

近赤外分析法による暖地型牧草の成分および栄養価の推定

(3) ジャイアントスターグラスにおける粗タンパク質含有率 および乾物消化率の検量線作成

長利真幸 守川信夫 當眞嗣平 望月智代

I 要 約

暖地型牧草の成分と栄養価を迅速に測定するために、ジャイアントスターグラスの粗タンパク質含有率(CP)と乾物消化率について、近赤外分析法(NIRS)を用いて検量線の作成を行なった。試料サイズでは粉碎試料(1 mm)と未粉碎試料(200~300 mm)、検量線の作成方法については線形重回帰分析(MLR)と部分最小二乗法による回帰分析(PLS)を用いて比較検討し、推定精度の検証を行なった。

1. CP について、MLR を用いた検量線の推定精度は粉碎試料で $r=0.988$, $SDP=0.55$, $EI=8.31\%$, 未粉碎試料で $r=0.965$, $SDP=0.93$, $EI=13.95\%$ となった。PLS を用いた検量線の推定精度は、粉碎試料で $r=0.992$, $SDP=0.44$, $EI=6.64\%$, 未粉碎試料で $r=0.974$, $SDP=0.81$, $EI=12.12\%$ となり、PLS が MLR より高い推定精度を得た。

2. 乾物消化率について、MLR を用いた検量線の推定精度は粉碎試料で $r=0.975$, $SDP=1.74$, $EI=12.46\%$ 未粉碎試料で $r=0.948$, $SDP=2.48$, $EI=17.77\%$ となった。PLS を用いた検量線の推定精度は、粉碎試料で $r=0.984$, $SDP=1.39$, $EI=9.96\%$, 未粉碎試料で $r=0.949$, $SDP=2.47$, $EI=17.69\%$ となり、PLS が MLR より高い推定精度を得た。

3. 試料サイズについては、CP, 乾物消化率ともに粉碎試料を用いた検量線がより高い精度を示したが、未粉碎試料においても十分な精度を得ることができた。

II 緒 言

NIRS は非破壊的な分析法であることから、迅速かつ同時に多成分の分析が可能であること、試葉・薬品が不要であり安価であること、化学分析に比べて高度な分析技術を必要としないことなど多くの利点を持つため、早くから飼料分析に応用され実用化されている。しかし、NIRS は光学的なデータを変数とした重回帰分析等による推定であり、飼料成分は数種の化学的性質の類似した物質群であることから、NIRS 推定値と化学分析値は必ずしも一致するとは限らない。また、各種成分を構成する主要物質の化学的特徴の違いにより、分析精度および適用範囲が異なる¹⁾ので、試料の種類や分析項目ごとに検量線を作成する必要がある。

現在、NIRS を利用しての寒地型牧草およびサイレージの成分および栄養価について多くの研究が報告されている^{2~5)}が、沖縄で栽培されている暖地型牧草での報告は少ない。前報^{6, 7)}では、NIRS を用いて、ギニアグラスとパンゴラグラス(品種:トランスパー)の CP およびペプシンセルラーゼ法による乾物消化率(*in vitro*)での検量線を作成し、高い推定精度を得た。本報では、沖縄で奨励品種に選定されている⁸⁾ジャイアントスターグラスを用いて CP と乾物消化率についての検量線を作成し、その推定精度を検証する。加えてサンプルの粉碎作業を省力化するために粉碎試料と、未粉碎試料について比較検討したので報告する。

III 材料および方法

1. 供試試料および調製

供試試料であるジャイアントスターグラスは本試験場(国頭マージ土壤)で、圃場、生育ステージ、刈取間隔を変えて採取した 100 点を用い、化学分析値の成分範囲が同程度になるように検量線作成用試料 60 点と検定用試料 40 点に分けた。試料は 200~300 mm に細断し、縮分したものを 2 つに分け 72℃ で 48 時間乾燥させた後、片方はカッティングミル(1 mm メッシュ)にて粉碎し、もう一方はそのまま未粉碎試

料とした。

2. 分析方法

乾物消化率はペプシンセルラーゼ法⁹⁾、CPはケルダール法¹⁰⁾により求めた。

3. 検量線の作成

近赤外分光光度計はNIRSystem社 Model-6500型を用いて1100nm～2500nmの波長のスペクトルを測定し、得られた原スペクトルについては2次微分処理(微分条件: GAP0, Segment20)を行なった。粉碎試料は標準セルを用いた反射法による2回の反復測定、未粉碎試料は長方形型セルを用いた反射法による3回の反復測定^{11, 12)}を行なった。検量線作成についてはNSASソフトウェアを用い、MLRとPLSの2種類の方法で行なった。

MLRは成分由来の官能基が持つ吸収波長を説明変数として用いる重回帰分析である。波長については、尖突なピークは避け、波長の変化に対して安定した幅の広い吸収帯を選択¹³⁾した。また、補正のための波長を追加していき、第1波長から第4波長までの組み合わせにて、検量線の候補を作成した。

PLSは多変量解析法である主成分分析法を応用した方法で、全波長域における少数の無相関な主成分(因子)を説明変数として用いる解析法である。因子の選択についてはNSASソフトウェアを用いた。

4. 検量線の検定

作成した検量線は検定用試料40点により推定精度の検証を行ない、最適な検量線を決定した。推定精度の検証は、検定試料を未知飼料とした検量線の推定値と化学分析値の相関係数(r)、推定誤差の標準偏差(SDP)、および推定精度の評価指数であるEI¹⁴⁾を用いて比較した。

IV 結果および考察

供試試料の成分範囲を表1に示した。一般に、検量線の検定においては、検量線を作成した試料と同様な種類・レンジを持った試料群を用いることが最良とされている。今回の供試試料では、CPでの検量線作成用および検定用試料の成分レンジについては13.64%、13.28%と幅広いものであり、乾物消化率での成分レンジについても同様に31.80%、27.92%と幅広いレンジが得られ、供試試料としての条件を満たしていたと考えられる。

表1 供試試料の成分範囲(%DM)

分析項目	検量線作成用試料						検定用試料					
	n	最小値	最大値	レンジ	平均	SD	n	最小値	最大値	レンジ	平均	SD
CP	60	5.18	18.82	13.64	11.71	3.83	40	5.36	18.64	13.28	11.31	3.55
IVDMD	60	40.24	72.04	31.80	55.24	8.13	40	40.99	68.91	27.92	54.91	7.77

注1) CP: 粗タンパク質含有率

2) IVDMD: 乾物消化率 (*in vitro*)

3) レンジ: 最大値-最小値

MLRおよびPLSによる検量線作成結果を表2に示した。MLRによる検量線ではCP・粉碎試料で3波長、未粉碎試料で4波長、乾物消化率では4波長を選択したものが最良の検量線となった。CPについては粉碎試料では2162nm、未粉碎試料では2186nmを第1波長に選択しており、これらはタンパク質の代表的な吸収がある^{15, 16)}とされている波長付近であった。乾物消化率については粉碎試料で2256nm、未粉碎試料で2332nmを第1波長に選択しており、これらはリグニンの吸収があるとされる^{16, 17)}波長付近であった。リグニンは粗繊維の主たる構成物質で、植物の生長が進むとともに増大し、消化率とは負の相関を示すとされていること¹⁸⁾から乾物消化率と密接に関係があると思われる。

PLSによる検量線においては、CP・粉碎試料で因子数7、未粉碎試料で9、乾物消化率では粉碎試料で因子数6、未粉碎試料で因子数4を選択した検量線が最良であった。

表2 MLRおよびPLSによる検量線の作成結果

項目	試料サイズ	MLR法						PLS法		
		使用波長 (nm)				r	SEC	因子数	r	SEC
		1	2	3	4					
CP	粉碎	2162	1534	1654		0.987	0.63	7	0.992	0.44
CP	未粉碎	2186	1234	1686	2256	0.981	0.76	9	0.992	0.52
IVDMD	粉碎	2256	2380	1972	1362	0.975	1.88	6	0.984	1.50
IVDMD	未粉碎	2332	1136	1354	2256	0.969	2.07	4	0.964	2.23

注1) MLR：線形重回帰分析

2) PLS：部分最小二乗法による回帰分析

3) r：検量線作成における相関係数

4) SEC：検量線における標準誤差

MLRおよびPLSにより作成した検量線の推定精度を表3に示した。MLRを用いたCPでの検量線の推定精度は、粉碎試料で $r=0.988$ 、 $SDP=0.55$ 、未粉碎試料で $r=0.965$ 、 $SDP=0.93$ 、乾物消化率では、粉碎試料で $r=0.975$ 、 $SDP=1.74$ 、未粉碎試料で $r=0.948$ 、 $SDP=2.48$ となった。

MLRにおいては推定する目的成分の吸収波長とされる波長を選択することが重要であり、CPについてはこれに準じる結果で、高い推定精度を得た。乾物消化率のように多くの物質が関与したものでは、検量線に用いる波長の特定は難しいとされているが、今回の検量線作成では、リグニンを中心とした繊維成分の波長を選択する事によって十分な推定精度を得ることができた。これらCPおよび乾物消化率における波長の選択や推定精度については、前報^{6,7)}にて報告したギニアグラス、トランスパーラでの検量線と同様の傾向を示した。

