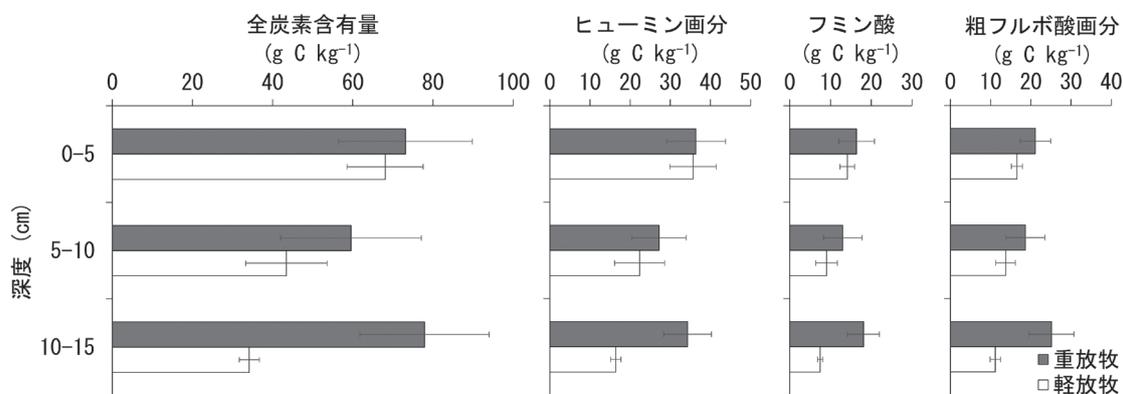


図 6 上田第一牧野の全炭素および各腐植画分の深度分布
エラーバー：標準誤差 *間で有意差あり ($p < 0.05$)

腐植複合体由来の Al と Fe (Al_p と Fe_p) は、池の窪牧野では全炭素含有量、各腐植画分の炭素含有量と有意な正の相関を示し、上田第一牧野では粗フルボ酸画分と強い相関を示した (表 3、4)。

表 3 池の窪牧野の全炭素含有量・各腐植画分の炭素含有量と Al_p ・ Fe_p の相関係数

	全炭素含有量 ($g\ kg^{-1}$)	ヒューミン画分 炭素含有量 ($g\ kg^{-1}$)	フミン酸 炭素含有量 ($g\ kg^{-1}$)	粗フルボ酸 炭素含有量 ($g\ kg^{-1}$)
Al_p ($g\ kg^{-1}$)	0.80**	0.65*	0.75**	0.82**
Fe_p ($g\ kg^{-1}$)	0.77**	0.61*	0.82**	0.84***

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

表 4 上田第一牧野の全炭素含有量・各腐植画分の炭素含有量と Al_p ・ Fe_p の相関係数

	全炭素含有量 ($g\ kg^{-1}$)	ヒューミン画分 炭素含有量 ($g\ kg^{-1}$)	フミン酸 炭素含有量 ($g\ kg^{-1}$)	粗フルボ酸 炭素含有量 ($g\ kg^{-1}$)
Al_p ($g\ kg^{-1}$)	0.80	0.64	0.87*	0.94**
Fe_p ($g\ kg^{-1}$)	0.83*	0.68	0.90*	0.97**

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

ESM 法による土壌炭素量の比較

池の窪牧野と上田第一牧野の ESM 法で算出した土壌全炭素量および腐植物質量と土壌全炭素量に占める各腐植画分の割合をそれぞれ図 7、8 に示す。池の窪牧野では、RSM 200 Mg ha^{-1} の土壌全炭素量は放牧地で $10.33 \text{ Mg C ha}^{-1}$ 、野草地で $13.28 \text{ Mg C ha}^{-1}$ であり、有意差はないが野草地で高い傾向にあった。ヒューミン画分は野草地で有意に高く、フミン酸、粗フルボ酸画分は地点間に有意差は見られなかった (図 7(a))。また、RSM 2000 Mg ha^{-1} で算出した土壌全炭素量は放牧地のほうが高い傾向にあった (図 7(b))。全炭素に占める腐植画分の割合は、放牧地ではフミン酸や粗フルボ酸画分が多く、野草地ではヒューミン画分が多い傾向にあった (図 7(c))。

上田第一牧野では、RSM 200 Mg ha^{-1} の土壌全炭素量は重放牧地点で $17.37 \text{ Mg C ha}^{-1}$ 、軽放牧地点で $15.96 \text{ Mg C ha}^{-1}$ であり、地点間に有意差はなかった。腐植物質量も地点間に有意差はなかったが、いずれも重放牧地点で高い傾向にあった (図 8(a))。全炭素に占める腐植画分の割合についても大きな差はなかったが、重放牧地点でフミン酸と粗フルボ酸画分、軽放牧地点でヒューミン画分が多い傾向にあり、池の窪牧野と同様だった (図 8(b))。

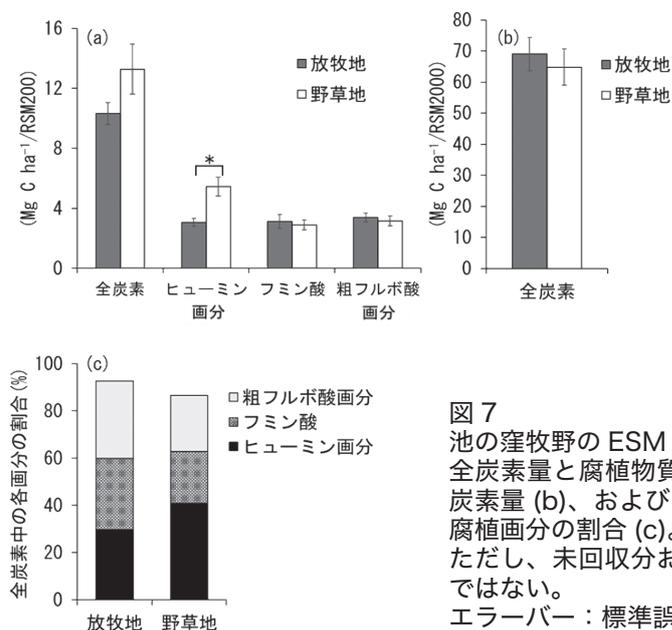


図 7
池の窪牧野の ESM 法で算出した RSM 200 Mg ha^{-1} の土壌全炭素量と腐植物質量 (a) と RSM 2000 Mg ha^{-1} の土壌全炭素量 (b)、および RSM 200 Mg ha^{-1} の全炭素に占める各腐植画分の割合 (c)。ただし、未回収分および測定誤差により (c) の合計は 100% ではない。
エラーバー：標準誤差 * 間で有意差あり ($p < 0.05$)

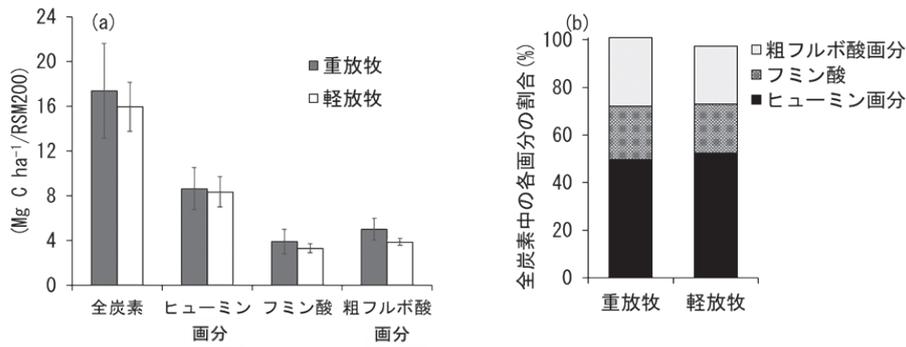


図 8
上田第一牧野の ESM 法で算出した RSM 200 Mg ha^{-1} の土壌全炭素量と腐植物質量 (a) と RSM 200 Mg ha^{-1} の全炭素に占める各腐植画分の割合 (b) ただし、未回収分および測定誤差により (b) の合計は 100% ではない。
エラーバー：標準誤差 * 間で有意差あり ($p < 0.05$)

第 3 章 考察

代表断面の土壌理化学性

池の窪牧野の放牧地と野草地の比較により、放牧地表層 (A1 層: 0-20 cm) では家畜の踏圧の影響を大きく受け、気相率の低い緻密な土壌となっていた (表 1)。一般に、土壌の気相率が低下すると大気と土壌中とのガス交換が低下し、土壌中の酸素濃度が低下する。全炭素含有量は A2 層以下では放牧地で有意に高い値を示しており (表 1)、放牧地では表層の気相率の低下が下層での微生物呼吸を抑制し、有機物が分解されずに残っている可能性がある。Ward et al. (2016) [7] は、英国の永年草原土壌において、異なる管理強度が土壌炭素に与える影響を評価した。調査の結果、管理強度が増すにつれて全炭素含有量は低下したが、仮比重の変化を考慮した土壌炭素貯留量は中程度の管理強度 (放牧強度は最大 1.5 LU ha^{-1}) で最大となった。Allen et al. (2011) [8] によると、英国における LU (Livestock Unit) の定義は、『脂肪含有量 36 g kg^{-1} の乳を 4500 L 生産する 626 kg のホルスタイン・フリージアン種成雌牛 (MAFF, 1981; SAC, 2001)』である。池の窪牧野 放牧地における 2024 年の放牧強度は 1.01 頭 ha^{-1} であり、あか牛 1 頭の体重をおよそ 700 ~ 800 kg と考えると本調査地の管理強度も ”中程度” に相当する。池の窪牧野よりも放牧強度のかなり低い (0.39 頭 ha^{-1}) 上田第一牧野では、重放牧地点と軽放牧地点間の土壌炭素量に大きな差は見られなかった。したがって、池の窪牧野の放牧強度が土壌下層の炭素蓄積に効果的であったと考えられる。

表層の全炭素および腐植物質の蓄積

池の窪牧野表層では、0-5、5-10、25-30 cm の全炭素含有量と 0-5 cm のヒューミン画分

のみ野草地が高く、その他はすべて放牧地で高い傾向にあった。上田第一牧野表層では、地点間に有意差は見られなかったが、全画分・全深度で重放牧地点で高い傾向にあった。また、腐植複合体由来の Al (Al_p) および Fe (Fe_p) は、全炭素含有量、各腐植画分の炭素含有量と有意な正の相関を示した。したがって、Al,Fe-腐植複合体が形成されることで腐植物質が安定化し、土壤中の炭素貯留量が増加する可能性が示された。池の窪牧野の野草地や上田第一牧野の軽放牧地点における主な有機物の給源は植物バイオマスであると考えられるが、池の窪牧野の放牧地や上田第一牧野の重放牧地点では家畜糞尿由来の炭素投入の影響も大きいと考えられる。乳牛ふん尿スラリー施用が土壤の有機・無機複合体形成に及ぼす影響を評価した先行研究 [9] では、スラリーの腐植物質含有率が非常に高く [10]、土壤への浸透が速やかに進むため、スラリーに含まれる腐植物質が土壤粒子と速やかに反応し、有機・無機複合体の形成を促進したと報告されている。本研究においても、放牧地で土壤に投入される糞尿にはフミン酸やフルボ酸などの腐植物質が含まれており、植物バイオマス由来の有機物よりも土壤への浸透性が高いと考えられ、Al,Fe-腐植複合体の形成が速やかに起こり安定化した可能性が示唆された。

本研究ではバイオマス現存量の測定を行っていないが、先行研究の結果からススキ草地のバイオマス生産量がシバやネザサの草地よりも大きいことが報告されている。菅平シバ草地でバイオマス現存量の季節変化を測定した先行研究 [11] では、全地上部現存量（乾物重）は $0.33 \sim 4.01 \text{ Mg ha}^{-1}$ であり、全地下部現存量（乾物重）は $6.36 \sim 8.01 \text{ Mg ha}^{-1}$ であることが報告されている。また、久住高原のネザサ群落（トダシバやワラビなどを含む）のバイオマス現存量は地上部が 4.58 Mg ha^{-1} 、地下部が 14.88 Mg ha^{-1} と報告されている [12]。阿蘇地域で測定されたススキの地上部バイオマス現存量（乾物重）は 10.8 Mg ha^{-1} であり [13]、深さ 0-30 cm に存在する地下茎の量は 20.6 Mg ha^{-1} と報告されている [14]。ススキのバイオマス生産量はシバ草地やネザサ群落よりもかなり大きく、本研究で調査を行ったススキが優占する地点（池の窪牧野 野草地、上田第一牧野 軽放牧地点）でもバイオマス生産量が大きかったと考えられる。

ESM 法による表層の土壤全炭素量は、上田第一牧野では野草地と放牧地の間にほとんど差は見られなかった（図 8(a)）。前述の通り、上田第一牧野の放牧強度は非常に低く、土壤環境に大きく影響しなかったと考えられる。また、上田第一牧野で調査を行った 2 地点は、ネザサ・シバとススキがモザイク状に入り混じって分布している場所に位置していたため、バイオマス由来の土壤への炭素投入量に明確な違いがなかった可能性がある。池の窪牧野で

は、RSM 200 Mg ha⁻¹ の土壤全炭素量とヒューミン画分の炭素量は野草地で放牧地よりも高く、ヒューミン画分の炭素量については有意差がみられた(図7(a))。本研究で測定したヒューミン画分には植物遺体や過去の野焼きで生じた炭化物なども含まれている可能性があり、バイオマス生産量の違い、すなわち土壤に投入される炭素の量の違いがヒューミン画分の違いとして表れたと考えられる。

RSM 2000 Mg ha⁻¹ で算出した池の窪牧野の土壤全炭素量は地点間に有意差はないが放牧地のほうが高い傾向があり、RSM 200 Mg ha⁻¹ での算出値と逆の傾向を示した。したがって、野草地表層では土壤への炭素投入量が多いため土壤全炭素量が高く傾向にある一方で、放牧地下層では微生物による有機物分解の抑制で土壤炭素量が高く維持されることにより、両地点の炭素貯留能力は同程度となったと考えられた。

池の窪牧野、上田第一牧野ともに、フミン酸と粗フルボ酸画分の炭素量や土壤全炭素に占める割合は放牧地で高かった。したがって、放牧地表層では以下の理由により腐植物質が蓄積したと考えられた。1つ目は、家畜排せつ物由来の腐植物質に富む有機物の直接的な供給である。李ら(2009)[15]は家畜糞尿にはフミン酸やフルボ酸が含まれており、フルボ酸の割合は堆肥化や腐熟化が進行すると減少する傾向にあると報告している。新鮮な家畜糞尿が供給される放牧地では、フミン酸とフルボ酸の直接的な土壤への投入量が多くなる可能性が考えられる。2つ目は、家畜糞尿の表層土壤への投入による微生物活性の増大である[16]。有機物が土壤に投入されることで土壤微生物の活性が上昇し有機物分解が促進される。この過程で分解された有機物が縮重合し腐植物質を生成する可能性がある。3つ目は、池の窪牧野の代表断面で確認された物理性の変化、特に透水性の低下が考えられる。フルボ酸や親水性酸は水に溶けやすく、移動性の高い画分である[17]。透水性の低下により、これらの画分が溶脱せずに表層に残っている可能性が考えられる。以上のことから、放牧地ではバイオマスによる炭素投入量は野草地よりも少ないが、投入された有機物を保持する能力は高いと考えられた。

おわりに

過去の研究から、阿蘇のススキが優占する野草地の炭素貯留能力が高いことが知られていたが、本研究では適度な放牧管理を行っているシバ優占の放牧地においてススキ野草地と同等の炭素貯留能力がある可能性が示された。放牧地では比較的分解されやすく、移動性の高い粗フルボ酸画分の割合が高い傾向にあったが、家畜の踏圧による物理性の変化により微生物

物分解を受けずに残っていることが明らかとなった。適度な放牧は草原の草量を維持し、野焼きの際の危険性を減少させることができるため、阿蘇の草原を維持していく上で有用な管理法であるといえる。

謝辞

本研究は令和6年度(2024年度)「阿蘇」世界文化遺産登録推進若手研究、JSPS 科研費 JP22H02472 の援助を得て行われた。本研究の実施に際し、環境省阿蘇くじゅう国立公園管理事務所の岩崎様、藤田様、池の窪牧野組合の方々、上田第一牧野組合の方々には調査地の情報提供や土壌採取の手配などご協力いただいた。土壌調査では北海道大学大学院農学研究院の倉持寛太講師、農学院の櫻田創さんにご協力いただいた。本研究の計画立案、実施、本報の確認を北海道大学大学院農学研究院土壌学研究室の当真要教授にご協力いただいた。本紙面を借りて深謝の意を表す。

参考文献

- [1] Yo Toma, John Clifton-Brown, Shinji Sugiyama, Makoto Nakaboh, Ryusuke Hatano, Fabián G.Fernández, J. Ryan Stewart, Aya Nishiwaki, Toshihiko Yamada. “Soil carbon stocks and carbon sequestration rates in seminatural grassland in Aso region, Kumamoto, Southern Japan,” *Global Change Biology* 19, 1676-1687, 2013.
- [2] 環境省, 阿蘇草原地域自然再生推進計画, Accessed: Jan. 8, 2025. [Online]. Available: https://www.aso-sougen.com/learn/files/mgz_08.pdf
- [3] 日本腐植物質学会『腐植物質分析ハンドブック—標準試料を例にして 第2版』, 農文協, 2019
- [4] Fabien Ferchaud, Guillaume Vitte, Bruno Mary, “Changes in soil carbon stocks under perennial and annual bioenergy crops,” *GCB Bioenergy*, 8, 290-306, 2016.
- [5] 青峰重範・原田登五郎, 土壌肥料学実験ノート, 養賢堂, 東京, 109p, 1960.
- [6] 日本ペドロロジー学会 第五次土壌分類・命名委員会, “Soil Classification System of Japan,” 日本ペドロロジー学会, 2017.
- [7] Ward, S.E., Smart, S.M., Quirk, H., Tallwin, J.R.B., Mortimer, S.R., Shiel, R.S., Wilby, A., Bardgett, R.D., “Legacy effects of grassland management on soil carbon

- to depth,” *Glob. Chang. Biol.* 22, 2929–2938, 2016.
- [8] Allen V.G., C. Batello, E.J. Berretta, J. Hodgson, M. Kothmann, X. Li, J. McIvor, J. Milne, C. Morris, A. Peeters and M. Sanderson, “An international terminology for grazing lands and grazing animals,” *Grass and Forage Science*, 66, 2–28, 2011.
- [9] 保井聖一・筒木潔・明石憲宗・木村義彰, “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—,” *日本土壌肥科学雑誌*, 76, 277-284, 2005.
- [10] 保井聖一・筒木潔・明石憲宗・木村義彰, “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,” *日本土壌肥科学雑誌*, 76, 269-276, 2005.
- [11] 下田勝久, “菅平シバ草地の地上部・地下部現存量の季節変化,” *日本草地学会誌*, 46, 52-53, 2000.
- [12] 岩城英夫・伊藤良夫・大賀宜彦, “久住高原ネザサ群落の現存量,” *草地生態*, 8, 8～11, 1966.
- [13] Toma Y, Fernández FG, Nishiwaki A, Yamada T, Bollero G, Stewart JR, “Aboveground plant biomass, carbon, and nitrogen dynamics before and after burning in a seminatural grassland of *Miscanthus sinensis* in Kumamoto, Japan,” *Global Change Biology Bioenergy*, 2, 52–62, 2010a.
- [14] Y. Toma, K. Armstrong, J. R. Stewart, T. Yamada, A. Nishiwaki, and F. G. Fernández, “Carbon sequestration in soil in a semi-natural *Miscanthus sinensis* grassland and *Cryptomeria japonica* forest plantation in Aso, Kumamoto, Japan,” *GCB Bioenergy*, vol. 4, no. 5, pp. 566–575, 2012, doi:10.1111/j.1757-1707.2012.01160.x.
- [15] 李香珍・谷昌幸・相内大吾・小池正徳・倉持勝久, “圃場還元利用されている実際の牛ふん尿堆肥に含まれる腐植酸およびフルボ酸の化学的特徴,” *日本土壌肥科学雑誌*, 80, 335–346, 2009.
- [16] 堀兼明・浦嶋泰文・塩見文武, “牛ふん堆肥, 豚ふん堆肥または化成肥料の連用とフィルムマルチの有無が土壌微生物バイオマスとバイオマス当たりの呼吸活性に及ぼす影響,” *土と微生物*, 66, 3-11, 2012.
- [17] 筒木潔, “フミン物質とその水環境へのかかわり フミン物質(腐植物質)の生成機構とその性質,” *水環境学会誌*, 18, 252-256, 1995.

はじめに

阿蘇地域の広大な草地は、古くから野焼きや採草、放牧といった人為的作用によって維持されてきた半自然草地であるが、近年、草地を維持するための人手不足や高齢化などにより、草地面積は減少傾向にある [1]。しかし、阿蘇の草地は森林よりも土壌への炭素固定能が高く [2]、持続的生物生産と地球温暖化対策において重要な役割を担っていると考えられる。その他にも農畜産業資源や生物多様性、水源涵養などの様々な生態系サービスをもたらしており [1]、草地の維持は緊要な課題であるといえる。

土壌有機態炭素 (Soil organic carbon; SOC) 蓄積量は、炭素のインプット (植物バイオマスから土壌への有機物供給速度) とアウトプット (主に微生物による土壌有機物の分解速度) のバランスによって決まり [3]、アウトプットが小さいほど大気中の CO₂ を土壌中に蓄積していると考えられる。阿蘇外輪山の草地に分布する黒ボク土は、主に火山灰と草本植生由来の有機物で構成されており、火山灰の風化により生成した活性アルミニウムなどの影響によって有機物を安定的に蓄積することができるため、SOC 蓄積量が大きいという特徴をもつ [4]。また、野焼き草地では炭が難分解性炭素として土壌に供給されることも SOC 蓄積に寄与していると考えられている。しかし、人為的な耕起、施肥、採草、放牧などの草地管理によって SOC 蓄積量に変化する可能性が指摘されており [5]、特に放牧地においては、家畜由来の糞尿の投入や踏圧が SOC 蓄積量に大きな影響を与えていると考えられる。一般的な傾向として、飼養率に関わらず放牧管理の期間が長くなるにつれて SOC 蓄積量が減少することが報告されている [6] が、増加した放牧地もあり [7]、放牧地の SOC 蓄積量は、その地域の環境条件によって異なる傾向を示す。このことから、阿蘇の放牧地で SOC 蓄積量の減少を抑制する (或いは増加を促進する) ためには、地域レベルで SOC 蓄積量への放牧影響を明らかにし、適した管理を行うことが重要であると考えられる。しかし、阿蘇の放牧地の SOC 蓄積量についての知見は少ない。そこで本研究は、阿蘇外輪山東部の放牧地 (ススキ野焼き

放牧地および改良牧草放牧地)を対象とし、放牧管理がSOC蓄積量に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

第1章 研究方法

1.1 調査地の概要

阿蘇外輪山東部に位置する町古閑牧野(阿蘇市一の宮町)の放牧地2地点を調査地とした(図1)。地点1は北緯32度55分34秒、東経131度09分13秒に位置する、南に開いた馬蹄形凹地頂部(標高869m)のススキ野焼き放牧地であり、毎年3月中旬頃に野焼きが行われている。植生はススキが優占種であり、その他はシシウドやケショウヨモギなどによって構成されていた。地点2は北緯32度55分34秒、東経131度09分13秒に位置し、地点1と同じ馬蹄形凹地の底部(標高855m)に広がる改良牧草放牧地である。改良牧草地は昭和41年(1966)から49年(1972)まで行われた阿蘇国営草地改良事業によって造成され[8]、その際に表層約30cm深まで耕起して整地し、トールフェスク、オーチャードライグラス、ペレニアルライグラス、ケンタッキーブルーグラスを混播した。以後、約10年毎に牧草を混播し、現在はトールフェスクやリードカナリーグラス(クサヨシ)、オーチャードライグラスが優占している。また、毎年6月、8月、10~11月に採草した後、化成肥料14-14-14を反当たり20kg施用している。調査地では毎年9月~11月にかけて放牧しており、2023年は肉牛60頭、2024年は馬を6頭放牧していた。また、近隣の馬蹄形凹地において、草地改良事業以降(約50年間)放牧をしていないススキ野焼き草地と改良牧草地で

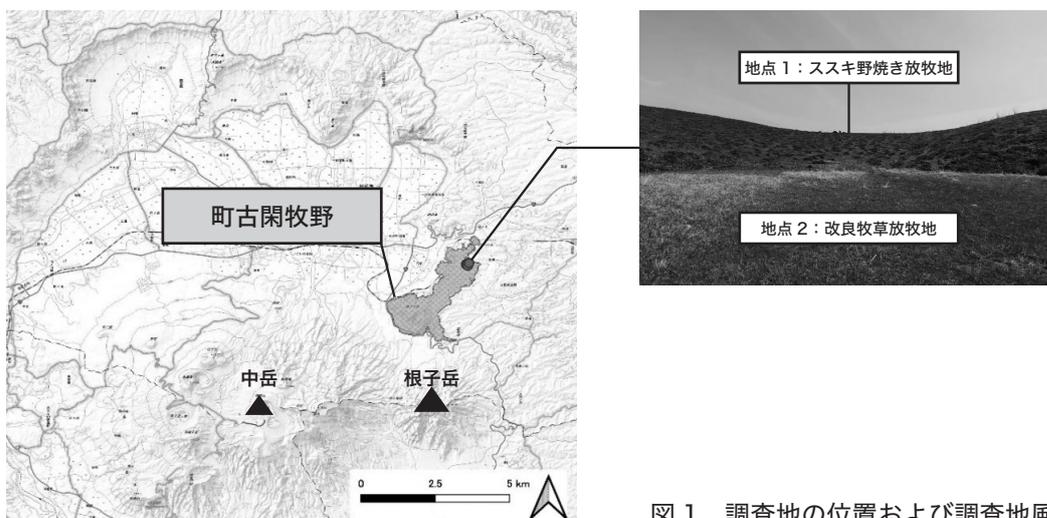


図1 調査地の位置および調査地風景

取した上清約 90 mL を 100 mL 定容後、連続流れ分析装置で測定した。その他の項目は土壤環境分析法 [10] に従った。リン酸吸収係数は抽出後、MP-AES で測定した。

1.2.2 地上部バイオマス調査

本調査は 2024 年 8 月に行った。1 × 1 m コドラートを各地点に 1 つ設け、その中の植物地上部を全て鎌で刈り取った。地点 1 においては刈り取った植物体地上部をススキとススキ以外に分別し、新鮮重を計測した。その後、一部を紙袋に移して重量を計量し、65 °C で 48 時間乾燥させ、乾物重量を計測して含水率を算出し、全量の乾重を推定したものを地上部バイオマス量 (Aboveground biomass; AGB) とした。乾燥させた植物体は粉碎し、NC コーダ (住化分析センター, NC-220F) で炭素濃度を測定した。植物体乾燥重量と炭素濃度から地上部バイオマス炭素量 (Aboveground biomass carbon; AGBC) を算出した。なお、今回の地上部バイオマス量調査は 8 月に行った結果であり、他の時期に調査を行っていないため、牧草は 2 番草のみの結果である。

1.2.3 地下部バイオマス調査

本調査は土壤断面調査と同時に行った。表層から 4 層位分の土壤ブロック (10 cm × 10 cm × 10 cm) を各層位 3 点ずつ採取した。なお、地点 1 の A1 層は 5 cm、地点 2 は 3 cm しかなく、採取が困難であったため、A1・A2 層として深度 10 cm で採取した。その他の土壤層位が 10 cm 以下の層はその深度まで採取した。採取した土壤ブロックは封筒に入れた後、35°C で約 2 週間乾燥させ、乾物重量を測定した。その後、目開き 2 mm の篩で篩別し、篩に残った根や地下茎は、直径 2 mm 以上のもの (大画分) とそれ以下のもの (小画分) に分けた。ススキ草地では、主に大画分は地下茎、小画分は地下茎から生える根を示す。さらに、目開き 2 mm で篩別した土壤中に含まれる細根類を回収するため、篩別した試料をバットに広げ、静電気で帯電させた塩ビパイプを近づけ、塩ビパイプについた細根類を回収し、目開き 500 μm の篩の上に乗せ、流水で洗い、篩の上に残ったもの (細画分) を回収した。なお、乾燥させた土壤ブロックをほぐすのが難しい場合は水につけて根を洗い出し、大画分と小画分を取り出した後、水に浮いた細根類は目開き 500 μm の篩で回収した。沈殿した土壤試料は 35 °C で 7 日間乾燥させた後、帯電させた塩ビパイプで細根を回収し、目開き 500 μm の篩の上に乗せ、流水で洗い、篩の上に残ったもの (細画分) を回収

した。回収した各画分は 35 °C で 24 時間乾燥させて水分をとばした後、封筒に入れ、65 °C で 48 時間乾燥させ、乾物重量を測定した。その後、粉碎し、NC コーダ (住化分析センター, NC-220F) で炭素および窒素濃度を測定した。本研究では、植物体地下部を地下部バイオマス (Belowground biomass; BGB) とし、地下部バイオマス量と炭素濃度から地下部バイオマス炭素量 (Belowground biomass carbon; BGBC) を算出した。

1.2.4 SOC 蓄積量の算出方法

① 土壌深度固定 (FD) 法

従来法である土壌深度固定法 (Fixed depth ; FD) [10] は、一定深度までに含まれる炭素量を比較する方法であり、TC、土壌の仮比重、深さを乗じて算出した。本研究では、深さ 0 ~ 10 cm および 0 ~ 30 cm までの SOC 蓄積量を比較した。

② 土壌質量均等 (ESM) 法

採草地や放牧地のような機械や牛による踏圧を受ける地点では、仮比重が大きい傾向にあり、FD 法を用いると SOC 蓄積量を過大評価することが懸念される。一定の土壌質量中の SOC 蓄積量を算出する土壌質量均等法 (Equivalent soil mass ; ESM 法) [12] で算出し、FD 法の結果と比較することとした。本研究では、地下部バイオマス量調査の際に採取した 1000 cm³ ブロックの土壌質量と炭素濃度を用いて算出した。土壌ブロックを 35 °C で乾燥させた後の乾燥重量 (B_w , g) は、鉱質土壌、地下部バイオマス量 (BGB, g)、土壌水分、土壌有機物 (Soil organic matter ;SOM) の合計量であり、一定の土壌質量当たりの SOC 蓄積量を算出するためには鉱質土壌の重量を算出する必要がある。そこで、土壌含水率 (W , %) は風乾土を秤量ビンにとり秤量した後、105°C で 24 時間乾燥させ、乾燥後の秤量値から算出した。また、土壌有機炭素を土壌有機物含量に変換する際に使用する van Bemmelen 係数 1.724 を用いて、土壌ブロックに含まれる土壌有機物量を除いた。以上の方法で測定した値を用いて、土壌ブロック中の鉱質土壌質量 (B_{soil} , g) を以下の式で算出した。

$$B_{soil}=(B_w-BGB) \times (100-W) \times (100-TC \times 1.724)$$

各層位 3 つずつ採取した土壌ブロックの鉱質土壌重量を合計し、底面積 10 cm × 30cm で一つのブロックとした。土壌層位が 10 cm 以上ある層は、鉱質土壌重量合計値を土壌層位

の深度まで換算し、層位土壌質量 ($M_{sample(n)}$, g) とした。n 層目までの累積土壌質量 ($M_{soil(n)}$, $Mg\ ha^{-1}$) を以下の式で算出した。

$$M_{soil(n)} = M_{sample(n)} / 300 \times 10^2 \dots(1)$$

次に、n 層目までの累積 SOC 蓄積量 ($M_{SOC(n)}$, $Mg\ C\ ha^{-1}$) は、その土壌質量と n 層目の土壌の全炭素 ($TC_{(n)}$, $g\ C\ kg^{-1}$) の積であり、以下の式で計算される。

$$M_{SOC(n)} = M_{soil(n)} \times TC_{(n)} \times 10^{-3} \dots(2)$$

基準土壌質量 ($M_{soil(R)}$, $Mg\ ha^{-1}$) あたりの累積 SOC 量 ($M_{SOC(R)}$, $Mg\ C\ ha^{-1}$) は、式 (1) と式 (2) で計算した土壌質量を任意の深さまで合計することによって計算される。

$$M_{SOC(R)} = M_{SOC(n)} + (M_{soil(R)} - M_{soil(n)}) (M_{soil(n+1)} - M_{soil(n)}) \times (M_{SOC(n+1)} - M_{SOC(n)})$$

本研究では、地点 1 の深さ 0-10 cm, 0-30 cm の土壌質量である 1078 $Mg\ soil/ha$, 2578 $Mg\ soil/ha$ を基準土壌質量とした。

1.2.5 対照区との比較方法

対照地の放牧管理をしていないススキ野焼き草地 (対照区 1) および改良牧草地 (対照区 2) の結果は未公表データのため、本論文に具体値を示すことができない。そのため、放牧管理によって地上部、地下部バイオマス量や SOC 蓄積量が増減した割合 (変化率) を以下の式で算出し、放牧影響を評価することとした。

$$\text{変化率} = (\text{放牧区} - \text{対照区}) / \text{対照区}$$

1.2.6 炭素安定同位体比測定による土壌炭素の給源の推定方法

土壌有機物の給源の推定のため、土壌、地下部バイオマス、牛糞および炭の炭素安定同位体比測定を行った。土壌試料は、2024 年 11 月に各地点表層 25 cm 深までの 5 cm 毎に土壌を採取し、1.2.1 の土壌試料と同様の処理を行った後、さらに目開き 500 μm メッシュで篩別した。また、地下部バイオマスは 1.2.3 の方法で回収したものを画分毎に粉碎した。牛糞は前述の土壌試料を採取した際に Bg 区の表層で回収したものを 35 °C で 7 日間乾燥させ、粉碎した。炭は、地上部バイオマス量調査の際に採取したススキを乾燥させたのち、燃やしたものを使用した。炭素安定同位体比は、約 0.1 mg の炭素を含む試料をスズカプセルに秤量し、元素分析計 (Thermo Scientific, FLASH HT Plus) を同位体比質量分析計 (Thermo Scientific, DELTA V ADVANTAGE) に接続し、連続フロー型測定を行った。分析結果は、

標準物質 VPDB (Vienna Pee Dee belemnite) からの偏差として、以下の式に従って $\delta^{13}\text{C}$ 値として千分率で表示した [12]。

$$\delta^{13}\text{C}(\%) = (R_{\text{sample}}/R_{\text{standard}} - 1) \times 1000$$

$$R = {}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C}$$

また、試料の炭素に占める C4 植物由来炭素の寄与率 (X) を以下の式で算出した [12]。

$$\delta^{13}\text{C} = \delta^{13}\text{C}_4 \times X + \delta^{13}\text{C}_3 \times (1-X)$$

ここで、 $\delta^{13}\text{C}_4$ および $\delta^{13}\text{C}_3$ はそれぞれ C4 と C3 植物由来の $\delta^{13}\text{C}$ 値であり、本研究では SOC 供給源であるススキおよび牧草の地下部バイオマスの $\delta^{13}\text{C}$ は、-14.4 ‰、-27.7 ‰であったことから、これらの値を用いて算出した。

第2章 結果

2.1 調査地の土壌特性

2.1.1 土壌断面調査

地点1の土壌断面を図2に示した。地点1の土壌断面は A1-A2-A3-A4-2C-3A-3AB-3Bw-4C-5A-6C-7A の12層位に区分された。A1層は黒色 (10YR1.7/1) であり、炭が蓄積していることが観察された。また、ススキの地下茎は特に A2層で発達しており、直径2 mm以下の小根・細根は下層まで発達していた。緻密度は A2と A3層で高かった。2Cおよび6Cは風化火山灰層であり、6Cは約1600年前の中岳 N2 降下スコリア層に対応すると考えられた。3A、5Aおよび7A層は黒色の埋没腐植層であった。活性アルミニウム反応は全ての層で即時非常に鮮明に反応した (+++) ため、黒ボク特徴を持つと判断できた。

地点2の土壌断面を図3に示した。地点2の土壌断面は、Ap1-Ap2-A1-A2-A3-2C-3A-3Bw-4A-5A の10層位に区分された。Ap1およびAp2層は草地改良の造成時に耕起した層であると考えられた。Ap1層では小



図2 地点1の土壌断面

根・細根が非常に発達しており、牛糞の混入も認められ、活性アルミニウム反応も低いことから、有機物がメインの層であると考えられた。Ap2層は緻密度が高く、小根・細根が多く観察された。2Cは風化火山灰層であった。7Aは黒色の埋没腐植層であった。断面調査の詳細な結果は以下の通りである。

【地点1】

A1 : 0～5 cm, 黒 (10YR1.7/1), 砂壤土 (SL), 中度粒状構造, 粘着性弱, 可塑性弱, 緻密度疎 (17 mm), 孔隙なし, 中根あり, 小細根すこぶる富む, 半湿, 活性アルミニウム反応 +++, 層界平坦明瞭。

A2 : 5～14 cm, 黒褐 (10YR2/1), 砂質埴壤土 (SCL), 弱度中亜角塊状構造, 粘着性弱, 可塑性弱, 緻密度中 (19 mm), 小胞状孔隙あり, 中根まれ, 小細根すこぶる富む, 半湿, 活性アルミニウム反応 +++, 層界平坦判然。

A3 : 14～30 cm, 黒褐 (10YR2/1), 砂質埴壤土 (SCL), 弱度大亜角塊状構造, 粘着性弱, 可塑性弱, 緻密度中 (20 mm), 小胞状孔隙あり, 中根あり, 小細根富む, 半湿, 活性アルミニウム反応 +++, 層界平坦判然。

A4 : 30～37 cm, 黒褐 (10YR2/2), 埴壤土 (CL), 弱度大亜角塊状構造, 粘着性弱, 可塑性中, 緻密度疎 (17 mm), 小胞状孔隙あり, 小細根富む, 半湿, 活性アルミニウム反応 +++, 層界不規則判然。