PLSを用いたCPでの検量線の推定精度は、粉碎試料で $r=0.992$ 、 $SDP=0.44$ 、未粉碎試料で $r=0.974$ 、 $SDP=0.81$ 、乾物消化率では粉碎試料で $r=0.984$ 、 $SDP=1.39$ 、未粉碎試料で $r=0.949$ 、 $SDP=2.47$ となった。MLRに比べPLSでは解析に用いる情報量を飛躍的に増やすことができ、物質由来の吸収とノイズを分離しやすく、オーバーフィッティングが避けられる¹⁹⁾等の利点が挙げられている。そのため、牧草の栄養成分項目に関係なくPLSを用いた検量線の報告は多数あり^{20~22)}、比較的精度の高い検量線が作成できるとされている。

MLRとPLSを推定精度で比較すると、試料サイズ(粉碎・未粉碎)や測定項目(CP・乾物消化率)において、PLSで作成した検量線がSDP、rともに優れた結果となった。PLSにおいて作成した検量線におけるNIR値と化学分析値との関係を図1に示した。図1のようにCP、乾物消化率について、NIRS推定値と化学分析値との間に高い相関が確認できた。

表3 検定試料におけるMLRおよびPLSによる検量線の推定精度

項目	試料サイズ	MLR				PLS			
		r	SDP	EI	評価	r	SDP	EI	評価
CP	粉碎	0.988	0.55	8.31	A	0.992	0.44	6.64	A
CP	未粉碎	0.965	0.93	13.95	B	0.974	0.81	12.12	A
IVDMD	粉碎	0.975	1.74	12.46	B	0.984	1.39	9.96	A
IVDMD	未粉碎	0.948	2.48	17.77	B	0.949	2.47	17.69	B

注1) MLR：線形重回帰分析

2) PLS：部分最小二乗法による回帰分析

3) r：検量線検定における相関係数

4) SDP：検量線の検定における標準誤差

5) $EI=2 \times SDP / \text{レンジ} \times 100$ (%)

A=very good (~12.4) B=good (12.5~24.9) C=fair (25.0~37.4) D=poor (37.5~49.9)

E=very poor (50.0~)

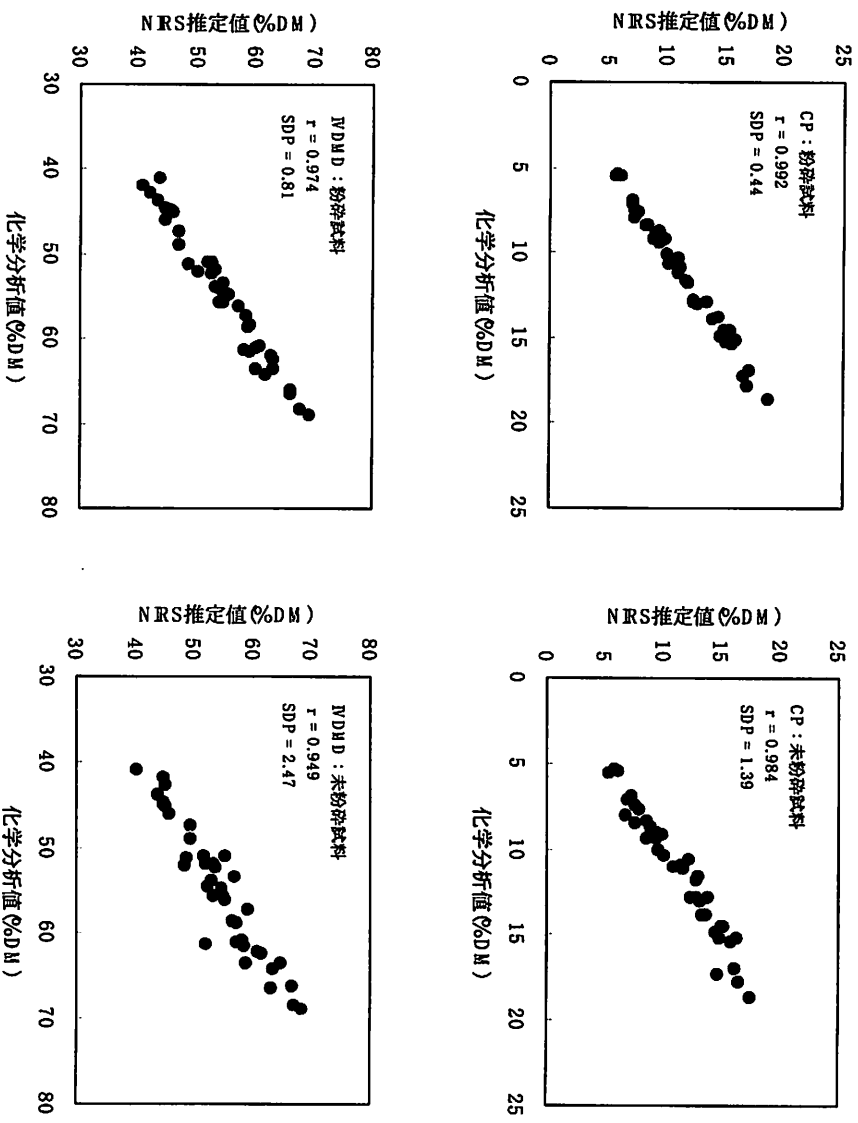


図 1 PLS により作成した検量線の検定用試料における NIRS 値と化学分析値との関係

推定精度の評価指数である EI において、粉碎試料による CP の検量線では MLR で 8.31%, PLS では 6.64% とともに A 評価であった。未粉碎試料においては MLR で 13.95% の B 評価, PLS では 12.12% の A 評価となった。粉碎試料による乾物消化率については, MLR で 12.46% の B 評価, PLS では 9.96% と A 評価であった。未粉碎試料においては MLR で 17.77%, PLS では 17.69% とともに B 評価であった。以上のことから今回作成した検量線では, 粉碎試料については CP, 乾物消化率ともに高い推定精度が得られ, 未粉碎試料についても粉碎試料よりは若干劣るが, 十分な推定精度が得られることが分かり, 試料のサイズに応じた検量線を作成することによって粉碎作業の省力化が可能になると考えられた。

V 引用文献

- 1) 自給飼料品質評価研究会(2001)改訂粗飼料品質評価ガイドブック, 日本草地畜産種子協会, 53-54
- 2) 水野和彦・石栗敏機・近藤恒夫・加藤忠司(1988)近赤外線反射率測定法による乾草の成分および栄養価の推定 II. 推定精度に及ぼす草種構成の影響および推定に有効な波長の検討, 草地試験場研究報告, 38, 48-54
- 3) 水野和彦・石栗敏機・近藤恒夫・加藤忠司(1988)近赤外線反射率測定法による乾草の成分および栄養価の推定 III. 栄養価の推定方法としての近赤外線反射率測定法と化学分析法の比較—オーチャードグラスについて—, 草地試験場研究報告, 38, 56-60
- 4) 垣内一明・脇大作・町田豊・千葉昭弘(2000)飼料作物の品質評価法の確立 第 1 報. 近赤外分析における一般成分, 繊維成分の検量線作成, 鹿児島県畜産試験場研究報告, 33, 52-54
- 5) Michael O' Keefe・Gerard Downey and James C Brogan(1987)The Use of Near Infrared Reflectance Spectroscopy for Predicting the Quality of Grass Silage, *J. Sci. Food Agric.*, 38, 209-216

- 6) 長利真幸・守川信夫・當眞嗣平・望月智代(2003)近赤外分析法による暖地型牧草の成分および栄養価の推定(1)ギニアグラスにおける粗タンパク質含有率および乾物消化率の検量線作成, 沖縄畜試研報, 41, 113-117
- 7) 長利真幸・守川信夫・當眞嗣平・望月智代(2003)近赤外分析法による暖地型牧草の成分および栄養価の推定(2)パンゴラグラスにおける粗タンパク質含有率および乾物消化率の検量線作成, 沖縄畜試研報, 41, 118-122
- 8) 沖縄県農林水産部畜産課(1998)沖縄県牧草飼料作物奨励品種の特性及び栽培基準, 1
- 9) Goto, I. and D.J.Minson(1977)Prediction of the dry matter digestibility of tropical grasses using a pepsin-cellulase assay, *Animal Feed Science and technology*, 2, 247-253
- 10) 自給飼料品質評価研究会(2001)改訂粗飼料品質評価ガイドブック, 日本草地畜産種子協会, 8-9,
- 11) 自給飼料品質評価研究会(2001)改訂粗飼料品質評価ガイドブック, 日本草地畜産種子協会, 68-69
- 12) 水野和彦・榊原敏之・杉田紳一・中山貞夫(1998)近赤外線反射測定法(NIRS)によるオーチャードグラス未粉碎試料の化学分析および分解率の簡易推定法, 日本草地学会誌, 44(別), 266-267
- 13) 甘利雅弘・阿部亮・田野良衛・榎木茂彦・芹沢駿治・古賀照章(1987)近赤外分析法による粗飼料の成分分析と栄養価の推定法Ⅰ. キャリブレーションの精度と未知飼料の推定精度, 日本草地学会誌, 33(3), 219-226
- 14) 水野和彦・石栗敏機・近藤恒夫・加藤忠司(1988)近赤外線反射率測定法による乾草の成分および栄養価の推定Ⅰ. 成分および栄養価の推定精度とその評価, 草地試験場研究報告, 38, 35-46
- 15) ニレコー-NIRS システムズ(1994)近赤外分光分析法技術資料Ⅲ, 18-19
- 16) 自給飼料品質評価研究会(2001)改訂粗飼料品質評価ガイドブック, 日本草地畜産種子協会, 61
- 17) 甘利雅弘・阿部亮・河野澄夫・趙夾光(1991)近赤外スペクトルにおける粗飼料中の繊維性成分の吸収特性, 畜産試験場研究報告, 51, 17-27
- 18) 阿部亮(1988)炭水化物成分を中心とした飼料分析法とその飼料栄養価評価法への応用 3)酸性デタージェント繊維とリグニン定量, 畜産試験場研究資料第2号, 23-29
- 19) 自給飼料品質評価研究会(2001)改訂粗飼料品質評価ガイドブック, 日本草地畜産種子協会, 54
- 20) 垣内一明・脇大作・町田豊・千葉明宏(2000)飼料作物の品質評価法の確立 第2報. 近赤外分析におけるローズグラス中の硝酸態窒素の検量線作成, 鹿児島県畜産試験場研究報告, 33, 55-57
- 21) 梅田剛利・小山太・高椋久次郎(2001)近赤外分光法による肉牛ふん堆肥の無機塩類含量の推定, 福岡県農業総合試験場研究報告, 20, 105-108
- 22) 金谷千津子・丸山富美子・清水雅代・赤江静雄・斉藤堅伸・石崎和彦・土屋いずみ・清水政浩・平尾賢一(1999)近赤外分析法による粗飼料の中性デタージェント繊維(NDF)の推定精度, 富山県畜産試験場研究報告, 14, 29-31

近赤外分析法による暖地型牧草の成分および栄養価の推定

(4) ローズグラスにおける粗タンパク質含有率および乾物消化率の検量線作成

長利真幸 守川信夫 眞眞嗣平 望月智代

I 要 約

暖地型牧草の成分と栄養価を迅速に測定するために、ローズグラスの粗タンパク質含有率(CP)と乾物消化率について、近赤外分析法(NIRS)を用いて検量線の作成を行なった。試料サイズでは粉碎試料(1 mm)と未粉碎試料(200~300 mm)、検量線の作成方法については線形重回帰分析(MLR)と部分最小二乗法による回帰分析(PLS)を用いて比較検討し、推定精度の検証を行なった。

1. CPについて、MLRを用いた検量線の推定精度は粉碎試料で $r=0.994$, $SDP=0.52$, $EI=6.03\%$, 未粉碎試料で $r=0.995$, $SDP=0.44$, $EI=5.03\%$ となった。PLSを用いた検量線の推定精度は、粉碎試料で $r=0.998$, $SDP=0.30$, $EI=3.52\%$, 未粉碎試料で $r=0.997$, $SDP=0.38$, $EI=4.34\%$ となり、PLSがMLRより高い推定精度を得た。

2. 乾物消化率について、MLRを用いた検量線の推定精度は粉碎試料で $r=0.980$, $SDP=2.02$, $EI=11.81\%$ 未粉碎試料で $r=0.978$, $SDP=2.11$, $EI=12.34\%$ となった。PLSを用いた検量線の推定精度は、粉碎試料で $r=0.985$, $SDP=1.74$, $EI=10.18\%$, 未粉碎試料で $r=0.980$, $SDP=1.98$, $EI=11.58\%$ となり、PLSがMLRより高い推定精度を得た。

3. 試料サイズについては、CP、乾物消化率ともに粉碎試料を用いた検量線がより高い精度を示したが、未粉碎試料においても十分な精度を得ることができた。

II 緒 言

NIRSは非破壊的な分析法であることから、迅速かつ同時に多成分の分析が可能であること、試薬・薬品が不要であり安価であること、化学分析に比べて高度な分析技術を必要としないことなど多くの利点を持つため、早くから飼料分析に応用され実用化されている。しかし、NIRSは光学的なデータを変数とした重回帰分析等による推定であり、飼料成分は数種の化学的性質の類似した物質群であることから、NIRS推定値と化学分析値は必ずしも一致するとは限らない。また、各種成分を構成する主要物質の化学的特徴の違いにより、分析精度および適用範囲が異なる¹⁾ので、試料の種類や分析項目ごとに検量線を作成する必要がある。

現在、NIRSを利用しての寒地型牧草およびサイレージの成分および栄養価について多くの研究が報告されている^{2~5)}が、沖縄で栽培されている暖地型牧草での報告は少ない。前報^{6, 7)}では、NIRSを用いて、ギニアグラスとパンゴラグラス(品種:トランスパーラ)のCPおよびペプシンセルラーゼ法による乾物消化率(*in vitro*)での検量線を作成し、高い推定精度を得た。本報では、沖縄で奨励品種に選定されている⁸⁾ローズグラス(品種:カタンボラ)を用いてCPと乾物消化率についての検量線を作成し、その推定精度を検証する。加えてサンプルの粉碎作業を省力化するために粉碎試料と、未粉碎試料について比較検討したので報告する。

III 材料および方法

1. 供試試料および調製

供試試料であるローズグラスは本試験場(国頭マージ土壤)で、圃場、生育ステージ、刈取間隔を変えて採取した100点を用い、化学分析値の成分範囲が同程度になるように検量線作成用試料60点と検定用試料40点に分けた。試料は200~300 mmに細断し、縮分したものを2つに分け72℃で48時間乾燥させた後、片方はカッティングミル(1 mmメッシュ)にて粉碎し、もう一方はそのまま未粉碎試料とした。

2. 分析方法

乾物消化率はペプシンセルラーゼ法⁹⁾、CPはケルダール法¹⁰⁾により求めた。

3. 検量線の作成

近赤外分光光度計はNIRSystem社 Model-6500型を用いて1100nm～2500nmの波長のスペクトルを測定し、得られた原スペクトルについては2次微分処理(微分条件:GAPO, Segment20)を行なった。粉碎試料は標準セルを用いた反射法による2回の反復測定、未粉碎試料は長方形型セルを用いた反射法による3回の反復測定^{11, 12)}を行なった。検量線作成についてはNSASソフトウェアを用い、MLRとPLSの2種類の方法で行なった。

MLRは成分由来の官能基が持つ吸収波長を説明変数として用いる重回帰分析である。波長については、尖突なピークは避け、波長の変化に対して安定した幅の広い吸収帯を選択¹³⁾した。また、補正のための波長を追加していき、第1波長から第4波長までの組み合わせにて、検量線の候補を作成した。

PLSは多変量解析法である主成分分析法を応用した方法で、全波長域における少数の無相関な主成分(因子)を説明変数として用いる解析法である。因子の選択についてはNSASソフトウェアを用いた。

4. 検量線の検定

作成した検量線は検定用試料40点により推定精度の検証を行ない、最適な検量線を決定した。推定精度の検証は、検定試料を未知飼料とした検量線の推定値と化学分析値の相関係数(r)、推定誤差の標準偏差(SDP)、および推定精度の評価指数であるEI¹⁴⁾を用いて比較した。

IV 結果および考察

供試試料の成分範囲を表1に示した。一般に、検量線の検定においては、検量線を作成した試料と同様な種類・レンジを持った試料群を用いることが最良とされている。今回の供試試料では、CPでの検量線作成用および検定用試料の成分レンジについては18.20%、17.29%と幅広いものであり、乾物消化率での成分レンジについても同様に35.71%、34.20%と幅広いレンジが得られ、供試試料としての条件を満たしていたと考えられる。

表1 供試試料の成分範囲(%DM)

分析項目	検量線作成用試料						検定用試料					
	n	最小値	最大値	レンジ	平均	SD	n	最小値	最大値	レンジ	平均	SD
CP	60	5.71	23.91	18.20	12.48	4.51	40	5.97	23.26	17.29	11.74	4.47
IVDMD	60	39.44	75.15	35.71	55.91	10.16	40	39.75	73.95	34.20	54.31	10.04

注1) CP:粗タンパク質含有率

2) IVDMD:乾物消化率(*in vitro*)

3) レンジ:最大値-最小値

MLRおよびPLSによる検量線作成結果を表2に示した。MLRによる検量線ではCPで各4波長、乾物消化率では粉碎試料で3波長、未粉碎試料で4波長を選択したものが最良の検量線となった。CPについては粉碎試料・未粉碎試料ともに2160nmを第1波長に選択しており、これらはタンパク質の代表的な吸収がある^{15, 16)}とされている波長付近であった。乾物消化率については粉碎試料で2259nm、未粉碎試料で2360nmを第1波長に選択しており、これらはリグニンの吸収があるとされる^{16, 17)}波長付近であった。リグニンは粗繊維の主たる構成物質で、植物の生長が進むとともに増大し、消化率とは負の相関を示すとされていること¹⁸⁾から乾物消化率と密接に関係があると思われる。

PLSによる検量線においては、CP・粉碎試料で因子数9、未粉碎試料で7、乾物消化率では粉碎試料・未粉碎試料ともに因子数8を選択した検量線が最良であった。

表2 MLRおよびPLSによる検量線の作成結果

項目	試料サイズ	MLR法					PLS法			
		使用波長 (nm)				r	SEC	因子数	r	SEC
1	2	3	4							
CP	粉碎	2160	1982	1966	2318	0.997	0.37	9	0.999	0.23
CP	未粉碎	2160	2266	1694	2006	0.993	0.54	7	0.997	0.38
IVDMD	粉碎	2259	1894	1492		0.981	2.04	8	0.992	1.41
IVDMD	未粉碎	2260	2372	1890	2342	0.987	1.71	8	0.991	1.45