2C : 37～40 cm, 黒褐 (10YR2/1), 砂土 (S), 単粒状構造, 粘着性弱, 可塑性弱, 緻密度疎 (16mm), 孔隙なし, 根なし, 半湿, 活性アルミニウム反応 +++, 層界波状明瞭。

3A : 40～58 cm, 黒 (10YR1.7/1), 砂質埴壤土 (SC), 弱度大亜角塊状構造, 粘着性中, 可塑性弱, 緻密度中 (19 mm), 小胞状孔隙あり, 中根あり, 小根含む, 細根富む, 半湿, 活性アルミニウム反応 +++, 層界平坦判然。

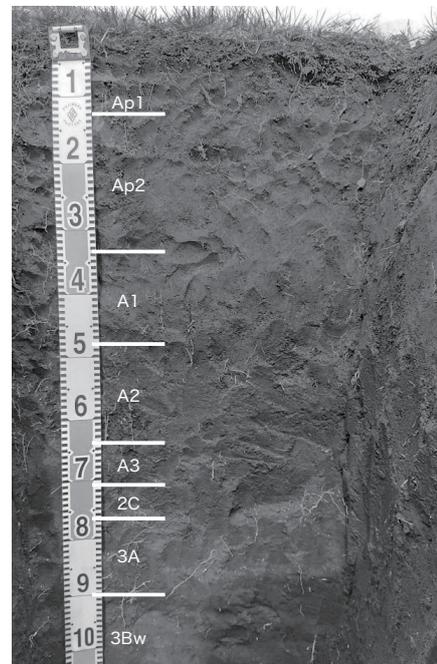


図3 地点2の土壌断面

- 3AB :58 ~ 72 cm, 黒褐 (10YR2/2), 砂質埴壤土 (SC), 中度大亜角塊状構造, 粘着性弱, 可塑性中, 緻密度中 (21 mm), 小胞状孔隙あり, 小根含む, 細根富む, 半湿, 活性アルミニウム反応 +++, 層界平坦判然。
- 3Bw :72 ~ 84 cm, 暗褐 (10YR3/3), 砂質埴壤土 (SC), 弱度大亜角塊状構造, 粘着性弱, 可塑性中, 緻密度中 (21 mm), 小胞状孔隙あり, 小根含む, 細根あり, 半湿, 活性アルミニウム反応 +++, 層界平坦判然。
- 4C :84 ~ 86 cm, 黒褐 (10YR2/3), 砂質埴壤土 (SC), 直径約 2 mm 風化スコリアあり, 弱度大亜角塊状構造, 粘着性中, 可塑性弱, 緻密度中 (21 mm), 小胞状孔隙まれ, 小根あり, 半湿, 活性アルミニウム反応 +++, 層界平坦判然。
- 5A : 86 ~ 96 cm, 黒褐 (10YR2/1), 埴壤土 (CL), 弱度大亜角塊状構造, 粘着性中, 可塑性中, 緻密度疎 (16 mm), 小胞状孔隙まれ, 小根あり, 半湿, 活性アルミニウム反応 +++, 層界平坦明瞭。
- 6C :96 ~ 102 cm, 黒褐 (10YR2/1), 砂質埴壤土 (SCL), 単粒状構造, 粘着性弱, 可塑性弱, 緻密度疎 (16 mm), 孔隙なし, 小細根まれ, 半湿, 活性アルミニウム反応 +++, 層界平坦判然。
- 7A :102 ~ 110 + cm, 黒 (10YR1.7/1), 軽埴土 (LiC), 弱度小亜角塊状構造, 粘着性弱, 可塑性中, 緻密度疎 (17 mm), 孔隙なし, 細根まれ, 半湿, 活性アルミニウム反応 +++, 層界平坦判然。

【地点 2】

- Ap1 : 0 ~ 3 cm, 黒褐 (10YR2/1), 埴壤土 (CL), 中度粒状構造, 粘着性弱, 可塑性弱, 緻密度疎 (11mm), 孔隙なし, 小細根すこぶる富む, 半湿, 活性アルミニウム反応土, 層界平坦判然, 耕起履歴あり。
- Ap2 :3 ~ 24 cm, 黒褐 (10YR2/1), 埴壤土 (CL), 直径 2 ~ 3 mm 風化軽石まれにあり, 中度大亜角塊状構造, 粘着性弱, 可塑性中, 緻密度中 (22 mm), 小胞状孔隙あり, 中根まれ, 小細根富む, 半湿, 活性アルミニウム反応 +++, 層界平坦漸変, 耕起履歴あり。
- A1 : 24 ~ 40 cm, 黒褐 (10YR2/1), 埴壤土 (CL), 中度大亜角塊状構造, 粘着性弱,

- 可塑性中，緻密度疎 (17 mm)，小胞状孔隙あり，小細根富む，半湿，活性アルミニウム反応 +++，層界平坦漸変。
- A2 :40 ~ 55 cm, 黒褐 (10YR2/1), 埴壤土 (CL), 直径約 2 mm 風化スコリアまれにあり，中度大亜角塊状構造，粘着性中，可塑性中，緻密度疎 (17 mm)，小胞状孔隙あり，小細根富む，半湿，活性アルミニウム反応 +++，層界平坦漸変。
- A3 : 55 ~ 62 cm, 黒褐 (10YR2/1), 埴壤土 (CL), 中度大亜角塊状構造，粘着性中，可塑性中，緻密度中 (19 mm)，小胞状孔隙あり，小細根含む，半湿，活性アルミニウム反応 +++，層界平坦判然。
- 2C : 62 ~ 68 cm, 黒褐 (10YR2/1), 砂質埴壤土 (SCL), 弱度大亜角塊状構造，粘着性中，可塑性中，緻密度 (16 mm)，小胞状および管状孔隙あり，小細根含む，半湿，活性アルミニウム反応 +++，層界平坦判然。
- 3A : 68 ~ 80 cm, 黒褐 (10YR2/2), 砂壤土 (SL), 弱度大亜角塊状構造，粘着性中，可塑性弱，緻密度中 (19 mm)，小胞状孔隙あり，小細根含む，半湿，活性アルミニウム反応 +++，層界平坦判然。
- 3Bw :80 ~ 92 cm, 黒褐 (2.5Y3/2), 砂質埴壤土 (SCL), 弱度大亜角塊状構造，粘着性中，可塑性弱，緻密度疎 (17 mm)，小胞状孔隙まれ，小細根含む，半湿，活性アルミニウム反応 +++，層界平坦判然。
- 4A :92 ~ 101 cm, 暗オリーブ褐 (2.5Y3/3), 砂質埴壤土 (SCL), 弱度大亜角塊状構造，粘着性中，可塑性弱，緻密度疎 (11 mm)，小胞状孔隙あり，小細根含む，半湿，活性アルミニウム反応 +++，層界平坦明瞭。
- 5A : 101 ~ 106 + cm, 黒 (10YR1.7/1), 埴壤土 (CL), 直径約 3 mm の風化軽石まれにあり，弱度中亜角塊状構造，粘着性弱，可塑性弱，緻密度疎 (13 mm)，小胞状孔隙あり，小細根含む，半湿，活性アルミニウム反応 ±。

2.1.2 土壌分類および土壌一般理化学性

各地点の土壌一般理化学性は表 1 に示した。黒ボク土は容積重が低く，また，火山ガラスなどの風化により生成した活性アルミニウムの影響によってリン酸吸収係数が高く，腐植が集積されやすいという特徴をもつ。日本土壌分類体系 (2017) [4] における黒ボク土の識別

基準は、「(1) リン酸吸収係数が 15.00 mgP₂O₅/g 以上であること (あるいは Al₀+1/2 Fe₀ が 2.0%以上。)(2) 手で揉み砕いた後の繊維が元の容積の 1/6 未満であること」の条件を満たすこととされており、本研究の調査地ではどちらの条件も満たしていた。また、Al_p/Al₀ が全層位で 0.5 以下であり、「非アロフェン質特徴」を満たさなかったため、「アロフェン質黒ボク土」であった。また、表層 25 cm 以上で TC が 30 g/kg 以上、かつ湿状態の土色が明度 3 以下かつ彩度 3 以下の「腐植質表層」を 50 cm 以上もつことから、黒ボク土の中でもアロフェン、イモゴライトを主要鉱物とし、腐植含量が高いという特徴をもつ「厚層アロフェン質黒ボク土」に分類された。

また、対照区 1, 2 と比較して異なる傾向を示し、特に放牧の影響を受けたと考えられる項目は全炭素 (TC), 全窒素 (TN), 可給態窒素 (N), 仮比重, 交換性塩基だった。TC は地点 1 の A1 層で 66.3 g/kg, A2 で 39.9 g/kg, A3 層で 37.0 g/kg, A4 層で 45.4 g/kg であった。一方、対照区 1 においては、A1 層は約 60 g/kg, A2 層で約 50 g/kg, A3 および A4 層で約 40 g/kg あったことから、地点 1 は表層から次表層にかけての TC の減少幅が大きい傾向にあった。また、両地点において A1 層の TC が高い理由として、炭の蓄積によるものと考えられた。地点 2 では、Ap1 層および Ap2 層でそれぞれ 41.3 g/kg, 30.1 g/kg であった。一方、対照区 2 においてはそれぞれ約 50 g/kg, 約 40 g/kg であった。このことから、地点 2 は対照区 2 よりも表層の TC が小さい傾向にあった。TN についても同様の傾向を示したため、C/N 比は地点 1, 2 と対照区で差が無かった。また、可給態 N は対照区と比較して地点 1 および 2 で大きかった。仮比重は、対照区 1 の表層では約 0.6 g/cm³ であったのに対し、地点 1 の A2 層で 0.91 g/cm³ であり、牛の踏圧の影響が認められた。一方、地点 2 と対照区 2 は採草の際の機械の踏圧を受けるため、どちらも表層の仮比重が高い傾向にあった。交換性塩基は、地点 1 の A1 層の Mg, Ca が対照区 1 よりも高い傾向にあった。一方、地点 2 は対照区 2 と同様の傾向をしめし、放牧影響は認められなかった。また、K については地点 1 および対照区 1 の A1 層で高く、差は認められなかった。その他の項目については対照区と同様の傾向を示した。

表 1 各地点の土壤一般理化学性

調査 地点	層位	深さ (cm)	pH(H ₂ O)	TC (g/kg)	TN (g/kg)	C/N	可給態N (mg/kg)	仮比重 (g/cm ³)	交換性塩基 (mol/c/kg)					塩基 飽和度* (%)	リン酸 吸収係数 (mg P ₂ O ₅ /g)	選択溶解法 (g/kg)						
									Mg	Na	Ca	K	Sto			Al ₀	Fe ₀	Al ₁	Fe ₀ +1/2Fe ₁	Al ₀ /Al ₁		
1	A1	0-5	5.9	86.3	4.6	14.3	221.8	0.54	17.0	2.30	0.10	8.15	0.71	86.4	13.3	4.23	11.7	10.9	3.5	3.4	17.2	0.3
	A2	5-14	5.7	39.9	3.1	13.0	152.5	0.91	9.7	0.70	0.12	2.27	0.46	36.6	14.6	5.12	12.4	11.4	4.0	3.7	18.1	0.3
	A3	14-30	5.7	37.0	2.8	13.4	-	0.86	8.7	0.47	0.10	1.78	0.33	30.8	16.6	8.2	17.4	14.4	4.0	3.8	24.6	0.2
	A4	30-37	5.6	45.4	3.2	14.3	-	0.69	12.1	0.45	0.12	2.01	0.24	23.3	19.1	11.3	20.4	16.8	5.0	5.7	28.8	0.2
	2C	37-40	5.7	35.1	2.5	14.3	-	0.71	10.0	0.49	0.11	2.20	0.18	29.8	18.0	11.4	19.6	16.6	3.5	2.3	27.9	0.2
	3A	40-58	5.8	40.9	2.9	14.2	-	0.69	13.5	0.66	0.12	3.21	0.22	31.1	18.7	12.4	19.7	17.4	4.1	2.8	28.4	0.2
	3AB	58-72	5.8	24.4	1.7	14.3	-	0.79	8.8	0.49	0.10	2.06	0.14	31.6	17.7	12.8	18.3	17.4	4.0	2.9	27.0	0.2
	3B	72-81	5.8	17.3	1.2	14.1	-	0.74	9.4	0.55	0.13	2.11	0.13	31.1	17.8	14.6	18.1	17.8	2.1	1.8	27.0	0.1
	4C	81-86	5.9	18.0	1.2	15.1	-	0.71	11.7	0.65	0.17	2.40	0.17	28.9	17.5	15.3	21.7	19.5	1.9	2.4	31.5	0.1
	5A	86-96	5.8	73.1	4.4	16.5	-	0.48	29.8	2.28	0.21	10.25	0.26	43.6	24.0	10.0	20.0	21.9	7.4	10.3	31.0	0.4
	6C	96-102	5.9	31.7	1.8	17.4	-	0.73	13.3	0.92	0.18	4.18	0.05	40.0	19.1	2.2	6.86	7.28	3.9	2.9	10.3	0.6
	7A	102-110+	5.9	110.7	5.5	20.2	-	0.37	51.1	3.68	0.19	13.23	1.30	36.0	27.5	3.29	9.48	9.63	2.7	3.1	14.3	0.3
2	Ab1	0-3	5.2	41.3	3.7	11.1	151.1	0.93	11.3	0.51	0.11	1.77	0.18	22.7	15.2	5.8	15.4	13.4	3.7	3.9	22.1	0.2
	Ab2	3-24	5.7	30.1	2.6	11.6	69.5	1.08	8.7	0.58	0.18	2.79	0.10	42.0	15.6	7.8	24.2	18.6	3.5	3.3	33.5	0.1
	A1	24-40	5.8	34.7	2.8	12.5	-	0.84	10.6	0.79	0.15	3.12	0.04	38.5	18.3	12.0	26.6	20.4	3.7	2.0	36.8	0.1
	A2	40-55	5.9	30.6	2.3	13.5	-	0.76	11.4	0.92	0.18	3.52	0.04	40.5	19.6	12.0	24.5	18.2	3.9	3.2	33.6	0.2
	A3	55-62	5.9	27.8	2.0	13.8	-	0.72	11.1	0.89	0.15	3.45	0.05	41.1	19.3	16.3	25.1	19.8	3.0	1.4	35.0	0.1
	2C	62-68	5.9	23.5	1.6	14.8	-	0.76	10.1	0.83	0.17	3.32	0.07	43.3	17.9	20.2	26.3	23.4	2.8	1.3	36.0	0.1
	3A	68-80	6.0	17.4	1.1	16.0	-	0.82	8.3	0.73	0.16	2.79	0.06	45.0	17.9	21.3	26.9	24.9	2.1	1.3	39.4	0.1
	3B	80-92	6.0	12.9	0.7	17.4	-	0.84	7.5	0.60	0.18	2.39	0.09	43.0	13.9	14.0	27.4	25	1.9	1.3	39.9	0.1
	4A	92-101	6.0	22.4	1.2	18.3	-	0.75	11.7	0.91	0.15	4.24	0.12	46.4	16.2	13.7	24.4	18.5	2.7	1.9	33.7	0.1
	5A	101-106+	6.0	94.9	4.9	19.3	-	0.41	45.0	3.67	0.27	24.34	0.25	63.4	23.2	14.7	35.6	27.3	5.6	7.4	49.3	0.2

* 塩基飽和度(%)=(交換性Mg+Na+Ca+K)/CEC×100

2.2 地上部バイオマス量調査

地上部バイオマス量 (AGB) は、地点 1 で 10.5 Mg/ha、地点 2 で 5.1 Mg/ha であった (表 2)。地点 1 の AGB のうちススキの割合は地点 1 で 92%、対照地 1 で 76% であったことから、放牧管理によってススキの割合が高まることが示唆された。総 AGB 量はどちらも対照地と比較して大きな差が認められないことから、放牧による糞尿の負荷は植物体地上部の生育に影響していないことが示唆された。AGB の全炭素は、地点 1 ではススキが 42.7 %、ススキ以外が 40.2 %、地点 2 の牧草が 39.0% であった。地上部バイオマス炭素量 (AGBC) は、地点 1 で 4.5 Mg C/ha、地点 2 で 2.0 Mg C/ha であり、対照地との差は認められなかった。

表 2 地上部バイオマス量および地上部バイオマス炭素量の比較

地点	植物種	AGB(Mg/ha)	TC(%)	TN(%)	C/N	AGBC(Mg C/ha)
地点 1	ススキ	9.7(+0.3)	42.7(0.0)	0.5(-0.4)	80(+0.6)	4.1(+0.3)
	ススキ以外	0.8(-0.6)	40.2(0.0)	1.2(+0.3)	33(-0.3)	0.3(-0.7)
	合計	10.5(+0.1)	-	-	-	4.5(+0.1)
地点 2	牧草	5.1(0.0)	39.0(0.0)	1.4(0.0)	27(0.0)	2.0(0.0)

() は変化率を示す。

2.3 地下部バイオマス量調査

各区の表層 0 ~ 30 cm 深の地下部バイオマス量 (BGB) の結果を表 3 に示した。深さ 0-10 cm までの総 BGB は、地点 1 および地点 2 でそれぞれ 61.7 ± 8.3 Mg/ha、 9.4 ± 1.5 Mg/ha であった。地点 1 は対照区 1 よりも有意に大きく、地点 2 は対照区 2 よりも有意に小さい傾向にあった。また、0-30 cm 深までの総 BGB は、地点 1 および地点 2 でそれぞれ 113.3 ± 12.2 Mg/ha、 23.4 ± 4.5 Mg/ha であり、地点 1 は対照区 1 よりも有意に大きかった。地点 1 では対照地と比較して特に深さ 10 ~ 30 cm の大画分が有意に大きい傾向にあったが、小画分は 0 ~ 10 cm、10 ~ 30 cm でどちらも有意に小さい傾向にあった。細画分は特に表層で増加傾向にあった。一方、地点 2 では大画分はほとんど回収されず、小画分が主な BGB であり、対照地と比較して深さ 0 ~ 10 cm で有意に小さく、10 ~ 30 cm で有意に大きかった。また、細画分は減少傾向にあった。これらのことから、放牧管理によってススキ草地の BGB は増加傾向、改良牧草地では減少傾向であり、ススキの地下茎や牧草の根が下層で発達する傾向にあることが明らかとなった。また、地点 1 は地点 2 よりも表層 30 cm 深の BGB は約 5 倍量存在していた。

表3 地下部バイオマス量合計量および画分毎の比較

	総 BGB(Mg/ha)		大画分 (Mg/ha)		小画分 (Mg/ha)		細画分 (Mg/ha)	
	0 ~ 10 cm	0 ~ 30 cm	0 ~ 10 cm	10 ~ 30 cm	0 ~ 10 cm	10 ~ 30 cm	0 ~ 10 cm	10 ~ 30 cm
地点 1	61.7 ± 8.3 (+0.3) †	113.3 ± 12.2 (+0.1) †	35.0 ± 8.5 (+0.3)	15.4 ± 4.9 (+1.8) †	3.5 ± 0.7 (-0.7) †	2.3 ± 0.4 (-0.7) †	23.3 ± 12.4 (+0.3)	33.7 ± 3.5 (+0.1)
地点 2	9.4 ± 1.5* (-0.5) ‡	23.4 ± 4.5 (-0.3)	0.0 (-1.0)	0.2 ± 0.0 (+0.7)	4.4 ± 0.8 (-0.4) ‡	6.2 ± 1.1 (+2.6) ‡	5.0 ± 1.1 (-0.6) ‡	7.4 ± 1.5 (-0.3)

() は変化率を示す。

† 対照区 1 との有意差あり (p<0.05, t 検定) ‡ 対照区 2 との有意差あり (p<0.05, t 検定)

深さ 0 ~ 10 cm の BGB 各画分の全炭素 (TC) および全窒素 (TN), C/N 比, および深さ 0 ~ 30 cm の地下部バイオマス炭素量 (BGB) を表 4 に示した。各画分の TC は大・小画分で大きく, 細画分で小さい傾向にあった。一方, TN は両地点とも細画分で大きい傾向が認められ, C/N は大・小画分で大きく, 細画分で小さい傾向にあった。また, 両地点とも対照区と比較して特に小画分の TN が小さい傾向にあり, C/N 比が高い傾向にあった。画分別の BGBC は, 地点 1 の大画分および細画分, 地点 2 の小画分が増加傾向にあり, 地点 1 の小画分, 地点 2 の大画分, 細画分が減少傾向にあった。深さ 0 ~ 30 cm の総 BGBC は, 地点 1 で 37.9 ± 4.2 Mg C/ha, 地点 2 で 7.0 ± 1.3 Mg C/ha であり, 対照区と比較して地点 1 では増加傾向, 地点 2 では減少傾向にあったが, どちらも有意な差は認められなかった。これらのことから, 放牧管理によって土壌中の総 BGBC 量は変化しないが, 根や地下茎の形質が異なる傾向が認められた。

表 4 画分毎の TC・TN および地下部バイオマス炭素 (BGBC) 量の比較

地点	画分	TC(%)	TN(%)	C/N	深さ 0 ~ 30 cm の BGBC(Mg C/ha)
地点 1	大画分	37.9(-0.1)	0.4(0.0)	87.5(-0.1)	19.1 ± 5.1(+0.3)
	小画分	40.1(0.0)	0.5(-0.5)	82.2(+1.2)	2.4 ± 0.4(-0.6) †
	細画分	28.8(+0.1)	1.1(+0.2)	26.8(0.0)	16.5 ± 4.4(+0.3)
	合計	-	-	-	37.9 ± 4.2(+0.1)
地点 2	大画分	-	-	-	0.0(-1.0)
	小画分	38.5(+0.2)	0.9(-0.2)	44.9(+0.5)	4.1 ± 0.7(+0.7) ‡
	細画分	23.2(-0.1)	1.3(0.0)	17.3(-0.1)	2.9 ± 0.6(-0.5) ‡
	合計	-	-	-	7.0 ± 1.3(-0.2)

() は変化率を示す。

† 対照区 1 との有意差あり (p<0.05, t 検定)

‡ 対照区 2 との有意差あり (p<0.05, t 検定)

2.4 土壌炭素供給源の推定

炭素安定同位体比測定の結果, SOC 供給源であるススキおよび牧草の BGB の $\delta^{13}\text{C}$ は, -14.4 ‰, -27.7‰であり, C4 植物であるススキと, C3 植物である牧草による同位体比の違

いが認められた。また、地点1で回収した牛糞の $\delta^{13}\text{C}$ は-19.9 ‰, 炭は-13.7 ‰だった。各地点において、深さ5 cm毎に採取した土壌の $\delta^{13}\text{C}$ を表5に示した。表層については、地点1では深さ0～1 cm, 地点2では0～2 cmで糞を含むことが観察されたため、0～5 cmでまとめずに分けて採取した。地点1の対照区であるススキ野焼き草地(対照区1)では、表層5 cmのSOCは62%がC4植物由来であるの

表5 土壌深度毎のTC・TNおよび $\delta^{13}\text{C}$ とC4植物由来Cの割合

地点	深さ (cm)	TC(%)	TN(%)	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	C4(%)
地点1	0-1	6.31	0.51	-22.3	38
	1-5	4.02	0.35	-21.4	45
	5-10	3.05	0.26	-19.4	61
	10-15	3.03	0.24	-18.5	68
	15-20	4.62	0.34	-16.8	82
	20-25	4.60	0.32	-16.1	87
地点2	0-2	7.30	0.62	-23.6	31
	2-5	4.49	0.41	-22.9	36
	5-10	3.14	0.28	-20.4	55
	10-15	3.08	0.27	-20.7	53
	15-20	3.39	0.30	-20.8	52
	20-25	3.23	0.28	-20.5	54

に対し、5 cm以深では75～77%を占めていた。また、地点2の対照区である改良牧草地(対照区2)では、深さ0～10 cmのSOCは38～67%がC4植物由来Cであるのに対し、10 cm以深では81～86%であった。対照区2では表層0～10 cmで牧草の根(小画分)が非常に発達していたことから、牧草由来のCの供給量が多い深さまではC4植物由来の炭素の割合が小さくなる傾向が認められ、牧草などのC3植物の影響が小さい層においてはC4植物由来炭素の割合が約80%を占めることが示唆された。このことを踏まえると、地点2は他地点と比較して深さ25 cmまでC4植物の影響が小さい傾向にあり、これは10～30 cmでBGB量の小画分が大きいことと関係している可能性が示唆された。一方、地点1は、表層0～5 cmで炭の蓄積が観察されていたが、表層の $\delta^{13}\text{C}$ の値は炭よりも糞の値に近い傾向にあった。また、C4植物由来炭素の割合は対照区1と比較して0～15 cmで低い傾向にあった。このことから、ススキ野焼き放牧地においては放牧による糞の供給は、深さ15 cmまでのSOCの供給または微生物代謝などに影響を及ぼしている可能性が示唆された。

2.5 土壌炭素蓄積量の比較

FD法およびESM法を用いてSOC蓄積量を算出した結果を表6に示した。FD法で算出した深さ0～10 cmおよび0～30 cmまでのSOC蓄積量は、地点1で36 Mg C/haおよび102 Mg C/ha, 地点2で34 Mg C/haおよび97 Mg C/haであり、対照区と差は無かった。しかし、両地点で表層土壌の仮比重が高い傾向にあったことから、SOC蓄積量を過大評価している可能性が示唆された。一方、ESM法で算出した基準土壌質量1078 Mg/haおよび

2678 Mg/ha 当たりの SOC 蓄積量は地点 1 で 52 Mg C/ha および 112 Mg C/ha, 地点 2 で 34 Mg C/ha および 88 Mg C/ha であった。対照区と比較して, 地点 1 の 1078 Mg/ha を除き, 両地点で減少傾向にあった。特に地点 2 は放牧による SOC 蓄積量の減少量が大きい傾向にあった。

表 6 FD 法および ESM 法で算出した SOC 蓄積量の比較

	FD 法 (Mg C/ha)		ESM 法 (Mg C/ha)	
	0-10 cm	0-30 cm	1078 Mg/ha	2678 Mg/ha
地点 1	36.1(+0.1)	101.6(0.0)	52.0(0.0)	112.1(-0.1)
地点 2	34.3(0.0)	97.2(0.0)	34.4(-0.3)	87.9(-0.2)

() は変化率を示す。

おわりに

本研究は, 阿蘇外輪山東部において, 約 50 年前からススキ野焼き放牧地および改良牧草放牧地として管理された半自然草地で調査を行い, 長期的な放牧管理が SOC 蓄積量に与える影響を明らかにすることを目的とした。

本研究対象地において, ススキ野焼き放牧地の表層には炭が供給されており, 表層の TC は増加していたが, 表層から次表層にかけての TC, TN を減少させる傾向にあり, 特に改良牧草放牧地でその傾向が認められた。さらに, 両地点とも可給態 N 量が対照地よりも大きいことから, 放牧地の表層土壌は微生物活性が高く, 結果的に土壌有機物の分解が促進されたと考えられた。また, 牛による踏圧によって表層土壌の緻密度が大きくなり, 仮比重が大きい傾向にあった。土壌の圧縮は水の浸透を減少させ, 流出を増加させるため, 植物の生育に利用できる水を減少させる。さらに, 土壌の孔隙が少なくなることで空気の循環が制限されて根の成長が抑制され, 植物の生産を減少させることが報告されている [7] が, 本調査地においては BGBC 量および深さ 0 ~ 30 cm までの BGBC 量は放牧管理の有無で変化しなかった。しかし, BGBC 量の大部分を占めるススキの地下茎や牧草の根は, 対照区と比較して深さ 10 ~ 30 cm 付近においても発達していたことから, 主要な BGB が放牧地では下層あるいは下方向に発達することが示唆された。さらに, 改良牧草放牧地において SOC が C4 植物由来 C が占める割合が深さ 25 cm まで低い傾向にあったことから, 改良牧草放牧地では下層まで牧草由来の炭素が供給され, SOC として蓄積していることが示唆された。また, ススキは牧草と比較して BGBC 量が大きく, C/N 比が高いことから, ススキ野焼き放牧地と改

良牧草放牧地では土壤に供給される BGBC 量とその形質が大きく異なっていた。C/N 比が低い BGB は微生物代謝回転が速く、安定的な SOC として残ることから [14]、牧草の BGB はススキよりも速やかに代謝された後、分解されにくい SOC として存在する可能性が考えられた。しかし、ESM 法で算出した SOC 蓄積量は、ススキ野焼き放牧地の深さ 0～10 cm においては放牧影響が認められなかったが、0～30 cm の SOC 蓄積量は両地点とも減少傾向にあり、特に改良牧草放牧地で大きく減少していた。これらのことから、阿蘇外輪山東部における約 50 年間の放牧管理は表層土壤の有機物分解を促進し、SOC 蓄積量を減少させる傾向にあった。しかし、AGB が炭（難分解性炭素）として表層土壤へ供給され、かつ BGB 量が大きいススキ野焼き放牧地は、改良牧草放牧地よりも SOC 蓄積減少量が小さい傾向にあったことから、土壤への C 供給量が大きいことが SOC 蓄積量減少の抑制に繋がること示唆された。

謝辞

本研究は、令和 6 年度（2024 年度）「阿蘇」世界文化遺産登録推進若手研究の助成を受けたものであり、ここに謝意を表します。本研究を遂行するにあたり、東京農業大学の加藤拓教授、町田怜子教授、今井伸夫准教授、檜谷昂助教、茂木もも子准教授、下嶋聖准教授、山田晋教授には、多大なるご助力を賜りましたことを心から感謝申し上げます。また、東京農業大学土壤肥料学研究室の白井里奈氏、島本花歩氏、安生基倅氏、森林生態学研究室の坂上翼氏、山口澁太氏、農業環境科学研究室の田邊昂氏には調査や分析の際にご協力頂きました。なお、本研究は環境省阿蘇くじゅう国立公園管理事務所からの阿蘇くじゅう国立公園特別地域内工作物の新築及び土石の採取の許可（環九阿国許第 2305163 号、令和 5 年 5 月 16 日接受）を得て実施しております。環境省阿蘇くじゅう国立公園管理事務所、公益財団法人阿蘇グリーンストック、町古閑牧野組合の皆様には貴重な調査地をご提供いただきましたことを深く御礼申し上げます。

参考文献

- [1] 環境省九州地方環境事務所, 第三期阿蘇草原自然再生事業 野草地保全・再生事業実施計画, 2024.
- [2] Y. Toma, K. Armstrong, et al., Carbon sequestration in soil in a semi-natural *Miscanthus sinensis* grassland and *Cryptomeria japonica* forest plantation in Aso, Kumamoto, Japan, *GCB Bioenergy*, vol. 4, no. 5, pp. 566–575, 2012.
- [3] 和穎朗太, 陸域最大の炭素・窒素プールを制御する土壌微生物と土壌団粒構造, 土と微生物, Vol. 70 No. 1, pp.3-9, 2016.
- [4] 日本ペドロロジー学会 第五次土壌分類・命名委員会, Soil Classification System of Japan, 日本ペドロロジー学会, 2017.
- [5] 松浦庄司, 日本の草地の分布と土壌有機炭素量, 日草誌, Vol. 62 No. 1, pp.25-28, 2016.
- [6] J. D. Demer and G. E. Schuman, Carbon sequestration and rangelands: A synthesis of land management and precipitation effects, *Journal of Soil and Water Conservation*, Vol. 62 No. 2, pp.77-85, 2017.
- [7] G. Piñeiro, et al., Pathways of Grazing Effects on Soil Organic Carbon and Nitrogen, *Rangeland Ecology & Management*, Vol. 63, No.1, pp.109-119, 2010.
- [8] 滝下稔隆, 阿蘇大規模草地改良事業の問題点 (1) 行政上の問題点, 西日本畜産学会報, 11 巻, p.1-6, 1968.
- [9] 日本ペドロロジー学会編, 土壌調査ハンドブック改訂新版, 博友社, 2021.
- [10] 日本土壌協会, 土壌機能モニタリング調査のための土壌、水質及び植物体分析法, 2001
- [11] 土壌環境分析法編集委員会, 土壌環境分析法, 博友社, 1997.
- [12] Y. Peng, I. Chahal, et al., Comparison of equivalent soil mass approaches to estimate soil organic carbon stocks under long-term tillage, *Soil & Tillage Research*, Vol. 238, 2024.
- [13] 石塚成宏ら, 黒色土および褐色森林土腐植の安定同位体分析による給源植物の推定—

八甲田山南山麓における事例一, 第四紀, Vol. 38 No. 2, pp.85-92, 1999.

- [14] Y. Xu, X. Duan, et al., The efficiency and stability of soil organic carbon sequestration by perennial energy crops cultivation on marginal land depended on root traits, Soil & Tillage Research, Vol. 235, 2024.

阿蘇地域の半自然草原における管理形態の変化による植生動態

～放牧再開から放牧および野焼き停止後～

高岸 慧

はじめに

九州中央部に位置する阿蘇地域には、世界でも有数の規模を持つカルデラ地帯が存在する。そのカルデラ周縁に連なる外輪山周辺域には、国内最大の草原（半自然草原）が広がっている。阿蘇地域の半自然草原は、1 万年以上の歴史をもつとされ¹¹⁾、野焼き、家畜の放牧、採草などによる人々の文化的活動の中で維持されてきた。この阿蘇地域の半自然草原には、約 600 種の植物種が生育すると言われ、その植物相は氷河期に中国大陸から朝鮮半島を經由して日本列島に分布を広げ、現在隔離的に分布する大陸系遺存種を多く有すると考えられている^{10,15)}。阿蘇地域の半自然草原は自然と人の調和により生物多様性が創出・維持され、草原の景観および生態系は地球における極めて重要な財産である。しかし、近年農業従事者の高齢化や担い手不足、野焼き作業中の延焼事故により、草原管理の放棄が進行している。その結果、草原の生態系の劣化や面積の急速な減少により多くの植物が絶滅の危機に瀕している。このような状況下で、阿蘇地域において半自然草原の生態系の維持・復元を進めるためには、放牧や野焼きが草原の生態系に及ぼす影響などの基礎的な情報が必要である。

これまでの草原における放牧が植生に及ぼす影響は、適切な放牧は草原に生育する植物種の均等性を高めること^{1,13)}、湿潤な環境で種数が増加し、乾燥した環境では種数を減少させることが報告されている²⁾。また野焼きの停止は、植物の地上部残存量の増加や植物残渣の蓄積により草本植物種数を減少させること^{17,18)}、木本種の増加による草原性植物種の減少が報告されている¹⁶⁾。さらに半自然草原における植物種多様性は様々な斜面方位や傾斜角度によって生じる環境勾配に応じて変動することが報告されている^{3,7,14)}。このように半自然草原における知見は蓄積されつつあるが、これらの研究事例の多くは条件の異なる地点間の比較を行っており、同一の調査地における植生の変化を観察した研究は少ない。しかし管理形態の変更による植生の詳細な変化を明らかにするためには同一地点での継続的な観察は必要不

可欠である。そのため本研究では同一の調査地において放牧再開後からの3年間および放牧・野焼きの停止が草原の植物種多様性に及ぼす影響と斜面の方位と地形との関係を明らかにすることを目的とした。

第1章 調査地および方法

調査地概要

調査地は熊本県高森町の阿蘇外輪山南東部に位置する小倉原牧野内の半自然草原で、標高約850 m、面積約0.8 ha、南向き斜面と北向き斜面および谷部が発達する。調査地はススキが優占し、大陸系遺存植物で国および熊本県から絶滅危惧種に指定されているマツモトセンノウが自生する^{6,8,10}。調査地における野焼きは、2021年まで毎年3月上旬に実施されていたが、2022年に調査区外の野焼き作業中に延焼事故が発生したため、調査地での野焼きが中止され、それ以降2025年現在まで野焼きは行われていない。放牧は1997年まで実施されていたが、その後2017年まで停止、2018年に小倉原牧野の組合長である安片英人氏がマツモトセンノウの保全を目的として放牧が再開し、2020年まで継続して行われた。しかし2021年に再び放牧が停止した。

調査区画と内容

試験区は放牧が実施された半自然草原の南向き斜面頂部から谷部、北向き斜面頂部にかけて全長86 mの直線上に2 m × 2 mの方形区を2 m間隔で設置した(計22区画)。これらの方形区を用いて放牧の再開から停止、野焼きの停止による植生動態を調査した。植生調査は、2018年から2022年および2024年の夏期に計6回実施し、出現種ごとの最大葉高と植被率(%)を記録した。また調査区の詳細な地勢を明らかにするためにレーザー距離計(Impulse200 Laser Technology inc.)を用いて測量を行った。各方形区の表層土壌水分変動を明らかにするため、地表10 cm深の体積含水率を各区画5地点で測定した。測定にはADR土壌水分測定器(SM150T Delta-T Devices Ltd.)を用いた。放牧は赤毛和種の繁殖雌牛2頭から6頭を用い、2018年は5月から6月および8月から10月の2回、2019年は5月から6月および9月から10月の2回、2020年は8月および9月の2回が行われた。放

牧強度の目安である放牧のべ頭数¹⁷⁾は、2018年で259頭・日(207頭・日)/ha、2019年で300頭・日(240頭・日)/ha、2020年で80頭・日(64頭・日)/haであった。