注1) MLR: 線形重回帰分析

2) PLS: 部分最小二乗法による回帰分析

3) r: 検量線作成における相関係数

4) SEC: 検量線における標準誤差

MLRおよびPLSにより作成した検量線の推定精度を表3に示した。MLRを用いたCPでの検量線の推定精度は、粉碎試料で $r=0.994$, $SDP=0.52$, 未粉碎試料で $r=0.995$, $SDP=0.44$, 乾物消化率では、粉碎試料で $r=0.980$, $SDP=2.02$, 未粉碎試料で $r=0.978$, $SDP=2.11$ となった。

MLRにおいては推定する目的成分の吸収波長とされる波長を選択することが重要であり、CPについてはこれに準じる結果で、高い推定精度を得た。乾物消化率のように多くの物質が関与したものでは、検量線に用いる波長の特定は難しいとされているが、今回の検量線作成では、リグニンを中心とした繊維成分の波長を選択する事によって十分な推定精度を得ることができた。これらCPおよび乾物消化率における波長の選択や推定精度については、前報^{6, 7)}にて報告したギニアグラス、トランスパーラでの検量線と同様の傾向を示した。

PLSを用いたCPでの検量線の推定精度は、粉碎試料で $r=0.998$, $SDP=0.30$, 未粉碎試料で $r=0.997$, $SDP=0.38$, 乾物消化率では粉碎試料で $r=0.985$, $SDP=1.74$, 未粉碎試料で $r=0.980$, $SDP=1.98$ となった。MLRに比べPLSでは解析に用いる情報量を飛躍的に増やすことができ、物質由来の吸収とノイズを分離し易く、オーバーフィッティングが避けられる¹⁹⁾等の利点が挙げられている。そのため、牧草の栄養成分項目に関係なくPLSを用いた検量線の報告は多数あり^{20~22)}, 比較的精度の高い検量線が作成できるとされている。

MLRとPLSを推定精度で比較すると、試料サイズ(粉碎・未粉碎)や測定項目(CP・乾物消化率)において、PLSで作成した検量線が SDP , r ともに優れた結果となった。PLSにおいて作成した検量線におけるNIR値と化学分析値との関係を図1に示した。図1のようにCP, 乾物消化率について、NIRS推定値と化学分析値との間に高い相関が確認できた。

表3 検定試料におけるMLRおよびPLSによる検量線の推定精度

項目	試料サイズ	MLR				PLS			
		r	SDP	EI	評価	r	SDP	EI	評価
CP	粉碎	0.994	0.52	6.03	A	0.998	0.30	3.52	A
CP	未粉碎	0.995	0.44	5.03	A	0.997	0.38	4.34	A
IVDMD	粉碎	0.980	2.02	11.81	A	0.985	1.74	10.18	A
IVDMD	未粉碎	0.978	2.11	12.34	A	0.980	1.98	11.58	A

注1) MLR: 線形重回帰分析

2) PLS: 部分最小二乗法による回帰分析

3) r: 検量線検定における相関係数

4) SDP: 検量線の検定における標準誤差

5) $EI=2 \times SDP / \text{レンジ} \times 100$ (%)

A=very good (~12.4) B=good (12.5~24.9) C=fair (25.0~37.4) D=poor (37.5~49.9)

E=very poor (50.0~)

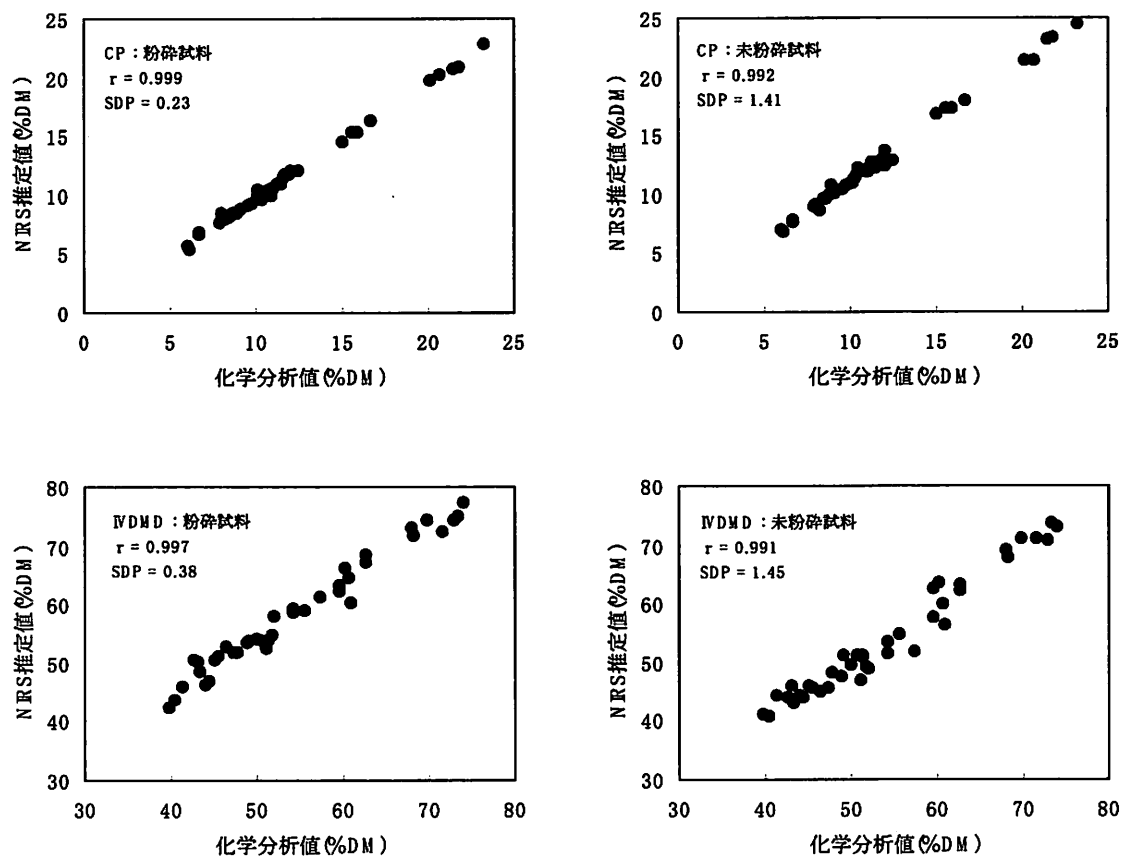


図1 PLSにより作成した検量線の検定用試料におけるNIRS値と化学分析値との関係

推定精度の評価指数であるEIにおいて、粉碎試料によるCPの検量線ではMLRで6.03%, PLSでは3.52%, 未粉碎試料においてもMLRで5.03%, PLSで4.34%と、すべてにおいてA評価となった。粉碎試料による乾物消化率については、MLRで11.81%, PLSでは10.18%, 未粉碎試料においてもMLRで12.34%, PLSで11.58%と、すべてにおいてA評価であった。以上のことから今回作成した検量線では、粉碎試料についてはCP、乾物消化率ともに高い推定精度が得られ、未粉碎試料についても粉碎試料よりは若干劣るが、十分な推定精度が得られることが分かり、試料のサイズに応じた検量線を作成することによって粉碎作業の省力化が可能になると考えられた。

V 引用文献

- 1) 自給飼料品質評価研究会(2001)改訂粗飼料品質評価ガイドブック, 日本草地畜産種子協会, 53-54
- 2) 水野和彦・石栗敏機・近藤恒夫・加藤忠司(1988)近赤外線反射率測定法による乾草の成分および栄養価の推定Ⅱ. 推定精度に及ぼす草種構成の影響および推定に有効な波長の検討, 草地試験場研究報告, 38, 48-54
- 3) 水野和彦・石栗敏機・近藤恒夫・加藤忠司(1988)近赤外線反射率測定法による乾草の成分および栄養価の推定Ⅲ. 栄養価の推定方法としての近赤外線反射率測定法と化学分析法の比較—オーチャードグラスについて—, 草地試験場研究報告, 38, 56-60
- 4) 垣内一明・脇大作・町田豊・千葉昭弘(2000)飼料作物の品質評価法の確立 第1報. 近赤外分析における一般成分, 繊維成分の検量線作成, 鹿児島県畜産試験場研究報告, 33, 52-54
- 5) Michael O' Keefe・Gerard Downey and James C Brogan(1987)The Use of Near Infrared Reflectance Spectroscopy for Predicting the Quality of Grass Silage, *J. Sci. Food. Agric.*, 38, 209-216