解析方法

調査区に観察されたすべての種において1年草、多年草、木本の3つの生活型に分類し各年の比較を行った。南向き斜面頂部から谷部、北向き斜面頂部にかけて設置した22区画・6回の植生結果を用いて非計量多次元尺度法(Non-metric MultiDimensional Scaling; NMDSと略記)による序列化を行い種組成の変動を明らかにした。各出現種の在不在データを用い、非類似度はBray-Curtis指数を使用し、座標軸の数は2つとした。NMDSから種組成に対して植生が成立する斜面の方位と地形に関係が確認され、各群落間において総出現種数を比較するためにレアファクション法⁴⁾によるサンプルサイズの補正を行った。草原における優占種の変動を明らかにするため、22区画において植生調査を6回行うことで得た計132の植生結果の内、66回以上記録された種において植被率(%)と最大葉高(cm)を乗じた乗算優占度を算出した。体積含水率は調査日とその直前の降雨の影響を強く受けるため、立地間で顕著な差が観察された2020年の調査結果を用いてTukey's HSDによる多重比較検定を行った。NMDSおよびレアファクション法の解析にはPC-ORD Ver. 7.08を用いた⁹⁾。

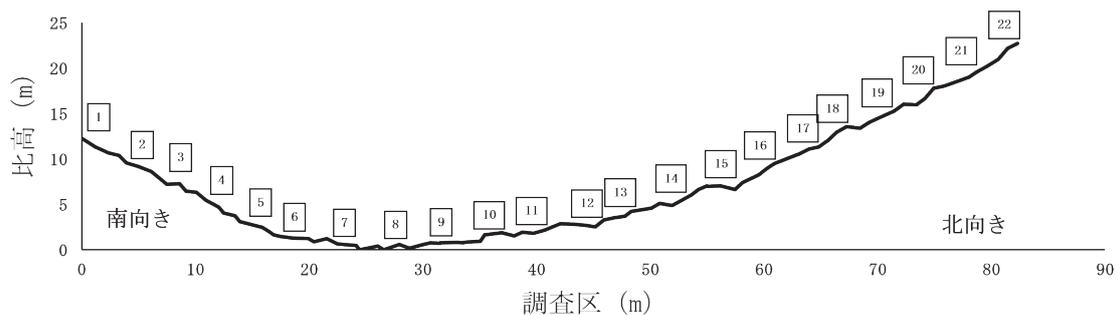


図 1. 南向き斜面頂部から北向き斜面頂部にかけて設置した調査区の地勢と区画番号

第 2 章 結果

調査地の斜面地に設置した調査区の地勢

南向き斜面頂部から谷部、北向き斜面頂部にかけて設置した区画とその地勢を図 1 に示す。

配置した区画間の最大比高差は約 22 m であった。

調査地の斜面地に成立する植物群落

NMDS による序列化の結果を図 2 に示す。南向き斜面頂部から谷部、北向き斜面頂部にかけて設置した 22 区画・6 回の植生結果は、第 1 軸および第 2 軸に沿って、区画 1 から 8 の南向き斜面および谷部周縁（以下、南向き斜面）、区画 9 から 12 の谷部、区画 13 から 16 の北向き斜面下部、区画 17 から 22 の北向き斜面上部に区分された（図 1）。

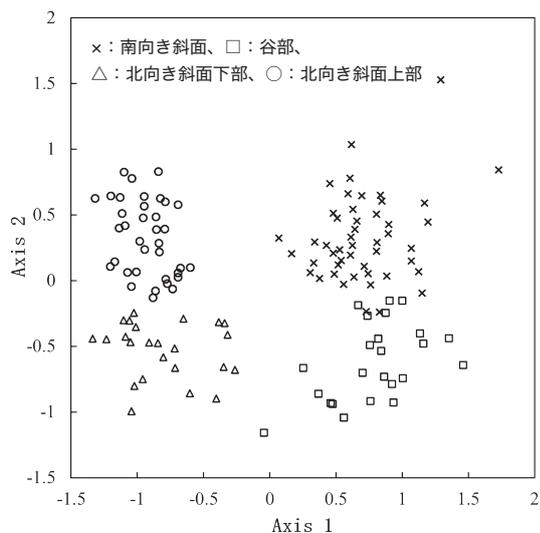


図 2. NMDS により二次元平面上に配置された調査区の植生

草原の総出現種数と生活型組成の年変動

南向き斜面頂部から谷部、北向き斜面頂部に設置した 22 区画（88 m²）における総出現種数と生活型組成の年変動の結果を図

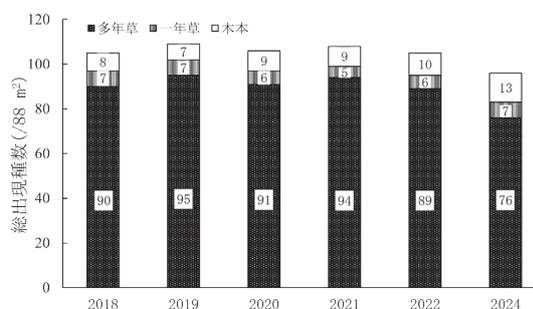


図 3. 草原における総出現種数と生活型組成の年変動

3 に示す。総出現種数は、放牧が再開された 2018 年から継続 3 年目の 2020 年で 105 種から 109 種、放牧が停止した 2021 年で 108 種、放牧停止 2 年目および野焼きが停止した 2022 年で 105 種、放牧停止 4 年目および野焼き停止 3 年目の 2024 年で 96 種が観察された。多年草の総出現種数は、2018 年から 2021 年で 90 種から 95 種であったが、2022 年以降は種数が減少し 2024 年で 76 種と最も低い値を示した。また木本の総出現種数は 2018 年から 2021 年で 7 種から 9 種であったが 2022 年以降は種数が増加し 2024 年で 13 種と最も高い値を示した。1 年草の総出現種数は 2018 年から 2024 年で 5 から 7 種であった。

NMDS により区分された植物群落の植生

計 132 の植生結果の内、66 回以上記録された種の植物群落における乗算優占度の年変動

表 1. 各植物群落における植物種の乗算優占度の年変動 (66 回以上出現した種)

種名	南向き斜面					谷部					北向き斜面下部					北向き斜面上部									
	2018	2019	2020	2021	2022	2024	2018	2019	2020	2021	2022	2024	2018	2019	2020	2021	2022	2024	2018	2019	2020	2021	2022	2024	
スギナ	68	243	212	35	22	4	125	606	199	24	19	16	18	179	73	28	10	2	30	159	100	19	29	29	6
ゼンマイ	0	0	0	0	0	0	69	138	70	59	53	26	1193	440	768	815	500	450	916	722	1363	1027	701	554	
イヌコラビ	64	33	29	45	19	14	4	1	3	2	9	2	11	10	11	33	8	19	29	40	76	40	29	59	
ヤマノイモ	192	130	61	282	35	427	47	51	55	29	14	216	18	13	14	9	5	18	0	0	0	0	0	0	
ヤマホトトギス	33	10	27	16	12	27	11	2	14	6	9	11	16	14	36	39	33	43	13	25	49	78	55	48	
ノカリケヌ	198	210	124	435	342	745	50	45	50	90	158	373	75	73	78	593	344	529	53	118	142	450	844	740	
ススキ	12113	7900	8134	11000	14956	18963	7600	4938	5138	11685	15300	18863	7425	4663	2904	6688	9275	15869	11050	5225	6117	7075	7550	12567	
クマノアジガタ	8	19	7	16	4	1	6	30	32	7	6	2	29	18	21	10	4	2	10	8	13	8	1	0	
ヤブヤメ	104	14	32	93	12	22	58	33	21	136	38	31	76	40	19	167	41	13	23	19	24	162	28	35	
ヌスビトハギ	46	11	19	36	11	13	0	6	7	6	5	16	49	50	84	82	48	80	62	29	39	110	58	104	
クサフジ	1301	72	468	2744	2803	762	563	40	1000	3225	1000	150	46	37	133	920	1561	986	1585	104	283	1594	2510	1907	
キジムシロ	17	11	8	24	4	1	3	9	16	7	2	0	2	3	24	17	6	5	0	1	9	19	8	3	
ミツバツチグサ	4	6	18	11	7	3	3	12	6	6	6	1	3	22	25	24	13	6	7	2	10	18	6	12	
ナツシロイチゴ	16	4	29	32	7	42	0	3	18	2	1	1	6	16	91	116	75	235	18	31	105	152	126	149	
ツボスミレ	5	3	19	12	7	1	4	4	7	5	4	1	1	0	3	3	1	0	1	1	2	1	1	0	
ヤマハツカ	175	88	50	66	28	32	0	9	19	4	0	0	11	4	0	11	5	13	67	30	48	61	29	40	
クシヨウヨモギ	809	312	467	574	155	357	227	544	210	182	14	247	25	62	60	10	28	58	13	8	41	38	68	70	
ヒロハヤモヨモギ	128	12	13	19	17	53	21	376	414	470	126	140	86	358	644	842	630	366	160	194	508	713	371	351	
オオユウダギク	39	164	43	59	15	49	92	107	316	745	216	184	77	73	160	240	20	22	39	31	26	50	10	8	
ヤブヤブミ	685	339	880	909	866	712	2348	613	1483	2178	2230	1509	1100	93	614	701	600	706	208	390	694	1358	675	1223	
シソウド	1556	2503	2413	2463	1250	1038	1625	1308	1630	945	953	1110	978	878	1345	1446	643	1054	708	866	737	1021	780	687	

を表1に示す。ススキやスギナ、クサフジなどの種は全ての群落と年で生育が確認された。一方でゼンマイは南向き斜面で、ヤマノイモは北向き斜面上部では生育が観察されなかった。

NMDSにより区分された植物群落の総出現種数

NMDSにより4区分された植物群落（16 m²）における総出現種数の年変動を図4に示す。同年における出現種数はすべての年で北向き斜面下部および上部が南向き斜面および谷部と比較して多かった。また各植物群落における総出現種数の年変動は、放牧が再開された2018年から放牧継続3年目の2020年にかけて北向き斜面下部および上部で約10種、谷部において8種が増加した。一方、南向き斜面の総出現種数は約1種が減少した。放牧が停止した2021年における出現種数は、前年と比較して南向き斜面および北向き斜面上部で約5種、谷部において3種が増加した。一方、北向き斜面の総出現種数は3種減少した。野焼き停止後の総出現種数は4植物群落で減少し、2024年に最も低い値が観察された。

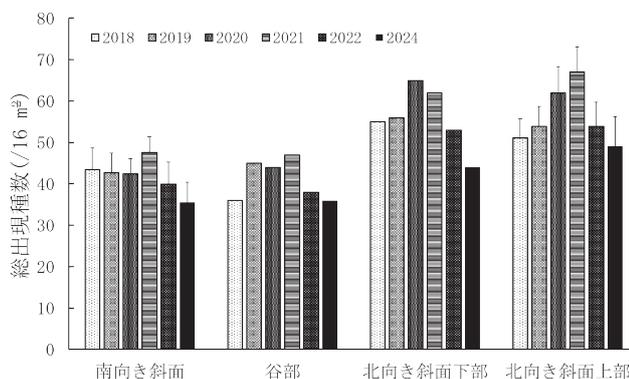


図4. 各植生群落区分における総出現種数の年変動エラーバーは標準偏差を示す。

NMDSにより区分された植物群落の平均出現種数

NMDSにより4区分された植物群落における各区画（4 m²）の平均出現種数の結果を図5に示す。区画あたりの平均出現種数は、放牧が再開された2018年から放牧継続3年目の2020年にかけて南向き斜面で約2種、谷部で約4種、北向き斜面下部で約12種、北向き斜面上部で約8種が増加した。放牧が停止した2021年における平均

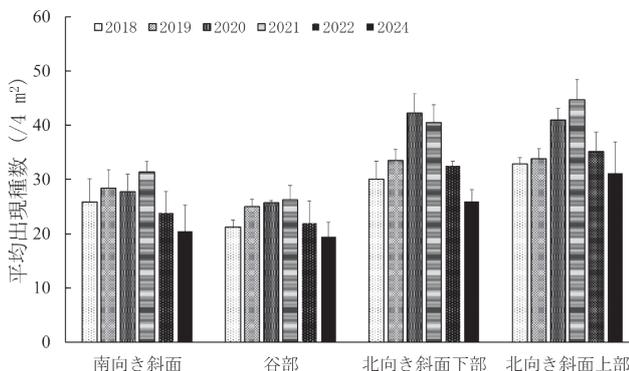


図5. 各植生群落区分における平均出現種数の年変動エラーバーは標準偏差を示す。

出現種数は、前年と比較して南向き斜面で約3種、北向き斜面上部は約4種が増加した。一方、北向き斜面下部では約2種が減少し、谷部はわずかに増加した。野焼き停止後の平均出現種数は4植物群落で減少し、2021年と比較して2024年の南向き斜面で約11種、谷部で約7種、北向き斜面下部で約15種、北向き斜面上部で約13種が減少した。

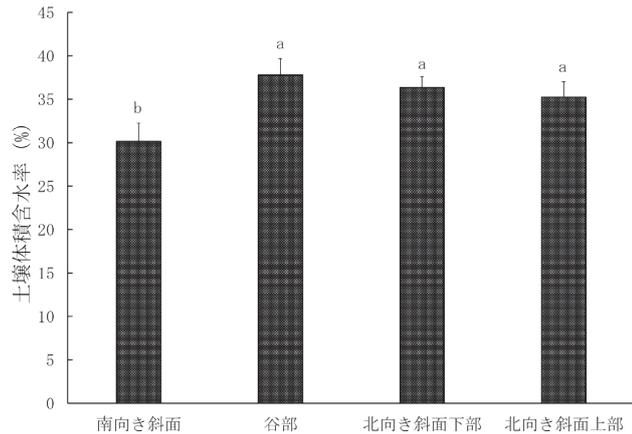


図6. 各植生群落区分における土壌水分率
エラーバーは標準偏差、異なるアルファベットは有意差が認められたことを示す。

NMDSにより区分された植物群落の水分環境

NMDSにより4区分された各植物群落における平均土壌含水率の結果を図6に示す。土壌含水率は、南向き斜面で30.1%、谷部で37.8%、北向き斜面下部で36.4%、北向き斜面上部で35.2%であり、南向き斜面は谷部、北向き斜面下部、北向き斜面上部間で有意な差が認められた($p < 0.05$)。一方、他の植物群落間で有意な差は認められなかった($p > 0.05$)。

第3章 考察

斜面方位と水分環境による植物種多様性の変動

南向き斜面頂部から谷部、北向き斜面頂部における6年間の植生結果は南向き斜面、谷部、北向き斜面下部および上部の4群落に区分された(図1、2)。このことから放牧利用の継続や停止、野焼きの停止の管理形態の変化は各斜面の方位と地形に応じて成立する特徴的な種組成に影響を及ぼさないことが明らかとなった。

4区分された植物群落では北向き斜面下部および上部が植物種数に富んだ立地であった(図4)。また水分環境は、南向き斜面と比較して谷部、北向き斜面下部および上部で湿潤であった(図6)。半自然草原における植物群落は斜面方位や傾斜角度により異なる水分や光環境が生じ、湿潤な環境や良好な光環境下で出現種数が増加することが報告されている^{3,7,14}。この

ことから南向き斜面と北向き斜面間における出現種数の相違は、本研究で確認された斜面方位により生じる水分環境や光環境の差異に応じた植物種のすみわけが要因であると考えられる。阿蘇山の半自然草原においても本研究と同様に北向き斜面は植物種数を増加させることが報告されている⁷⁾。このことから起伏に富み多様な方位の斜面を有する阿蘇地域の半自然草原において北向き斜面が植物種多様性に重要な立地であることが考えられる。しかし、阿蘇地域における斜面方位と植物種多様性の関係における研究事例が少ないため、さらなる検討を進めることは的確に保全活動を進めるために必要である。

各植物群落における放牧の影響

放牧期間中における南向き斜面頂部から谷部、北向き斜面頂部にかけて設置した22区画(88 m²)の総出現種数は、最大で4種の増加が観察された(図3)。またNMDSによって区分された4植物群落(16 m²)の総出現種数は南向き斜面で約1種が減少し、谷部および北向き斜面で9種以上が増加した(図4)。各区画(4 m²)における平均出現種数は南向き斜面で2.5種、谷部で4.5種、北向き斜面下部で12.3種、北向き斜面上部で8.2種が増加した。(図5)。草原において適切な放牧圧は、生育する植物種の均等性を高め多様性に正の影響を及ぼすこと報告されている^{1,13)}。そのため放牧は草原における総出現種数(88 m²)よりも小規模の面積(4 m²)あたりの出現種数を増加させる。谷部および北向き斜面における種数の増加はこのことを支持する結果であったが、南向き斜面では異なった。放牧は植生が成立する立地の水分環境により植物種多様性に異なる影響を及ぼし、湿潤な立地において種数を増加させるが乾燥した立地では種数を減少させることが報告されている²⁾。調査地における南向き斜面は谷部、北向き斜面と比較して乾燥した立地であった(図6)。このことから南向き斜面においての増加がわずかであったことは、周辺の群落から加わることができる種が水分環境により限定された結果であると考えられる。谷分の水分環境は北向き斜面と同等であったが増加した種数は少なかった。半自然草原の傾斜地に放牧された牛群は、緩傾斜地や平坦地を休息場所として利用し、このような立地において牛の排糞量が多くなることが報告されている^{5,12)}。調査地における放牧中の観察からも放牧中の牛は緩傾斜地の谷部を休息場所として利用し、踏圧による植生の倒伏が顕著であった。これらのことから半自然草原における

放牧は、斜面方位によって生じる水分環境の勾配と斜面角度に応じた牛の行動により、植物群落の多様性に異なる影響を及ぼすことが考えられる。

4 植物群落における放牧が停止した 2021 年の総出現種数と平均出現種数は、前年と比較して南向き斜面、谷部、北向き斜面上部で増加、北向き斜面下部で減少が観察された。この要因として放牧圧に脆弱な種が放生の停止により生育が拡大した結果であると考えられる。

野焼きの停止が草原の植物種多様性に及ぼす影響

草原における総出現種数は、野焼きが継続されていた 2021 年と比較して停止 1 年目で 3 種、停止 3 年目で 12 種減少し、木本植物の種数は野焼き停止後に増加した (図 3)。また 4 植物群落においても総出現種数および平均出現種数は野焼き停止後に低下した (図 4、5)。阿蘇地域および国内における野焼きが停止した半自然草原では、植物の地上部残存量の増加や植物残渣の蓄積による地表面の光環境の悪化が低茎草本の生育や種子発芽と実生個体の定着を抑制し、草本植物種数を減少させることが報告されている^{17,18)}。また野焼き停止後の草原は木本種の増加に伴い、草原性植物が減少することが報告されている¹⁶⁾。これらのことから野焼きが停止した本調査地の半自然草原は、今後さらに植生遷移が進行することで多くの草原性植物が消失することが推察される。そのため野焼きの継続は阿蘇地域の半自然草原における植物種多様性の保全に極めて重要である。

おわりに

阿蘇地域のかつて放牧利用されていた半自然草原において管理形態の変化および地勢が植生に及ぼす影響を明らかにした。調査地の南向き斜面頂部から、谷部、北向き斜面頂部にかけて成立する植生は、NMDS 解析により 4 つの植物群落に区分され、斜面の方位と地形が対応していた。この植物群落は、放牧や野焼きなどの管理形態の変化による影響を受けたが、特徴的な種組成を変化させなかった。放牧の継続による種数の増加は谷部と比較して北向き斜面で顕著に示された。これに対し、南向き斜面ではわずかであるが植物群落の総出現種数が減少し、異なる斜面方位に成立する植物群落では放牧が及ぼす影響に違いが確認された。これらのことは北向き斜面と比較して南向き斜面の水分環境が乾燥していること、地形の傾

斜角度が緩やかな立地において牛の踏圧や排糞量が増加することが要因と考えられる。斜面方位と放牧の関係について検討を進めることは、阿蘇地域の半自然草原の保全管理における適切な選定の指針を示すために重要である。野焼きの停止後3年目の草原における植物の生活型組成は、野焼き停止前と比較して多年草種が減少し木本種が増加した。今後、野焼きが再開されない場合は森林に向けて遷移が進行し、草原性植物種の消失が進むと考えられる。そのため阿蘇地域の半自然草原の保全には野焼きの継続がきわめて重要である。

引用文献

- [1] Bakker J P (1998) The impact of grazing to plant communities. WallisDeVries M F, Bakker J P, Van Wieren S E (eds), *Grazing and Conservation Management*. Kluwer, Dordrecht, The Netherland.
- [2] Fujita N, Amartuvshin N, Yamada Y, Matsui K, Sakai S, Yamamura N (2009) Positive and negative effects of livestock grazing on plant diversity of Mongolian nomadic pasturelands along a slope with soil moisture gradient. *Grassland science*, 55: 126-134.
- [3] Gong X, Brueck H, Giese K M, Zhang L, Sattelmacher B, Lin S (2008) Slope aspect has effects on productivity and species composition of hilly grassland in the Xilin River Basin, Inner Mongolia, China. *Journal of arid environments*, 72: 483-493.
- [4] Gotelli N, Colwell R K (2001) Quantifying biodiversity: Procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness. *Ecology Letters*, 4: 379-391.
- [5] 井出保行 (2003) 山地傾斜地における放牧草地植生の時間的・空間的变化 (<特集> 草地植生の時空解析). *日本草地学会誌*, 49: 286-292.
- [6] 環境省. “環境省レッドリスト 2020 の公表について”. 環境省ホームページ. <https://www.env.go.jp/press/107905.html> (参照: 2024年1月17日).
- [7] Koyama A, Koyanagi T F, Akasaka M, Takada M, Okabe K (2017) Combined burning and mowing for restoration of abandoned semi - natural grasslands.