- 6) 長利真幸・守川信夫・當眞嗣平・望月智代(2003)近赤外分析法による暖地型牧草の成分および栄養価の推定(1)ギニアグラスにおける粗タンパク質含有率および乾物消化率の検量線作成, 沖縄畜試研報, 41, 113-117
- 7) 長利真幸・守川信夫・當眞嗣平・望月智代(2003)近赤外分析法による暖地型牧草の成分および栄養価の推定(2)パンゴラグラスにおける粗タンパク質含有率および乾物消化率の検量線作成, 沖縄畜試研報, 41, 118-122
- 8) 沖縄県農林水産部畜産課(1998)沖縄県牧草飼料作物奨励品種の特性及び栽培基準, 1
- 9) Goto, I. and D. J. Minson(1977) Prediction of the dry matter digestibility of tropical grasses using a pepsin-cellulase assay, *Animal Feed Science and Technology*, 2, 247-253
- 10) 自給飼料品質評価研究会(2001)改訂粗飼料品質評価ガイドブック, 日本草地畜産種子協会, 8-9,
- 11) 自給飼料品質評価研究会(2001)改訂粗飼料品質評価ガイドブック, 日本草地畜産種子協会, 68-69
- 12) 水野和彦・榊原敏之・杉田紳一・中山貞夫(1998)近赤外線反射測定法(NIRS)によるオーチャードグラス未粉碎試料の化学分析および分解率の簡易推定法, 日本草地学会誌, 44(別), 266-267
- 13) 甘利雅弘・阿部亮・田野良衛・榎木茂彦・芹沢駿治・古賀照章(1987)近赤外分析法による粗飼料の成分分析と栄養価の推定法Ⅰ. キャリブレーションの精度と未知飼料の推定精度, 日本草地学会誌, 33(3), 219-226
- 14) 水野和彦・石栗敏機・近藤恒夫・加藤忠司(1988)近赤外線反射率測定法による乾草の成分および栄養価の推定Ⅰ. 成分および栄養価の推定精度とその評価, 草地試験場研究報告, 38, 35-46
- 15) ニレコー-NIRS システムズ(1994)近赤外分光分析法技術資料Ⅲ, 18-19
- 16) 自給飼料品質評価研究会(2001)改訂粗飼料品質評価ガイドブック, 日本草地畜産種子協会, 61
- 17) 甘利雅弘・阿部亮・河野澄夫・趙爽光(1991)近赤外スペクトルにおける粗飼料中の繊維性成分の吸収特性, 畜産試験場研究報告, 51, 17-27
- 18) 阿部亮(1988)炭水化物成分を中心とした飼料分析法とその飼料栄養価評価法への応用 3)酸性デタージェント繊維とリグニン定量, 畜産試験場研究資料第2号, 23-29
- 19) 自給飼料品質評価研究会(2001)改訂粗飼料品質評価ガイドブック, 日本草地畜産種子協会, 54
- 20) 垣内一明・脇大作・町田豊・千葉明宏(2000)飼料作物の品質評価法の確立 第2報. 近赤外分析におけるローズグラス中の硝酸態窒素の検量線作成, 鹿児島県畜産試験場研究報告, 33, 55-57
- 21) 梅田剛利・小山太・高椋久次郎(2001)近赤外分光法による肉牛ふん堆肥の無機塩類含量の推定, 福岡県農業総合試験場研究報告, 20, 105-108
- 22) 金谷千津子・丸山富美子・清水雅代・赤江静雄・斉藤堅伸・石崎和彦・土屋いずみ・清水政浩・平尾賢一(1999)近赤外分析法による粗飼料の中性デタージェント繊維(NDF)の推定精度, 富山県畜産試験場研究報告, 14, 29-31

研究補助：竹内千夏，平良樹史，具志堅興司

ギニアグラス新品種育成

(1) 琉球1号および琉球3号の生産力予備試験

幸喜香織 蝦名真澄 稲福政史* 奥村健治**
伊藤康子

I 要 約

ギニアグラスの新品種候補である琉球1号と琉球3号について生産力予備試験を3年間にわたり実施したところ、その結果は以下のようであった。

1. 琉球1号の収量はナツユタカ並かやや多収である。
2. 琉球3号の収量はナツユタカ並で、葉身部割合が高い。
3. 琉球1号, 3号ともに永続性がナツユタカ並で、多年利用に適している。

3年間の多年利用調査の結果から、琉球1号および3号は収量および永続性についてナツユタカ並もしくはナツユタカをやや上回る特性をもつと考えられた。

II 結 言

ギニアグラスは沖縄県の永年草地のローズグラスの44.3% (2445ha) に次ぐ20.2% (1115ha) を占める暖地型牧草であり¹⁾、本県における栽培面積を伸ばしている草種である。ギニアグラスはローズグラスに比べて早ばつに強く、高温条件で高い収量を示す傾向がある^{2, 3)}。1988年、多収性と永続性を改良されたナツユタカが育成された⁴⁾。しかし出穂後急激に茎が粗剛化し、家畜の嗜好性や消化率が劣る点が指摘されており、^{5, 6)} 消化率を改良した新品種の育成が求められている。

本報では琉球1号および琉球3号における3年間の生産力予備試験の結果を報告する。

III 材料および方法

1. 試験方法試験地および試験圃場の土壌条件試験方法

試験は沖縄県本島北部の沖縄県畜産試験場内の圃場で実施した。土壌は国頭マージの細粒赤色土で、礫が多い酸性土壌である。

2. 供試材料および試験方法

供試材料は中生の琉球1号, ナツユタカ, 極晩生の琉球3号およびパープルギニアの合計4系統である。供試4系統を2002年3月3日播種し、苗を養成後5月14日に圃場移植した。試験区は4m²(2m×2m)に等間隔で16株配置して造成し、3反復を設けた。施肥管理は基肥としてN, P₂O₅, K₂Oをそれぞれ1, 1, 0.6kg/a, 刈取りごとに0.5, 0.2, 0.3kg/aを施用した。2002年(利用1年目)から2004年(利用3年目)にかけて毎年5回、琉球1号の出穂期を目安に形態特性調査および収量調査を行なった(表1)。形態特性調査では草丈, 稈長, 穂長, 葉身長, 葉身幅, 茎の太さおよび茎数を測定した。収量調査は生草収量および乾物収量について行なった。乾物消化率は利用2年目1番草では琉球1号, 琉球3号およびナツユタカを用いて、利用3年目2番草では琉球1号, 琉球3号, ナツユタカおよびパープルギニア

表1 各番草の刈取日

利用年	刈取日(月/日)				
	1番草	2番草	3番草	4番草	5番草
1年目	7/12	8/28	10/ 2	11/ 6	12/11
2年目	4/15	6/ 4	8/28	10/21	12/24
3年目	4/15	7/ 9	9/14	11/ 2	12/14

を用いて、それぞれペプシンセルラーゼ法⁷⁾により測定した。

IV 結果

1. 収量特性

収量特性を表2に示した。生草収量の利用1年目では系統間に有意差は認められなかった。しかし、琉球1号は利用2年目に3番草と5番草においてナツユタカよりも有意に高い収量を示したことから、合計生草収量が2685kg/aとなった。また、利用3年目ではナツユタカ比110%であった。乾物収量の利用1年目において琉球1号はナツユタカより低い収量であったが、利用2年目に613kg/a、ナツユタカ比121%となった。琉球1号の前年比は利用2年目に297%とナツユタカより高く、利用3年目に85%とナツユタカより劣っていた。

琉球3号の3年間の合計生草収量はナツユタカ並であったが利用2、3年目にナツユタカと同等で、最も多収であったパープルギニアとも同等の収量を示していた。各年度の合計乾物収量では各系統に有意差は認められなかったが、琉球3号は利用2年目に607kg/a、利用3年目に598kg/aと最も高い収量を示した。また琉球3号の前年比は利用2年目に291%とナツユタカより高く、利用3年目に99%とナツユタカよりやや劣った。利用2、3年目のパープルギニアの合計生草収量は琉球3号より高かったが、合計乾物収量では琉球3号が高くなった。

利用年	品種系統名	生草収量					合計	ナツユタカ比 前年比		乾物収量					合計	ナツユタカ比 前年比		
		1番草	2番草	3番草	4番草	5番草		%	%	1番草	2番草	3番草	4番草	5番草		%	%	
1年目	琉球1号	484	223	190	90	62	1050	90		92	50	37a	17	11	207	84		
	ナツユタカ	401	324	235	153	54	1168	100		83	83	46b	25	9	246	100		
	琉球3号	447	284	194	123	43	1092	93		78	64	35a	23	9	209	85		
	パープルギニア	519	310	189	143	48	1209	103		80	60	28a	25	8	200	81		
	LSD(0.05)	ns	ns	ns	ns	ns	ns			ns	ns	17	ns	ns	ns			
2年目	琉球1号	387	668	1065b	422	142b	2685b	135	256	67	140	270b	104	33b	613	121	297	
	ナツユタカ	364	629	518a	393	86a	1989a	100	170	79	142	158a	109	21a	508	100	206	
	琉球3号	282	827	780ab	705	68a	2662ab	134	244	51	168	197ab	175	16a	607	119	291	
	パープルギニア	273	707	1018b	824	78a	2899b	146	240	40	131	223ab	176	18a	589	116	294	
	LSD(0.05)	ns	ns	382	ns	51	692			ns	ns	92	ns	11	ns			
3年目	琉球1号	378	592a	851	251	37	2109ab	110	79	74b	169a	238	31	7	518	97	85	
	ナツユタカ	264	638a	689	288	39	1918a	100	96	55ab	207ab	221	44	9	536	100	105	
	琉球3号	240	971b	868	309	42	2429ab	127	91	48a	246b	252	43	10	598	112	99	
	パープルギニア	249	820ab	1141	390	53	2653b	138	92	44a	189ab	258	49	11	552	103	94	
	LSD(0.05)	ns	254	ns	ns	ns	692			25	67	ns	ns	ns	ns			

注) 異符号間で5%の有意差あり。

2. 乾物消化率

利用2年目1番草と利用3年目2番草の乾物消化率を表3および表4に示した。利用2年目1番草において琉球1号はナツユタカより有意に高い値を示し、琉球3号は最も高かった。利用3年目2番草の琉球1号はナツユタカと同程度であった。琉球3号はパープルギニアより低い値が、ナツユタカより高く50.1%を示した。