Applied Vegetation Science, 20: 40-49.

- [8] 熊本県．“レッドリストくまもと 2024 - 熊本県の絶滅のおそれのある野生動植物 - の公表”. 熊本県ホームページ . <https://www.pref.kumamoto.jp/soshiki/52/2540.html> (参照 : 2024 年 1 月 17 日).
- [9] McCune B, Mefford M J (1999) PC-ORD multivariate analysis of ecological data. Version 5.0. MjM software. Glenden Beach, Oregon.
- [10] 南谷忠志 (2015) 阿蘇地域における植物相の特徴 (日本植物分類学会第 13 回大会 (熊本) 公開シンポジウム講演記録「阿蘇の草原フロラを探る ~ 成立過程・大陸遺存種・草原再生 ~」). 分類, 15: 1-10.
- [11] 宮縁育夫, 杉山真二 (2006) 阿蘇カルデラ東方域のテフラ累層における最近約 3 万年間の植物珪酸体分析 . 第四紀研究, 45: 15-28.
- [12] 及川棟雄 (1981) 傾斜地における家畜行動と草地管理 (2): 牛道の幅, 深さ, 数と長さ及び発生場所 . 草地試研所研究報告, 20: 190 - 215.
- [13] Pykälä J (2003) Effects of restoration with cattle grazing on plant species composition and richness of semi-natural grasslands. Biodiversity & Conservation, 12: 2211-2226.
- [14] Pykälä J, Luoto M, Heikkinen R K, Kontula T (2005) Plant species richness and persistence of rare plants in abandoned semi-natural grasslands in northern Europe. Basic and applied ecology, 6: 25-33.
- [15] 瀬井純雄, 高沢智嗣, 藤井紀行 (2015) 阿蘇における草原植物の現状と草原再生 (日本植物分類学会第 13 回大会 (熊本) 公開シンポジウム講演記録「阿蘇の草原フロラを探る ~ 成立過程・大陸遺存種・草原再生 ~」). 分類, 15: 21-27.
- [16] Shoji A (2014) Cessation effects of grazing and burning on species composition in humid temperate semi - natural grasslands through environmental modifications. Grassland science, 60: 15-23.
- [17] 高橋佳孝, 井上雅仁, 堤道生 (2014) 三瓶山の火入れ管理下にあるススキ (*Miscanthus sinensis* Anderss.) 草地の植生に及ぼす放牧の影響 . 日本草地学会誌, 60: 102-108.

- [18] 1 山本嘉人, 進藤和政, 萩野耕司, 平野清, 中西雄二, 大滝典雄 (2002) 阿蘇地域の半
自然草地における火入れ中止にともなう植生の変化. 日本草地学会誌, 48: 416-420.

背景

熊本系褐毛和種は主に阿蘇地方や北海道において飼養されている、全国第2位の飼育頭数を誇る和牛だ。この品種は、黒毛和種など他の品種に比べて増体や飼料効率、耐寒性・耐暑性に優れており放牧に適した特性を備えている。また、枝肉は脂肪交雑の少ない赤身肉であり、脂肪交雑の少なさが長年にわたり課題とされてきた¹(Sumio, 2007)。外観は名前の通りに鼻から爪先に至るまで全身褐色の毛色が特徴的である。しかしながら、まれに毛色が淡色化した個体が生まれてくることがあり、我が東海大学における先行研究で、この淡色化の原因が *PMEL* (*premelanosome protein*) 遺伝子の変異であることを明らかにした²(Kimuraら 2022)。

熊本系褐毛和種の毛色は褐色であるが、これは皮膚に存在するメラノサイト（色素細胞）が褐色のメラニンであるフェオメラニンを生産しているからである。メラニンは黒色のユーメラニンと褐色のフェオメラニンに大別され、ASIP (agouti signaling protein)、 α MSH (α -melanocyte stimulating hormone)、MC1R (melanocortin-1 receptor) の相互作用によって生産されるメラニンの種類が決定する。ASIP の非存在下では、メラノサイトで発現する MC1R が α MSH と結合することで cAMP を合成し、細胞内に蓄積させる。細胞内の cAMP 濃度が上昇することで TYR (tyrosinase) とその下流の酵素反応は活性化され、ユーメラニンが産生される。ASIP 存在下では α MSH と MC1R の結合が阻害され、ASIP が MC1R と結合することによりユーメラニン合成が抑制され、フェオメラニンのみが産生される³ (Barshら 1996)。とくに熊本系褐毛和種の全身褐色の毛色は *MC1R* の変異が引き金となっている。MC1R がウシの毛色に影響することは古くから知られており、 E^D 型、 E^+ 型および e 型と呼ばれる対立遺伝子が同定されている。野生型の *MC1R* である E^+ 型に対し、 ED 型は顕性対立遺伝子であり、毛色の黒色化を引き起こす。一方、 e 型はフレームシフト突然変異により早期に停止コドンを生じさせる潜性対立遺伝子であり、ホモ接合体 (e/e)

の個体では毛色の表現型が赤褐色である⁴ (Klungland ら 1995)。熊本系褐毛和種ではほとんどの個体で MC1R の遺伝子型は e/e であり、この MC1R の遺伝子型により品種特性が維持されている⁵ (Matsumoto ら 2020)。

メラノサイトで産生されたメラニン、メラノソームと呼ばれる細胞内小器官に貯蔵される。メラノソームはメラニン合成の場でもあり、TYR 等のメラニン合成酵素がメラノソーム内に輸送されることで、メラノサイトにおけるメラニンの生産と貯蔵が可能になる。

PMEL はこのメラノソームを構成する分子であり、メラノサイトで発現した *PMEL* タンパク質は集結し、膜構造を形成することでメラノソームへと成長する⁶ (Watt ら 2013)。

このように、*PMEL* はメラノサイトで特異的に機能する遺伝子と考えられてきたが、ウシでは 骨格筋や脂肪組織、などの組織においても *PMEL* の発現が確認されており⁷ (Kuehn ら 2007)、*PMEL* がメラニン合成以外の何らかの機能を持つことが示唆されている。

実際 *PMEL* は毛色以外の表現型にも関与しており、近年 *PMEL* 多型とウシの誕生時体重との関連が報告された⁸ (Wang ら 2023)。我々は、*PMEL* 遺伝子の 18 番目のロイシンが欠失する *PMEL* p.L18del が熊本系褐毛和種の毛色を淡色化していることを同定した。さらに、*PMEL* p.L18del の枝肉形質への効果を確認した結果、Leu/del 型の個体は Leu/Leu 型の個体に比べ BMS (beef marbling standard)、肉の光沢、肉の締まり、肉のキメに優れることが明らかになった⁹ (Yamashita ら, 2024)。しかしながら、色素細胞で主に機能する遺伝子の多型がなぜ肉質に効果を持つのかは不明である。

そこで、本研究では、*PMEL* の発現が骨格筋や脂肪組織においても報告されていることから、p.L18del が複数の組織に影響を与えている可能性を考慮し、毛色に加えて肉質に関わる表現型である骨格筋、白色脂肪組織および褐色脂肪組織に関連する遺伝子の発現を調査した。

材料方法

1. 供試動物

本研究では東海大学阿蘇実習フィールドにて放牧されている褐毛和種 3 頭 (通常色個体)、阿蘇のあか牛・草原プロジェクトにて飼養管理されている褐毛和種 3 頭 (淡色化個体) を解析対象とした。通常色個体の雌 3 頭 (43、54、92 ヶ月齢) と淡色化個体の雌 3 頭 (69、

77、90 ヶ月齢) より毛根を採取し、RNA を抽出、cDNA に逆転写を行い、qRT-PCR のサンプルとした (図 1)。動物の取り扱いについては東海大学の動物実験委員会より承認を受けた (承認番号 231043)。

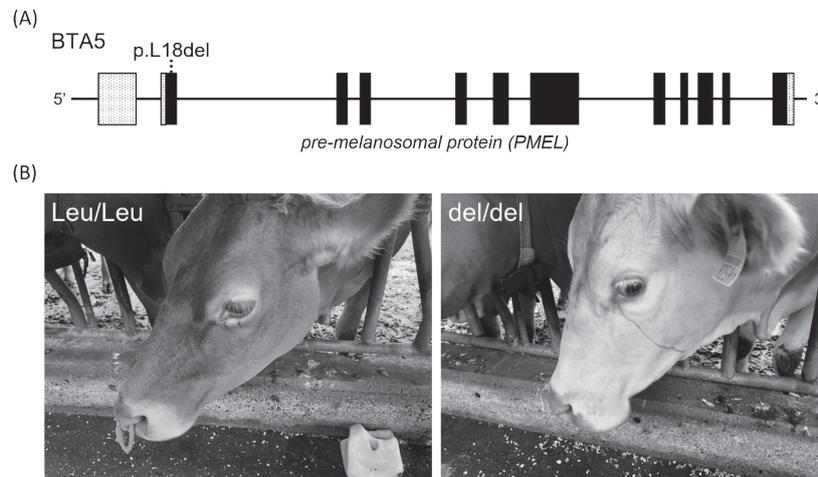


図 1. *PMEL* p.L18del による熊本系褐毛和種の淡色化

(A) ウシ *PMEL* 遺伝子は第 5 番染色体に位置し、12 個のエクソンから構成される。p.L18del は第 2 エクソンに影響し、18 番目のアミノ酸であるロイシンを欠失させる多型である。白は非翻訳領域 (UTR: untranslated region)、黒はコーディング領域 (CDS: coding sequence) である。(B) p.L18del の遺伝子型が del/del 型の場合、熊本系褐毛和種の毛色は淡色化する (Kimura ら 2022)。この淡色化は Leu/del 型の個体でも認められるが、個体間で毛色のばらつきが見られる。

2. 調査する遺伝子の選択

淡色化個体 1 頭と通常色個体 1 頭を用いた RNA シーケンスにより得られた発現変動遺伝子のデータをもとに qRT-PCR による発現解析の対象とする遺伝子を選択した。毛色に関連する遺伝子では淡色化の原因遺伝子である *PMEL* (*premelanosome protein*) に加え *KIT* (*KIT proto-oncogene, receptor tyrosine kinase*)、*MC1R* (*melanocortin 1 receptor*)、*MITF* (*melanocyte inducing transcription factor*)、*TYR* (*tyrosinase*) の計 5 つの毛色に関わる主要な遺伝子を解析対象とした。肉質関連遺伝子では筋肉での発現量が肉質に影響すると報告されている *CRYAB* (*crystallin alpha B*)、*FOS* (*Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit*)、*HSPB1* (*heat shock protein family B (small) member 1*) そして *MEF2C* (*myocyte enhancer factor 2C*) の計 4 つの遺伝子を解析対象とした。白

色脂肪組織の関連遺伝子では発現の変化が白色脂肪組織の機能に影響を与えることが報告されている *GLUL* (*glutamate-ammonia ligase*)、*MED19* (*mediator complex subunit 19*)、*S1PR3* (*sphingosine-1-phosphate receptor 3*) そして *SELENBP1* (*selenium binding protein 1*) の計 4 つの遺伝子を解析対象とした。褐色脂肪組織の関連遺伝子では褐色脂肪組織での発現変動が褐色脂肪組織の熱産生機能に影響を与えることが報告されている *ELOVL3* (*ELOVL fatty acid elongase 3*)、*PPARGC1B* (*PPARG coactivator 1 beta*)、*SGPL1* (*sphingosine-1-phosphate lyase 1*) そして *SPHK1* (*sphingosine kinase 1*) の計 4 つの遺伝子を解析対象とした。

3. RNA 抽出および濃度測定

以下で使用する器具や試薬などは全て RNase 及び DNase Free のものを使用し、事前にクロロホルムや RNase Knockout (富士フィルム和光純薬株式会社, 大阪, 日本) を用いて RNase を不活化させる処理を行った。1.5 ml チューブに RNAlater™ Stabilization Solution (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) を 200 μ l 入れ、尾根部より採取した 50 本程度の毛を毛根から採れていることを確認した後、毛根部から 1 ~ 1.5 cm になるように切断して浸透させた。その後、ペンシルホモジナイザーを用いて 30 秒攪拌を行った。

RNA 抽出には ReliaPrep™ RNA Tissue Miniprep System (Promega, WI, USA) を用い、そのプロトコルに従った。毛根の入った 1.5 ml チューブを 15,000 \times g で 5 分間遠心し、細胞を沈殿させた。その上清を取り除き、LBA + TG Buffer を 250 μ l (LBA Buffer に 1 / 50 量の 1 - Thioglycerol (TG) を添加) 加え、ホモジナイザーで 30 秒間破碎し、ゲノム DNA のせん断のために 10 回程度ピペティングした。RNA Dilution Buffer を 250 μ l 加え、10 秒間ボルテックスした後、室温で 1 分間インキュベートした。15,000 \times g で 3 分間遠心し、沈殿形成の確認後、上清を新しい 1.5 ml チューブに移した。ここに 100 % イソプロパノールを 170 μ l 加え、5 秒間ボルテックスした。ミニカラムを Collection Tube にセットし、サンプルを加え、室温にて 15,000 \times g で 1 分間遠心した。Collection Tube に貯まった液を捨て、再度ミニカラムをセットし、RNA Wash Solution 500 μ l をミニカラムに入れ、15,000 \times g で 1 分間遠心した。DNase Incubation mix (1 サンプル当たり

Yellow Core Buffer 24 μ l, MnCl₂ 0.09 M 3 μ l, DNase I 3 μ l) 30 μ l をミニカラムに添加し、室温で 15 分間反応させた。反応後、Colum Wash Solution を 200 μ l をミニカラムに加え、15,000 \times g で 1 分間遠心した。RNA Wash Solution を 500 μ l ミニカラムに加え 15,000 \times g で 1 分間遠心した。Collection Tube に貯まった液を捨て、使用しているミニカラムをセットし RNA Wash Solution を 300 μ l カラムに加え 15,000 \times g で 2 分間遠心した。使用しているミニカラムを RNA 溶出用の Elution Tube にセットし、を 10 μ l ミニカラムに加え 15,000 \times g で 1 分間遠心した。この際に蓋同士が当たらないように外側に向けて遠心を行った。抽出した溶液をスクリーチューブに移し、-20 $^{\circ}$ C で保存した。抽出した RNA の濃度は、NanoDrop 2,000 (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。Nuclease - Free Water 1 μ l を用いて校正した後、同量の RNA 濃度を測定した。RNA の純度は A260 / A280 の数値を基準に判定し、2.0 を目安とし、1.8<2.0<2.1 の範囲内で精製された。

4. cDNA 合成

cDNA 合成には PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) (タカラバイオ株式会社, 滋賀, 日本) を用い、そのプロトコルに従った。5 \times gDNA Eraser Buffer 2.0 μ l、gDNA Eraser 1.0 μ l、total RNA、RNase Free dH₂O を Total 10.0 μ l となるように氷上で調製し、42 $^{\circ}$ C で 2 分インキュベートした。続いて反応液 10.0 μ l に対して 5 \times PrimeScript Buffer2 4.0 μ l、PrimeScript RT Enzyme Mix I 1.0 μ l、RT Primer Mix 1.0 μ l、RNase Free dH₂O 4.0 μ l を氷上で調製し攪拌して均一にした後 37 $^{\circ}$ C で 15 分インキュベートした。最後に 85 $^{\circ}$ C で 5 秒反応させて逆転写を行った。

5. qRT-PCR

qRT-PCR には TB Green® Premix Ex Taq II™ (タカラバイオ株式会社) を用い、そのプロトコルに従った。TB green Premix EX Taq II 5 μ l、Forward Primer (10 μ M) 0.4 μ l、Reverse Primer (10 μ M) 0.4 μ l、ROX Reference Dye (50 \times) 0.4 μ l、cDNA Template 1 μ l、滅菌精製水 3 μ l を氷上で調製し、StepOne リアルタイム PCR システム (Thermo Fisher Scientific) を用いて qRT-PCR を行った。PCR 反応は初期変性を 95 $^{\circ}$ C で

10 分間行った後、95 °Cによる変性を 15 秒、60 °Cによるアニーリングおよび伸長を 30 秒を 40 サイクル行った。本研究では一度の実験で 1 サンプルにつき 3 度の反復実験を行い、それらの平均値から相対発現量を算出した。各遺伝子の相対定量は $\Delta\Delta$ CT 法により行い、有意差の算出には一元配置分散分析を用いた。鋳型 cDNA として 1.5 ng/ μ l に希釈した cDNA を使用した。内在性コントロールには *GAPDH* を使用した。プライマーは Oligo7 (Molecular Biology Insights, CO, USA) を用いて設計した (表 1)。