表3 利用2年目1番草における乾物消化率

品種系統名	乾物消化率(%)
琉球1号	58.5±2.4b
ナツユタカ	50.4±0.6a
琉球3号	59.2±1.0b
LSD(0.05)	4.0

注) 異符号間で5%の有意差あり。

表4 利用3年目2番草における乾物消化率

品種系統名	乾物消化率(%)
琉球1号	46.0±1.7a
ナツユタカ	44.5±2.5a
琉球3号	50.1±2.0b
パープルギニア	56.0±0.6c
LSD(0.05)	3.0

注) 異符号間で5%の有意差あり。

3. 形態特性

利用2年目の形態特性を表5に、利用3年目の形態特性を表6に示した。利用2年目、琉球1号は3番草、4番草の穂長がナツユタカより短く、他の番草でも同様の傾向がみられた。琉球1号は有意差が認められないものの茎数の多くなる傾向がみられた。利用3年目の3番草では琉球1号の草丈がナツユタカよりも短くなった。草丈や稈長では他の番草でも同様の傾向がみられた。利用2年目と同様に各番草において琉球1号の穂長はナツユタカより短くなる傾向があり、茎数は多くなる傾向がみられた。

琉球3号とパープルギニアは極晩生であるため利用2年目では1番草と4番草、利用3年目では4番草のみ出穂がみられた。琉球3号は利用2年目および3年目ともに葉身長が最も長くなる傾向がみられた。また葉身幅においても琉球3号、パープルギニアともに琉球1号、ナツユタカよりも有意に広くなった。

表5 利用2年目の形態特性

番草	品種系統名	草丈 cm	稈長 cm	穂長 cm	葉身長 cm	葉身幅 cm	茎の太さ mm	茎数 本
1番草	琉球1号	117.8ab	112.5	23.3	30.4a	1.5b	2.0	895b
	ナツユタカ	141.8b	133.4	27.6	25.3a	1.2a	2.1	645ab
	琉球3号	125.8ab	87.0	31.0	71.6b	1.9c	2.7	505a
	パープルギニア	102.2a	84.0	43.0	58.8b	1.9c	1.6	583a
	LSD(0.05)	26.1	ns	ns	16.5	0.3	ns	279
2番草	琉球1号	217.6b	180.1	37.5	40.5a	1.5a	1.8	387
	ナツユタカ	215.0b	173.3	41.7	40.9a	1.5a	1.8	241
	琉球3号	202.3ab	-	-	132.4c	3.2b	-	277
	パープルギニア	164.3a	-	-	95.7b	3.0b	-	311
	LSD(0.05)	43.0	ns	ns	15.5	0.8	ns	ns
3番草	琉球1号	213.2b	181.7	31.5a	33.3a	1.7a	1.7	113
	ナツユタカ	232.8b	192.3	40.4b	38.5a	1.6a	2.0	93
	琉球3号	209.6ab	-	-	103.1c	3.3b	-	84
	パープルギニア	185.2a	-	-	82.0b	3.5b	-	93
	LSD(0.05)	26.8	ns	1.8	8.3	0.5	ns	ns
4番草	琉球1号	174.8ab	150.4	24.4a	29.7a	1.7a	1.2a	112ab
	ナツユタカ	187.6ab	156.5	31.1bc	36.4ab	1.6a	1.3a	137b
	琉球3号	197.1b	177.7	34.6c	53.0b	3.3b	1.9b	63a
	パープルギニア	165.5a	145.0	29.1b	42.5ab	3.5b	1.9b	102ab
	LSD(0.05)	25.3	ns	4.4	21.4	0.5	0.6	68
5番草	琉球1号	84.9	68.6	16.3	28.8	1.2	0.8	-
	ナツユタカ	31.6	49.2	12.2	42.0	1.2	0.5	-
	琉球3号	76.3	-	-	47.1	1.8	-	-
	パープルギニア	61.3	-	-	42.6	1.1	-	-
	LSD(0.05)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

注1) 異符号間で5%の有意差あり。

2) -は欠測。

表6 利用3年目の形態特性

番草	品種系統名	草丈	稈長	穂長	葉身長	葉身幅	茎の太さ	茎数 本
1番草	琉球1号	121.2ab	100.3	20.9	27.4ab	1.4ab	0.9	306b
	ナツユタカ	138.3b	115.7	22.6	24.6a	1.0a	1.2	157a
	琉球3号	101.8a	-	-	66.9c	2.0c	-	114a
	パープルギニア	97.1a	-	-	51.3bc	1.7bc	-	169a
	LSD(0.05)	27.3	ns	ns	26.0	0.7	ns	57
2番草	琉球1号	195.2b	169.1a	26.1	33.1a	1.4a	1.3	158b
	ナツユタカ	218.2b	186.5b	31.7	33.4a	1.6a	1.8	120ab
	琉球3号	191.8b	-	-	103.3c	3.1b	-	74a
	パープルギニア	156.5a	-	-	79.8b	2.9b	-	110ab
	LSD(0.05)	29.9	9.9	ns	18.2	0.8	ns	64
3番草	琉球1号	210.2c	181.4	28.8a	25.7a	1.4a	1.0	152b
	ナツユタカ	252.0d	212.5	39.5b	32.1a	1.5a	1.1	86a
	琉球3号	173.8b	-	-	90.0b	2.3b	-	91a
	パープルギニア	141.8a	-	-	87.8b	2.8b	-	149b
	LSD(0.05)	26.0	ns	0.6	9.2	0.8	ns	41
4番草	琉球1号	123.2ab	101.9	21.3a	23.4a	1.3a	1.0a	212
	ナツユタカ	138.0b	113.7	24.3ab	27.9a	1.2a	1.1a	167
	琉球3号	122.8a	104.0	30.4c	40.7b	2.3c	1.9b	93
	パープルギニア	122.6a	104.9	28.1bc	31.6ab	1.7b	1.7b	116
	LSD(0.05)	15.2	ns	3.9	9.5	0.4	0.6	ns
5番草	琉球1号	44.8a	36.9	15.3	15.3a	1.1b	1.0	488b
	ナツユタカ	51.6ab	-	-	34.7b	1.0a	-	396ab
	琉球3号	56.2b	24.2	13.2	38.1b	1.6d	1.2	200a
	パープルギニア	56.1b	-	-	40.6b	1.5c	-	316ab
	LSD(0.05)	10.5	ns	ns	6.5	0.1	ns	229

注1) 異符号間で5%の有意差あり。

2) -は欠測。

IV 考 察

ギニアグラスは本県では多収で永続性も兼ねていることから利用が広がっており、新品種の育種目標としては消化率の改善などが挙げられる。琉球1号は有性生殖⁸⁾の交雑後代⁹⁾より採種性と秋の緑度が改善されている系統として選抜された。また琉球3号はケニアから収集された遺伝資源から派生した極晩生系統^{10, 11)}で、収量が高く県内では11月下旬に出穂する特性で選抜された。本試験ではこれら2系統を供試し、ナツユタカおよびパープルギニアを比較品種として、3年間の収量性、乾物消化率および形態特性を調査した。

琉球1号は利用2年目においてナツユタカと草丈や稈長が同等で、合計乾物収量がナツユタカ比121%と高くなった。利用3年目では琉球1号の草丈や稈長はナツユタカより短く、合計乾物収量はほぼ同等であった。これは琉球1号の利用2および3年目の茎数がナツユタカを上回っていたためと考えられる。また琉球1号は利用2年目1番草でナツユタカより高い乾物消化率となったが、利用3年目2番草ではナツユタカ並となった。琉球1号はナツユタカと同様の中生で、ナツユタカより出穂の集中(ピーク)時期が広い¹²⁾。そのため、ギニアグラスの中でも出穂後急激に茎が粗剛化する^{5, 6)}ナツユタカより品質低下がゆるやかとなり、ナツユタカ並かややナツユタカを上回る乾物消化率となったと考えられる。

琉球3号は3年間の合計生草収量はパープルギニアより低かったが、合計乾物収量ではパープルギニアより高く、ナツユタカ並かやや高い収量を示した。乾物消化率は利用2年目1番草、利用3年目2番草でともに高かった。ギニアグラスでは葉身部割合が高く乾物消化率が高い系統でも出穂とともに乾物消化率が低下する傾向が認められている¹³⁾。そのため、利用期間にほとんど出穂が認められない琉球3号のような極晩生系統で乾物消化率が高くなる傾向が認められたと考えられる。

永続性は長年の観察から評価するため、3年間で評価することは困難である。そのため本報では前年の収量と比較した収量の比を前年比として、永続性を推定する評価基準とし、供試した系統について検討を行なった。琉球1号は利用2年目の乾物収量でナツユタカを大きく上回る前年比となった。利用3年目では前年比85%とナツユタカより劣ったが、これは利用2年目の収量が高いためであると考えられた。また、琉球3号では利用2年目で琉球1号同様にナツユタカを大きく上回る前年比となり、利用3年目では99%でナツユタカよりやや劣った。ナツユタカは沖縄県での系統適応性試験結果や現場の栽培状況などから、ギニアグラスの中で最も本県に適した永続性の高い系統である^{14~16)}。そのため、琉球1号で利用3年目の前年比が若干低いものの、琉球1号および3号の永続性は高く、多年利用に適した系統と考えられた。