表 1. プライマーデザイン

遺伝子名	プライマー	増幅産物長 (bp)
毛色関連遺伝子		
<i>KIT</i>	F: TTGTGCTGTGTCCAAAACCAGC R: CACCCTGATGCCAGCTATTCCTC	162
<i>MC1R</i>	F: CTGAGAGCAAGCACCCCTTC R: CAGCCACTACCAGCACGTTTC	221
<i>MITF</i>	F: TACAGGAAGTGAATGCAGGCTC R: GTCTGTGAGATCCAGGGTTGTTG	182
<i>PMEL</i>	F: ACTAGCTCATTCATGCCTACAGAAGG R: ATACAGAACAATCCAGGGGGG	114
<i>TYR</i>	F: TCTTCTCCTCTTGGCAGATCGT R: TCAGCAAATCCTTCCAGGGTATTC	243
肉質関連遺伝子		
<i>CRYAB</i>	F: AGCACTTCTCCCCAGAGGAA R: GAGATAAAACCATGTTTCCTGGC	97
<i>FOS</i>	F: AGGTAGAACAGTTGTCCCAGAAGA R: TCTTCTAGTTGGTCTGTCTCCGCTT	139
<i>HSPB1</i>	F: GAGATCACTGGCAAGCACGAG R: GGGGGGCAGCGTGATTTTC	84
<i>MEF2C</i>	F: GTGAGACGTTGAGAAAGAAGGGC R: GGGAGGTGGAACAGCACACAATC	165
白色脂肪組織関連遺伝子		
<i>GLUL</i>	F: GCCCAAGGTCCCTACTACTGT R: GGCATGACCTCGGCATTCTGTG	129
<i>MED19</i>	F: GAAGAACCGACACAGCCAGAG R: GAAAGCGAGCGGGTGGAG	218
<i>S1PR3</i>	F: CGAGAAGTACGAGGAGCC R: CGTGCAGGGTTTCGTGG	218
<i>SELENBP1</i>	F: CTCAAAGCTGCACAAGGTCGTT R: AACCCCTTTGCCATTGCC	144
褐色脂肪組織関連遺伝子		
<i>ELOVL3</i>	F: TACTGGACAACCTCATTGCCAT R: TGTCCGAAGATACTGAAGACTGC	150
<i>PPARGC1B</i>	F: ACGAGAAGCAAGAGAGGCGAG R: CGGTGCCATTCTCAGGG	84
<i>SGPL1</i>	F: ATACAGCTCGAAGGATGCTTTGTGG R: GCGAAATCTCCATAAGCCTTCACGA	108
<i>SPHK1</i>	F: ACGCTGATGCTCACTGCCG R: GCCCGTTCACCACCTCGT	141
<i>GAPDH</i>	F: ATCACCATCTTCCAGGAGCGA R: ACCCTTCAAGTGAGCCCCAG	123

結果

毛色に関連する遺伝子では淡色化個体において *KIT* ($p = 3.019e-05$)、*MITF* ($p = 3.526e-06$)、*TYR* ($p = 0.001014$) の発現が低下していた。しかしながら、淡色化の原因遺伝子である *PMEL* ($p = 0.3623$) と *MC1R* ($p = 0.3692$) の発現には変化が見られなかった (図 2)。

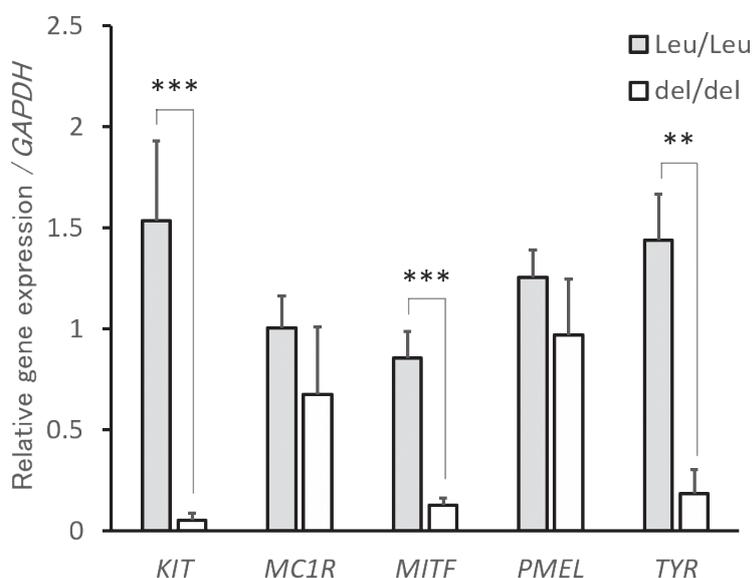


図 2. 毛色関連遺伝子における相対発現量比

qRT-PCRによる発現解析を行った結果淡色化個体では *KIT*、*MITF*、*TYR* の発現量が低下していた。一方、*PMEL*、*MC1R* においては有意な差が見られなかった。

グレーは通常色個体 (Leu/Leu)、ホワイトは淡色化個体 (del/del) の相対的発現量である。平均値 ± 標準誤差。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

肉質関連遺伝子では、淡色化個体において *CRYAB* ($p = 0.001212$), *HSPB1* ($p = 0.00161$) の発現が増加し、*MEF2C* ($p = 4.392e-05$) の発現が低下していた。しかしながら、*FOS* ($p = 0.1005$) においては有意な差が得られなかった (図 3)。

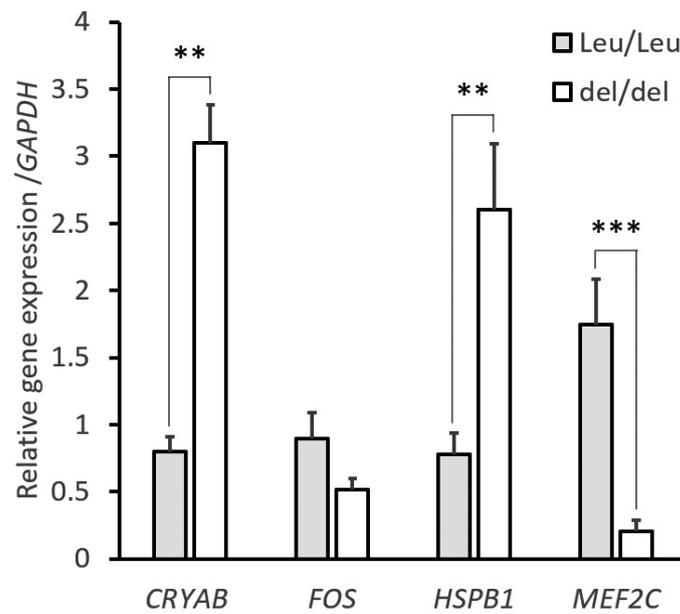


図 3. 肉質関連遺伝子における相対発現量比

qRT-PCR による発現解析を行った結果淡色化個体では *CRYAB*、*HSPB1*、*MEF2C* の発現量が変動していた。一方、*FOS* においては有意な差が見られなかった。

グレーは通常色個体 (Leu/Leu)、ホワイトは淡色化個体 (del/del) の相対的発現量である。平均値 ± 標準誤差。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

白色脂肪組織の関連遺伝子では、淡色化個体において *MED19* ($p = 2.621e-11$)、*S1PR3* ($p = 0.0009825$) の発現が低下し、*SELENBP1* ($p = 0.02645$) の発現が増加していた。また、白色脂肪組織の関連遺伝子では、*GLUL* ($p = 0.2818$) でのみ有意な差が得られなかった (図 4)。

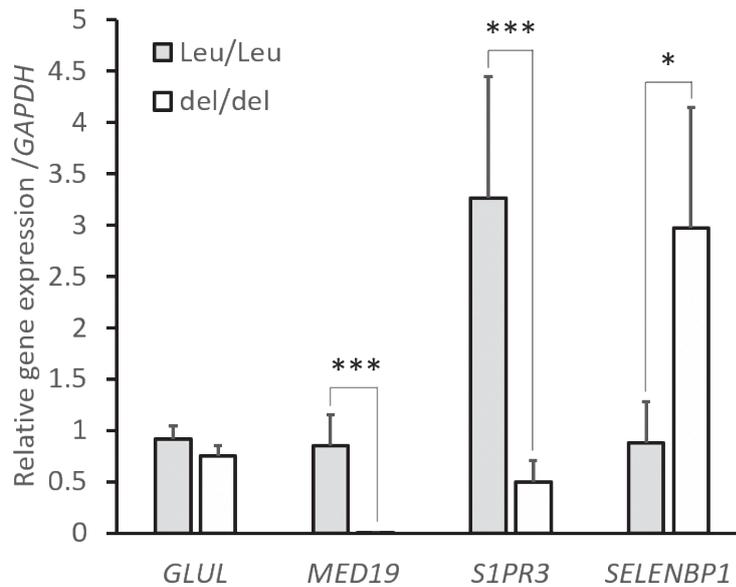


図 4. 白色脂肪組織関連遺伝子における相対発現量比

qRT-PCR による発現解析を行った結果淡色化個体では *MED19*、*S1PR3*、*SELENBP1* の発現量が変わ動していた。一方、*GLUL* においては有意な差が見られなかった。グレーは通常色個体 (Leu/Leu)、ホワイトは淡色化個体 (del/del) の相対的発現量である。平均値 ± 標準誤差。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

褐色脂肪組織の関連遺伝子では淡色化個体において *ELOVL3* ($p = 0.004869$)、*PGC1B* ($p = 4.906e-06$) の発現が低下していた。また、*SGPL1* ($p = 0.1365$)、*SPHK1* ($p = 0.3293$) においては2群間で有意な差は得られなかった (図5)。

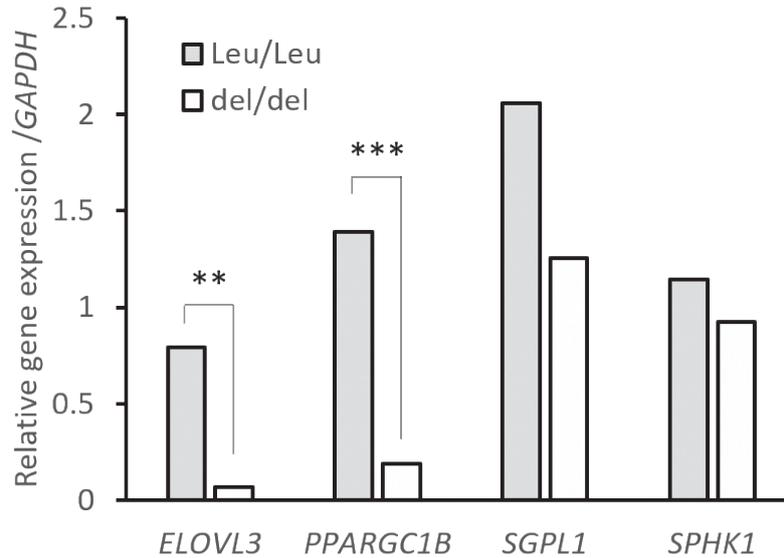


図5. 褐色脂肪組織関連遺伝子における相対発現量比

qRT-PCRによる発現解析を行った結果淡色化個体では *ELOVL3*、*PPARGC1B* の発現量が低下していた。一方、*SGPL1*、*SPHK1* においては有意な差が見られなかった。グレーは通常色個体 (Leu/Leu)、ホワイトは淡色化個体 (del/del) の相対的発現量である。平均値 ± 標準誤差。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

考察

本研究では通常色個体と淡色化個体の二群間において毛色、肉質、白色脂肪組織、褐色脂肪組織の機能に関連する遺伝子についての発現解析を行った。その結果通常色個体と淡色化個体で発現量が大きく異なる遺伝子が明らかとなった。

毛色に関連する遺伝子では淡色化個体において *KIT*、*MITF* そして *TYR* の発現量が低下していた。*KIT* 遺伝子は胚発生時における神経堤から皮膚へのメラノサイトの遊走を制御する遺伝子であり¹⁰ (Yoshidaら, 2001)、ウシやヤクにおける白斑の原因遺伝子であることが

告されている^{11,12} (Reinsch ら, 1999; Zhang ら, 2014)。MITF 遺伝子はメラノサイトの分化や増殖を支配する遺伝子であり、MAPK-ERK シグナル伝達経路 (図 6) において KIT の下流に位置している。さらに、MITF はメラニン合成の主要な酵素である TYR の活性を刺激し、メラノサイトの色素沈着を制御している¹³ (Mello ら, 2016)。また、KIT と同様にウシの白斑パターンに影響を与える量的遺伝子座であることが報告されている¹⁴ (Liu ら, 2009)。ラマの白毛色個体においては有毛色個体に比べて KIT および MITF の発現量が低下していることが報告されているが¹⁵ (Anello ら, 2019)、本研究においても淡色化個体で KIT、MITF の発現量が低下していた。このことから、淡色化個体では PMEL p.L18del に起因する KIT、MITF の発現量低下による TYR の発現低下が色素生産を低下させていると考えられる。また、二群間において淡色化の原因遺伝子である PMEL の発現に差がないことから、PMEL の発現は正常に行われているが、その機能や局在が変化している可能性がある。

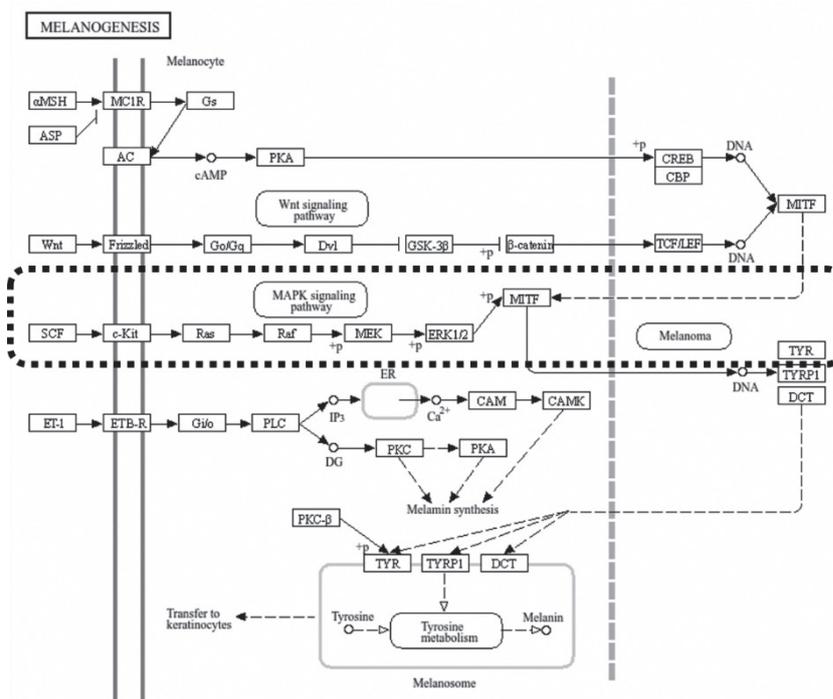


図 6. メラニン合成における KEEG signaling pathway

メラニン合成におけるシグナル伝達経路の模式図 KIT の後方に MITF が位置しており、MITF が直接 TYR の発現を制御している。

肉質に関連する遺伝子では淡色化個体において *CRYAB*、*HSPB1* の発現量が増加、*MEF2C* の発現量が低下していた。*CRYAB*、*HSPB1* はどちらも低分子熱ショックタンパク質の一種であり、ウシの筋肉における発現量が肉の柔らかさ、BMS と正の相関関係にあることが報告されている¹⁶ (Picard ら, 2018)。本研究では淡色化個体において *CRYAB*、*HSPB1* の発現量が増加したが、この結果は、先行研究⁹ (Yamashita ら, 2024) で明らかになった淡色化個体の BMS および、肉の柔らかさ向上と矛盾のない結果であった。*MEF2C* 遺伝子は筋線維組成の調節を担う遺伝子の一つであり *MEF2C* の発現は筋線維中のミオシン重鎖 I 型の割合を増加させる。筋線維におけるミオシン重鎖 I 型の発現量増加は肉の柔らかさと負の相関にあることが報告されている^{17;18} (Shen ら, 2016; Picard ら, 2020)。本研究では淡色化個体において *MEF2C* の発現量が低下していた。これは、先行研究⁹ (Yamashita ら, 2024) で明らかになった淡色化個体の肉の柔らかさ向上を裏付ける結果であった。本研究では毛根の RNA を用いた発現解析であるため今後、通常色個体と淡色化個体の筋線維を用いた検証を予定している。

白色脂肪組織に関連する遺伝子では淡色化個体において *MED19*、*SIPR3* の発現量が低下、*SELENBP1* の発現が増加していた。*MED19* は脂肪細胞分化のマスターレギュレーターである PPAR γ (peroxisome proliferator activated receptor gamma) と共役することで RNA ポリメラーゼ II へ結合し脂肪組織の分化と形成を活性化する。この *MED19* は正常な白色脂肪組織、褐色脂肪組織の形成に必要な遺伝子であり、*MED19* をノックアウトしたマウスでは白色脂肪組織の重量低下、肝臓の重量増加、褐色脂肪組織の熱産生機能低下、インスリンへの抵抗性などが報告されている¹⁹ (Dean ら, 2020)。*SIPR3* タンパク質はスフィンゴシン -1- リン酸と結合し、脂肪酸代謝を制御する主要な転写因子である SREBP1 (sterol regulatory element binding protein 1) を活性化することで下流因子である PPAR γ を活性化する²⁰ (Ruiz ら, 2022)。また、*SIPR3* の発現が低下することで脂肪組織以外への異所性脂肪蓄積、インスリンへの抵抗性などが報告されている²¹ (Chakrabarty ら, 2022)。*MED19*、*SIPR3* とは対照的に淡色化個体において発現量が増加した *SELENBP1* は H_2S を産生する酵素であり、脂肪細胞の分化を刺激する²² (Randi ら, 2021)。産生された H_2S は PPAR γ の 139 番目のシステインを直接硫化することでグルコースの貯蔵を促進する²³ (Cai

ら, 2016)。本研究において淡色化個体における *MED19*, *SIPR3* の発現量は低下していた。このことから、淡色化個体は通常色個体に比べて白色脂肪組織で脂質を貯蔵する機能が低下し、異所性脂肪蓄積やインスリンへの抵抗性が増加していると考えられる。また、淡色化個体における *SELENBP1* の発現量増加は PPAR γ 活性の増加により脂質貯蔵を補う動きを見せているが、PPAR γ による転写活性増加に不可欠な *MED19* の発現量が低下しているため、総合的な視点においても脂質貯蔵機能は低下していると考えられる。