今後は琉球1号および3号を用いて系統性適応試験を実施し、本県における適性を詳細に調査する予定である。

VI 引用文献

- 1) 沖縄県農林水産部畜産課(2003) おきなわの畜産, 15
- 2) 北村征生・阿部二郎・堀端俊造(1982)南西諸島におけるイネ科飼料作物の栽培と利用 I, 日草誌, 28(1), 33-40
- 3) 川鍋祐夫・平川孝行(1971)暖地型牧草の生態と栽培利用上の課題(4), 畜産の研究, 25(12), 1570-1574
- 4) 農林水産省九州農業試験場(1988)ギニアグラス「九州5号」に関する試験成績書, 1-44
- 5) 稲福政史(2003)ギニアグラスを利用した沖縄の肉用牛生産技術, 畜産技術, 579, 32-35
- 6) 新田孝子・長崎祐二・池田正治(1991)暖地型牧草(ローズグラス, ギニアグラス)の消化率の時間的変化, 沖縄畜試研報, 29, 95-97
- 7) Goto, I. and Minson D. J. (1977) Prediction of the dry matter digestibility of tropical grass using a pepsin-cellulase assay, *Animal Feed Science and technology*, 2, 247-253
- 8) Nakajima K, Komatu T, Motizuki N, Suzuki S, (1979) Isolation of diploid and tetraploid sexual plants in guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.), *Japan J. Breed*, 29, 228-238
- 9) Nakagawa H (1995) Cytogenetical study and breeding and of some tropical grass, *bull Hiroshima Agri Res Cent*, 58, 99-124
- 10) 幸喜香織・蝦名真澄・稲福政史・高原学・霍田真一・明石良・山本俊也・奥村健治・中川仁・中島卓

-
- 介(2004)ギニアグラス SSR マーカーの開発と系統識別, 育種学研究, 6(2), 370
- 11) 鶴見義朗・春日重光・Kamei J. KIPSAAT・Clement K. KARAI(1997)ケニアにおけるソルガム属草種の遺伝資源の探索収集, 植物遺伝資源探索導入調査報告書, 13, 123-151
- 12) 奥村健治・稲福政史・幸喜香織・知念司(2002)ギニアグラスの採種性の向上, 九農研, 64, 123
- 13) 幸喜香織・伊藤康子・稲福政史・奥村健治・蝦名真澄・守川信夫(2003)高消化性ギニアグラス育成のための選抜法の開発, 沖縄畜試研報, 41, 123-130
- 14) 前川勇・清水矩宏・庄子一成・伊佐真太郎・大城真栄・仲宗根一哉・福地稔(1985)パニカム属草種の品種・系統比較第1報, 沖縄畜試研報, 23, 41-61
- 15) 玉代勢秀正・前川勇・伊佐真太郎・仲宗根一哉・庄子一成・森山高広・大城真栄(1988)パニカム属草種の品種・系統比較第2報, 沖縄畜試研報, 26, 13-29
- 16) 玉代勢秀正・前川勇・伊佐真太郎・仲宗根一哉・庄子一成・森山高広・大城真栄(1988)牧草育種及び飼料作物の適応性試験, 沖縄畜試研報, 26, 31-39
-

研究補助：比嘉正徳, 比嘉伸也, 西表由一, 嘉数薫

ギニアグラス新品種育成

(2) 琉球2号の生産力予備試験

幸喜香織 蝦名真澄 稲福政史* 奥村健治**
伊藤康子

I 要 約

ギニアグラスの新品種候補である琉球2号について生産力予備試験を3年間にわたり実施したところ、その結果は以下のものであった。

1. 琉球2号の合計生草収量は利用1年目で最も高く、利用2および3年目はガットン並であった。
2. 琉球2号の永続性は利用3年間でガットン並である。

3年間の多年利用調査の結果から、琉球2号の収量と永続性はガットン並であり、永年利用向けの系統である。また利用1年目の収量性が高いことから、九州地方での単年利用も可能な系統であることが示唆された。

II 緒 言

ギニアグラスは沖縄県の永年草地のローズグラスの44.3% (2445ha) に次ぐ20.2% (1115ha) を占める暖地型牧草であり¹⁾、本県における栽培面積を伸ばしている草種である。ギニアグラスはローズグラスに比べて早ばつに強く、高温条件で高い収量を示す傾向がある^{2,3)}。しかし種子の脱粒性が強いために、採種が非常に困難なことから、流通種子の販売価格はローズグラスよりも高値になっている。そのため自給飼料を活用した低コスト畜産経営のためには脱粒性もしくは採種性は重要な育種目標である。

本報では採種性に優れた⁴⁾ 琉球2号における3年間の生産力予備試験の結果を報告する。

III 材料および方法

1. 試験地および試験圃場の土壌条件試験方法

試験は沖縄県本島北部の沖縄県畜産試験場内の圃場で実施した。土壌は国頭マージの細粒赤色土で、礫が多い酸性土壌である。

2. 供試材料および試験方法

供試材料は早生の琉球2号、ガットンおよびマクエニの合計3系統である。供試3系統を2002年3月3日播種し、苗を養成後5月14日に圃場移植した。試験区は4m²(2m×2m)に等間隔で16株を配置して造成し、3反復を設けた。施肥管理は基肥としてN、P₂O₅、K₂Oをそれぞれ1、1、0.6kg/a、刈取りごとに0.5、0.2、0.3kg/aを施用した。2002年(利用1年目)から2004年(利用3年目)にかけて毎年5回、琉球2号の出穂期を目安に収量調査を行なった(表1)。収量調査は生草収量、乾物収量について行なった。形態特性調査では草丈、稈長、穂長、葉身長、葉身幅、茎の太さおよび茎数を測定した。乾物消化率は利用2年目1番草に琉球2号とガットン、利用3年目2番草に琉球2号、ガットンおよびマクエニを用いて、それぞれペプシンセルラーゼ法⁵⁾により測定した。

表1 各番草の刈取日

利用年	刈取日 (月/日)				
	1番草	2番草	3番草	4番草	5番草
1年目	6/28	8/7	9/12	10/11	11/19
2年目	4/15	6/4	7/22	8/28	10/21
3年目	4/15	7/9	9/14	11/2	12/14

IV 結 果

1. 収量特性

3年間の収量特性を表2に示した。利用1年目の生草収量は琉球2号が2, 3, 4および5番草で有意に高くなったため、合計生草収量も1182kg/a、ガットン比141%となった。乾物収量は琉球2号が3, 4および5番草で有意に高くなったが、合計乾物収量は同等であった。利用2年目および3年目の合計生草収量および合計乾物収量では各系統に有意差は認められなかった。琉球2号の乾物収量の前年比は利用2年目が126%に最も低くなったが、利用3年目では115%とマクエニと同等であった。

表2 収量特性

利用年	品種系統名	生草収量					合計	ガットン比		乾物収量					合計	ガットン比	
		1番草	2番草	3番草	4番草	5番草		%	%	1番草	2番草	3番草	4番草	5番草		%	%
1年目	琉球2号	358	342c	196c	120b	166c	1182b	141		63	72	30c	18b	68b	251	107	
	ガットン	248	238b	130b	81a	141b	838ab	100		54	59	23b	14b	85c	235	100	
	マクエニ	278	196a	100a	51a	102a	728a	87		58	46	17a	9a	56a	186	79	
	LSD(0.05)	ns	30	25	33	25	422			ns	ns	4	5	5	ns		
2年目	琉球2号	96a	376	266	447c	286b	1470	93	124	14a	69	73	91c	68b	315	82	126
	ガットン	222b	396	313	340b	301b	1573	100	188	42b	84	92	81b	85c	384	100	164
	マクエニ	234b	295	236	268a	194ab	1228	90	169	47b	70	69	67a	56a	309	80	166
	LSD(0.05)	48	ns	ns	66	33	ns			7	ns	ns	9	7	ns		
3年目	琉球2号	234	457b	563	253	63	1570	106	107	41a	127	153	29	12	362	94	115
	ガットン	242	340a	515	334	45	1476	100	94	55ab	111	166	44	9	386	100	100
	マクエニ	306	391ab	348	209	37	1291	87	105	71b	133	117	30	8	358	93	116
	LSD(0.05)	ns	70	ns	ns	ns	ns			25	ns	ns	ns	ns	ns		

2. 乾物消化率

利用2年目1番草と利用3年目2番草の乾物消化率を表3と表4に示した。利用2年目1番草において琉球2号は67.9%と高い乾物消化率を示した。利用3年目2番草では琉球2号は47.0%とガットン並の乾物消化率を示した。

表3 利用2年目1番草における乾物消化率

品種系統名	乾物消化率(%)
琉球2号	67.9±3.4b
ガットン	58.8±1.8a
LSD(0.05)	4.0

注) 異符号間で5%の有意差あり。

表4 利用3年目2番草における乾物消化率

品種系統名	乾物消化率(%)
琉球2号	47.0±0.5b
ガットン	46.2±2.8b
マクエニ	40.0±1.5a
LSD(0.05)	3.0

注) 異符号間で5%の有意差あり。

3. 形態特性

利用した3年間の1番草の形態特性を表3に示した。利用1年目、琉球2号は葉身幅が有意に広く、茎数ではガットン並となった。利用2年目および3年目においてマクエニは草丈、稈長が最も高かった。利用2年目、ガットンは茎数が最も多かった。