褐色脂肪組織に関連する遺伝子では淡色化個体において *ELOVL3*, *PPARGC1B* の発現量が大きく低下していた。*ELOVL3* 遺伝子は長鎖脂肪酸伸長酵素をコードしており、白色脂肪組織と褐色脂肪組織での脂肪の形成において発現が増加する PPAR γ の標的遺伝子の 1 つである。*ELOVL3* のノックアウトマウスでは、白色脂肪組織での脂肪酸生合成、脂肪形成、および脂肪分解の減少に加えて²⁴ (Kobayashi ら, 2012)、褐色脂肪組織での脂質蓄積能力、熱産生能力の低下が報告されている²⁵ (Westerberg ら, 2005)。*PPARGC1B* は SREBP ファミリーを共活性化するコアクチベーターであり、*PPARGC1B* の発現は SREBP1 を介して脂肪形成遺伝子の発現を刺激する²⁶ (Lin ら, 2005)。また、*PPARGC1B* は褐色脂肪組織の非震え熱産生能力の維持に不可欠であり、*PPARGC1B* ノックアウトマウスは急な寒冷環境への暴露に対して感受性が高く褐色脂肪組織における熱産生能力が低下することが明らかになっている²⁷ (Funda ら, 2022)。さらに、*PPARGC1B* の発現は高脂肪食の摂食によるインスリン抵抗性の増加に伴い低下することが報告されている²⁸ (Hoeks ら, 2006)。本研究において淡色化個体における *ELOVL3*, *PPARGC1B* の発現量は低下していた。このことから、淡色化個体は通常色個体に比べて褐色脂肪組織における熱産生能力や脂質蓄積能力が低下し、異所性脂肪蓄積やインスリンへの抵抗性が増加していると考えられる。

白色脂肪組織に関連する遺伝子と、褐色脂肪組織に関連する遺伝子のうち淡色化個体において発現変動が見られた 5 つの遺伝子について、脂肪形成のマスターレギュレーターである PPAR γ を中心としたネットワーク図を作図した (図 7)。

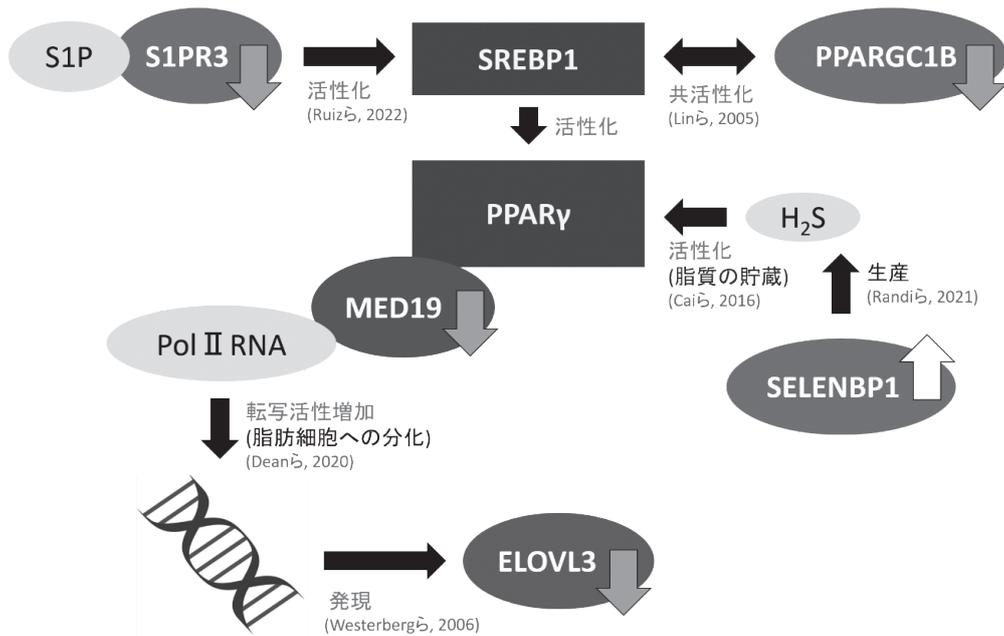


図 7. 脂肪組織関連の発現変動遺伝子と主要な転写因子を中心としたネットワーク図

主要な転写因子である PPAR γ を中心として発現変動が見られた脂肪組織関連遺伝子の機能を基に作成したネットワーク図。グレーの矢印は淡色化個体における発現の低下を、白い矢印は淡色化個体における発現の増加を表す。

このネットワーク図から淡色化個体では主要な転写因子の活性化因子、共役因子、下流因子、のいずれも発現が低下していることがわかる。このことから、淡色化個体では通常色個体に比べて脂肪細胞の分化や脂肪の蓄積などが低下していると考えられる。さらに、*MED19*、*S1PR3*、*PPARGC1B* の発現低下はインスリン抵抗性を増加させることが報告され、*ELOVL3* においても脂質代謝異常との関連が示唆されている。インスリン抵抗性が増加すると脂肪細胞への脂質貯蔵機能の低下、遊離脂肪酸の増加そして骨格筋への異所性脂肪沈着の増加が起こるとされている。マウスのような単胃動物の場合グルコースから脂肪酸を合成するが、一方で反芻動物であるウシは酢酸とグルコースの両方から脂肪酸を合成できる。加えて、ウシは主に脂肪組織と骨格筋にトリグリセリドを貯蔵するため、単胃動物に比べて筋肉内脂肪が沈着しやすい傾向にあるとされている²⁹ (Tan ら, 2024)。このことから、淡色化個体では *ELOVL3*、*MED19*、*S1PR3*、*PPARGC1B* の発現低下により白色脂肪組織への脂質貯蔵機能が低下したことで異所性脂肪が骨格筋に蓄積し、BMS が向上していると考えられる。

本研究では熊本系褐毛和種の淡色化がBMS等の肉質を向上させるメカニズムを探るために毛色、肉質、白色脂肪組織、褐色脂肪組織の各表現型に関連する遺伝子の発現を調査した。その結果、熊本系褐毛和種の淡色化個体では毛色に関わる主要な遺伝子である *KIT*、*MITF*、*TYR* の発現低下により色素産生が低下し、淡色化の原因遺伝子である *PMEL* の機能や局在が変化していることが分かった。また、淡色化個体では肉質への影響が報告されている遺伝子において発現量に変化し、淡色化個体の肉質向上⁹ (Yamashita ら, 2024) と相違ない結果が得られた。さらに、淡色化個体では脂肪の形成に関わる主要な転写因子の発現が低下し、通常色個体に比べて脂肪の蓄積や分解、褐色脂肪組織における非震え熱産生能力の低下がBMSの向上に寄与している可能性が明らかになった。一方で、本研究においては毛根における発現解析であるため、実際に筋線維や脂肪組織を用いて検証を行う必要があるが、もし検証の結果、筋線維や脂肪組織において本研究結果と同じように発現変動が確認された場合、熊本系褐毛和種の毛根から肉質を予測する新しい方法として活用できる可能性がある。現在、毛色が淡色化した個体は褐毛和種として繁殖登録を取得することができないため繁殖に用いられることは少ないが淡色化個体の有用性を明らかにしていくことによって、いずれは育種改良への活用を可能にすることで、熊本系褐毛和種の遺伝的近交度の低下に貢献していきたい。今後、淡色化個体の増加に伴い阿蘇の景色がさらに彩のあるものになっていくことを期待したい。

参考文献リスト

¹ Sumio Y, Improvement and present state of Japanese brown cattle and prospect in the future. 2007

² Kimura S, Hatakeyama T, Koutaka T, Kubo K, Morita S, Eguchi K, Saitoh K, Yamauchi K, Imai S, Kashimura A, Inenaga T, Matsumoto H. *PMEL* p.Leu18del dilutes coat color of Kumamoto sub-breed of Japanese Brown cattle. *BMC Genomics*. 2022 Oct 7;23(1):694. doi: 10.1186/s12864-022-08916-8. PMID: 36207673; PMCID: PMC9541072.

³ Barsh GS. The genetics of pigmentation: from fancy genes to complex traits. *Trends Genet.* 1996 Aug;12(8):299-305. doi: 10.1016/0168-9525(96)10031-7. PMID: 8783939.

⁴ Klungland H, Våge DI, Gomez-Raya L, Adalsteinsson S, Lien S. The role of melanocyte-stimulating hormone (MSH) receptor in bovine coat color determination. *Mamm Genome.* 1995 Sep;6(9):636-9. doi: 10.1007/BF00352371. PMID: 8535072.

⁵ Matsumoto H, Kojya M, Takamuku H, Kimura S, Kashimura A, Imai S, Yamauchi K, Ito S. MC1R c.310G>- and c.871G > A determine the coat color of Kumamoto sub-breed of Japanese Brown cattle. *Anim Sci J.* 2020 Jan-Dec;91(1):e13367. doi: 10.1111/asj.13367. PMID: 32285552.

⁶ Klungland H, Våge DI, Gomez-Raya L, Adalsteinsson S, Lien S. The role of melanocyte-stimulating hormone (MSH) receptor in bovine coat color determination. *Mamm Genome.* 1995 Sep;6(9):636-9. doi: 10.1007/BF00352371. PMID: 8535072.

⁷ Kuehn C, Weikard R. Multiple splice variants within the bovine silver homologue (SILV) gene affecting coat color in cattle indicate a function additional to fibril formation in melanophores. *BMC Genomics.* 2007 Sep 24;8:335. doi: 10.1186/1471-2164-8-335. PMID: 17892572; PMCID: PMC2099443.

⁸ Wang J, Fan T, Du Z, Xu L, Chen Y, Zhang L, Gao H, Li J, Ma Y, Gao X. Genome-Wide Association Analysis Identifies the PMEL Gene Affecting Coat Color and Birth Weight in Simmental × Holstein. *Animals (Basel).* 2023 Dec 11;13(24):3821. doi: 10.3390/ani13243821. PMID: 38136858; PMCID: PMC10740715.

⁹ Yamashita T, Hatakeyama T, Hashimoto S, Inenaga T, Kashimura A, Matsumoto H. PMEL p.L18del associates with beef quality of Kumamoto sub-breed of Japanese Brown cattle. *Anim Sci J.* 2024 Jan-Dec;95(1):e14003.

doi: 10.1111/asj.14003. PMID: 39318113.

¹⁰ Yoshida H, Kunisada T, Grimm T, Nishimura EK, Nishioka E, Nishikawa SI. Review: melanocyte migration and survival controlled by SCF/c-kit expression. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 2001 Nov;6(1):1-5.

doi: 10.1046/j.0022-202x.2001.00006.x. PMID: 11764276.

¹¹ Reinsch N, Thomsen H, Xu N, Brink M, Looft C, Kalm E, Brockmann GA, Grupe S, Kühn C, Schwerin M, Leyhe B, Hiendleder S, Erhardt G, Medjugorac I, Russ I, Förster M, Reents R, Averdunk G. A QTL for the degree of spotting in cattle shows synteny with the KIT locus on chromosome 6. *J Hered.* 1999 Nov-Dec;90(6):629-34. doi: 10.1093/jhered/90.6.629. PMID: 10589513.

¹² Zhang MQ, Xu X, Luo SJ. The genetics of brown coat color and white spotting in domestic yaks (*Bos grunniens*). *Anim Genet.* 2014 Oct;45(5):652-9.

doi: 10.1111/age.12191. Epub 2014 Jul 3. PMID: 24989079.

¹³ D'Mello SA, Finlay GJ, Baguley BC, Askarian-Amiri ME. Signaling Pathways in Melanogenesis. *Int J Mol Sci.* 2016 Jul 15;17(7):1144.

doi: 10.3390/ijms17071144. PMID: 27428965; PMCID: PMC4964517.

¹⁴ Liu L, Harris B, Keehan M, Zhang Y. Genome scan for the degree of white spotting in dairy cattle. *Anim Genet.* 2009 Dec;40(6):975-7.

doi: 10.1111/j.1365-2052.2009.01936.x. Epub 2009 Jun 15. PMID: 19531114.

¹⁵ Anello M, Daverio MS, Silbestro MB, Vidal-Rioja L, Di Rocco F. Characterization and expression analysis of KIT and MITF-M genes in llamas and their relation to white coat color. *Anim Genet.* 2019 Apr;50(2):143-149.
doi: 10.1111/age.12769. Epub 2019 Feb 7. PMID: 30730042.

¹⁶ Picard B, Gagaoua M, Al-Jammas M, De Koning L, Valais A, Bonnet M. Beef tenderness and intramuscular fat proteomic biomarkers: muscle type effect. *PeerJ.* 2018 Jun 7;6:e4891. doi: 10.7717/peerj.4891. PMID: 29892502; PMCID: PMC5994332.

¹⁷ Shen L, Chen L, Zhang S, Zhang Y, Wang J, Zhu L. MicroRNA-23a reduces slow myosin heavy chain isoforms composition through myocyte enhancer factor 2C (MEF2C) and potentially influences meat quality. *Meat Sci.* 2016 Jun;116:201-6.
doi: 10.1016/j.meatsci.2016.02.023. Epub 2016 Feb 12. PMID: 26897085.

¹⁸ Picard B, Gagaoua M. Meta-proteomics for the discovery of protein biomarkers of beef tenderness: An overview of integrated studies. *Food Res Int.* 2020 Jan;127:108739.
doi: 10.1016/j.foodres.2019.108739. Epub 2019 Oct 31. PMID: 31882086.

¹⁹ Dean JM, He A, Tan M, Wang J, Lu D, Razani B, Lodhi IJ. MED19 Regulates Adipogenesis and Maintenance of White Adipose Tissue Mass by Mediating PPAR γ -Dependent Gene Expression. *Cell Rep.* 2020 Oct 6;33(1):108228.
doi: 10.1016/j.celrep.2020.108228. PMID: 33027649; PMCID: PMC7561447.

²⁰ Ruiz M, Devkota R, Panagaki D, Bergh PO, Kaper D, Henricsson M, Nik A, Petkevicius K, Höög JL, Bohlooly-Y M, Carlsson P, Borén J, Pilon M. Sphingosine 1-phosphate mediates adiponectin receptor signaling essential for lipid homeostasis

and embryogenesis. *Nat Commun.* 2022 Nov 22;13(1):7162.

doi: 10.1038/s41467-022-34931-0. PMID: 36418331; PMCID: PMC9684441.

²¹ Chakrabarty S, Bui Q, Badeanlou L, Hester K, Chun J, Ruf W, Ciaraldi TP, Samad F. S1P/S1PR3 signalling axis protects against obesity-induced metabolic dysfunction. *Adipocyte.* 2022 Dec;11(1):69-83.

doi: 10.1080/21623945.2021.2021700. PMID: 35094654; PMCID: PMC8803104.

²² Randi EB, Casili G, Jacquemai S, Szabo C. Selenium-Binding Protein 1 (SELENBP1) Supports Hydrogen Sulfide Biosynthesis and Adipogenesis. *Antioxidants (Basel).* 2021 Feb 27;10(3):361.

doi: 10.3390/antiox10030361. PMID: 33673622; PMCID: PMC7997437.

²³ Cai J, Shi X, Wang H, Fan J, Feng Y, Lin X, Yang J, Cui Q, Tang C, Xu G, Geng B. Cystathionine γ lyase-hydrogen sulfide increases peroxisome proliferator-activated receptor γ activity by sulfhydration at C139 site thereby promoting glucose uptake and lipid storage in adipocytes. *Biochim Biophys Acta.* 2016 May;1861(5):419-29.

doi: 10.1016/j.bbali.2016.03.001. Epub 2016 Mar 2. PMID: 26946260.

²⁴ Kobayashi T, Fujimori K. Very long-chain-fatty acids enhance adipogenesis through coregulation of Elovl3 and PPAR γ in 3T3-L1 cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2012 Jun 15;302(12):E1461-71.

doi: 10.1152/ajpendo.00623.2011. Epub 2012 Mar 20. PMID: 22436697.

²⁵ Westerberg R, Månsson JE, Golozoubova V, Shabalina IG, Backlund EC, Tvrdik P, Retterstøl K, Capecchi MR, Jacobsson A. ELOVL3 is an important component for early onset of lipid recruitment in brown adipose tissue. *J Biol Chem.* 2006 Feb

24;281(8):4958-68.

doi: 10.1074/jbc.M511588200. Epub 2005 Dec 2. PMID: 16326704.

²⁶ Lin J, Yang R, Tarr PT, Wu PH, Handschin C, Li S, Yang W, Pei L, Uldry M, Tontonoz P, Newgard CB, Spiegelman BM. Hyperlipidemic effects of dietary saturated fats mediated through PGC-1 β coactivation of SREBP. *Cell*. 2005 Jan 28;120(2):261-73.

doi: 10.1016/j.cell.2004.11.043. PMID: 15680331.

²⁷ Funda J, Villena JA, Bardova K, Adamcova K, Irodenko I, Flachs P, Jedlickova I, Haasova E, Rossmeisl M, Kopecky J, Janovska P. Adipose tissue-specific ablation of PGC-1 β impairs thermogenesis in brown fat. *Dis Model Mech*. 2022 Apr 1;15(4):dmm049223.

doi: 10.1242/dmm.049223. Epub 2022 Apr 25. PMID: 35466996; PMCID: PMC9066513.

²⁸ Hoeks J, Hesselink MK, Russell AP, Mensink M, Saris WH, Mensink RP, Schrauwen P. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 and insulin resistance: acute effect of fatty acids. *Diabetologia*. 2006 Oct;49(10):2419-26. doi: 10.1007/s00125-006-0369-2. Epub 2006 Aug 1. PMID: 16896940.

²⁹ Tan Z, Jiang H. Molecular and Cellular Mechanisms of Intramuscular Fat Development and Growth in Cattle. *Int J Mol Sci*. 2024 Feb 21;25(5):2520.

doi: 10.3390/ijms25052520. PMID: 38473768; PMCID: PMC10931733.

阿蘇世界文化遺産登録推進「若手研究」採用者一覧

令和4年度（2022年度）採用者

- ・阿部 大地氏 佐賀県立図書館 主事（学芸員）
- ・竹永 昂平氏 南阿蘇村教育委員会 主事（学芸員）

令和5年度（2023年度）採用者

- ・阿部 大地氏 佐賀県立図書館 主事（学芸員）
- ・袁 星雅氏 筑波大学大学院 世界遺産学学位プログラム 博士後期課程
- ・櫻田 創氏 北海道大学 大学院農学院 土壌学研究室 修士課程
- ・増井 太樹氏 公益財団法人 阿蘇グリーンストック 専務理事

令和6年度（2024年度）採用者

- ・阿部 しえり氏 北海道大学大学院農学院 博士前期課程
- ・齋藤 温子氏 東京農業大学大学院 博士前期課程
- ・高岸 慧氏 東京農業大学農学部大学院 研究生
- ・山下 泰斗氏 東海大学大学院 修士前期課程

※五十音順

※肩書は採用時のものである。

本論文集は、以下の熊本県企画振興部 地域振興・世界遺産推進局
阿蘇草原再生・世界遺産推進課のホームページ上でデータを公開しています。
(URL)<https://www.pref.kumamoto.jp/soshiki/22/195848.html>



阿蘇世界文化遺産登録推進 「若手研究」成果論文集 第2号

令和7年(2025年)3月発行

編集・発行 阿蘇世界文化遺産登録推進協議会

〒862-8570 熊本市中央区水前寺6丁目18番1号

(事務局:熊本県企画振興部 地域振興・世界遺産推進局 阿蘇草原再生・世界遺産推進課)

TEL 096-333-2153 FAX 096-381-9829

印刷・製本 株式会社アド・コム

〒862-0908 熊本市東区新生2丁目23-18

TEL 096-285-8550 FAX 096-285-1511