表3 1番草の形態特性

利用年	品種系統名	草丈 cm	稈長 cm	穂長 cm	葉身長 cm	葉身幅 cm	茎の太さ mm	茎数 本
1年目	琉球2号	142.4	127.6	25.0	40.3	28.1b	3.3	46b
	ガットン	143.2	128.8	26.3	39.2	21.5a	3.0	37b
	マクエニ	156.7	128.5	28.2	41.8	22.2a	3.3	28a
	LSD(0.05)	ns	ns	ns	ns	0.2	ns	14
2年目	琉球2号	70.5a	63.6a	17.9	22.5	1.3	1.8	499a
	ガットン	88.5b	87.6b	17.0	27.8	1.4	1.8	839b
	マクエニ	119.5c	114.6c	19.5	24.4	1.4	1.8	639a
	LSD(0.05)	14.6	11.3	ns	ns	ns	ns	209
3年目	琉球2号	111.3a	93.0a	18.2	25.5b	1.3	0.9	232
	ガットン	120.8a	102.5a	18.4	25.5b	1.3	1.0	227
	マクエニ	158.2b	137.8b	20.4	21.4a	1.5	1.0	258
	LSD(0.05)	16.6	15.5	ns	2.7	ns	ns	ns

注) 異符号間で5%の有意差あり。

IV 考 察

ギニアグラスは易脱粒性のため採種性が低く、しかし難脱粒性系統は種内でみつかっていないため採種性の向上は困難である⁶⁾。そのため、眞田ら⁷⁾はギニアグラスの高採種性系統の選抜基準として穂数が有効な指標であるとした。また奥村ら⁸⁾は穂数に加えて、出穂が一斉でさらに小穂密度の高い系統を選抜することが有効であると報告した。琉球2号は早生で小型の穂をもち、穂数が多く開花が一斉に起こるため採種性が高い系統として選抜された⁴⁾。

本試験では琉球2号を供試し、ガットンおよびマクエニを比較品種として生産力予備試験を行ない、収量特性、乾物消化率および形態特性を調査した。利用1年目の合計乾物収量は他の品種と比較し有意差は認められないものの最も高い値を示した。利用1年目の収量が見込めることから九州地方での単年利用も可能な系統であると考えられた。また、利用2および3年目ではガットン並の合計乾物収量であった。前年比がガットンより低いが、これは利用1年目の収量が高いため、永続性はガットン並と考えられる。そのため、沖縄県の多年栽培にも利用可能な系統であると考えられる。

乾物消化率において琉球2号は利用2年目1番草でガットンより高く67.9%を示した。乾物消化率は1月から4月の低温時期に高くなる傾向が認められており⁹⁾、また、ギニアグラスでは4月の1番草で最も高い乾物消化率が得られる傾向が認められている¹⁰⁾。そのため、1番草でこのように高い乾物消化率を示したものと考えられる。さらに、琉球2号は開花が一斉で穂数が多く、消化率の低下が問題となりやすい形質を備えているが、茎が粗剛化は認められないため、高い乾物消化率を示したと考えられる。

以上のことから、琉球2号は採種性に優れ⁴⁾、利用1年目の収量が高く、ガットン並の収量と永続性をもつ新品種候補であると考えられる。今後は琉球2号の系統性適応試験を実施するにあたって、乾物消化率などの形質について詳細に調査する予定である。

VI 引 用 文 献

- 1) 沖縄県農林水産部畜産課(2003)おきなわの畜産, 15
- 2) 北村征生・阿部二郎・堀端俊造(1982)南西諸島におけるイネ科飼料作物の栽培と利用 I, 日草誌, 28(1), 33-40
- 3) 川鍋祐夫・平川孝行(1971)暖地型牧草の生態と栽培利用上の課題(4), 畜産の研究, 25(12), 1570-1574
- 4) 奥村健治・稲福政史(1999)ギニアグラスの採種性に及ぼす要因の解明 I, 日草誌, 45(別), 134-135
- 5) Goto, I. and Minson D. J. (1977) Prediction of the dry matter digestibility of tropical grass using a pepsin-cellulase assay, *Animal Feed Science and technology*, 2, 247-253
- 6) 中島卓介・超智茂登一・望月昇(1977)ギニアグラスとカラードグラスの種内変異の比較, 10, 60-73
- 7) 眞田康治・松岡秀道(1998)ギニアグラス (*Panicum maximum* Jacq.) 及び *Panicum* 属の脱粒性と採種性の変異, 日草誌, 44, 272-277
- 8) 奥村健治・稲福政史・幸喜香織・知念司(2002)ギニアグラスの採種性の向上, 九農研, 64, 123
- 9) 北村征生・阿部二郎・堀端俊造(1982)南西諸島におけるイネ科飼料作物の栽培と利用 II, 日草誌, 28(1), 41-47
- 10) 幸喜香織・伊藤康子・稲福政史・奥村健治・蝦名真澄・守川信夫(2003)高消化性ギニアグラス育成のための選抜法の開発, 沖縄畜試研報, 41, 123-130

ギニアグラス新品種候補「琉球1号」のサイレージ発酵品質に及ぼす乳酸菌製剤「畜草1号」の添加効果

蝦名真澄 蔡義民* 當眞嗣平 幸喜香織
守川信夫

I 要 約

ギニアグラス新品種候補琉球1号はナツユタカより消化性および採種性に優れ、ガットンより収量性が高いことから選抜された系統である¹⁾。利用面での特性として収量性が高く採草利用されることの多いギニアグラスでは良質なサイレージの調製と貯蔵が重要であると考えられる。本研究では、近年イネ発酵飼料用に開発された乳酸菌製剤畜草1号 (*Lactobacillus plantarum* Chikuso-1)^{2, 3)}を用いて、ギニアグラスのサイレージの発酵品質の改善効果を検討した。ギニアグラス新品種候補系統琉球1号、ガットンおよびナツユタカを供試し、刈り取り直後に乳酸菌製剤畜草1号を0.1%添加して小規模サイレージ発酵試験法(パウチ法)でサイレージを調製して発酵品質を分析したところ、結果は以下のとおりであった。

1. 各品種のサイレージ pH は畜草1号の添加によって有意($P < 0.01$)に低下した。
2. 畜草1号を添加しないサイレージでは乳酸はほとんど蓄積しないのに対して、畜草1号の添加によって有意($P < 0.05$)に増加した。
3. 酪酸およびアンモニア態窒素の含量は畜草1号の添加によって有意($P < 0.01$)に減少した。
4. サイレージ発酵における微生物菌叢については、畜草1号の添加によって乳酸菌は増加し、大腸菌類は検出限界以下に減少した。
5. 品種と畜草1号の添加の交互作用は認められず、用いた全ての品種で畜草1号のサイレージ発酵品質に対する高い添加効果が認められた。

以上のことから、畜草1号を0.1%添加することによって、暖地におけるギニアグラスのサイレージ発酵品質は改善されると考えられた。

II 結 言

ギニアグラスは沖縄県ではローズグラス(2445ha, 44.3%)に次いで普及(1115ha, 20.2%)している主要牧草である⁴⁾。耐干性などの環境適応性に優れ、安定した高い収量が期待でき、種子で草地を造成できることからギニアグラスの利用が広まってきた⁵⁾。しかし、ローズグラスなどに比べてサイレージ発酵品質が低質であることなどが指摘され、付着乳酸菌をあらかじめ予備培養した発酵液を添加する方法や予乾処理を十分に行う方法、乳酸菌発酵を促進するため糖蜜を添加する方法およびそれらの処理を組み合わせる方法などが検討されている^{6, 7)}。しかし、さまざまな方法が検討されているにもかかわらず、ギニアグラスのサイレージ発酵品質に大きな改善は認められない。これは、材料草に付着する乳酸菌の発酵能力が不十分であることが原因の一つとして考えられる。畜草1号はイネ発酵粗飼料用に開発された、乳酸発酵能力が優れるホモ発酵型乳酸菌であり^{2, 3)}、サイレージの乳酸発酵が円滑に進まない性質のある稲わら等においても、高品質なサイレージの調製効果が実証されている^{2, 3)}。そのため、暖地型牧草ギニアグラスのサイレージ発酵においても高い発酵能力を発揮する可能性が高いと考えられた。そこで、ギニアグラス新品種候補琉球1号、品種ガットンおよびナツユタカを材料草とし、畜草1号を添加したサイレージの発酵品質を検討した。

III 材料および方法

1. 材料草

材料草はギニアグラス品種候補系統琉球1号、品種ガットンおよびナツユタカの2品種1系統を用いた。供試した材料は、平成14年6月より16株を移植し栽培を開始した利用3年目の2m四方の小型模擬

草地から収穫した。刈り取りは平成16年11月10日の5番草(再生50日目)の出穂揃い期に行ない、刈り取り直後の材料草を約1cm間隔に細断して以後の実験に用いた。

材料草の一般飼料成分は、上記の材料草を70℃にて48時間乾燥処理し、常法⁸⁾にて分析した。

2. サイレージ調製

サイレージ調製は無予乾にて、材料草の400gをプラスチックフィルム(パウチ)に入れ⁹⁾、無添加および畜草1号0.1%添加の処理を行ない、吸引脱気した後、密封して行なった。これらを27℃の恒温槽にて30日保存後、開封してサイレージ発酵の分析に供試した。

畜草1号(雪印種苗製)は市販の乾燥粉末状の製剤を用いた。

3. 化学分析

化学分析は蔡ら²⁾の方法に従い行なった。水分含量は加熱乾燥法¹⁰⁾、pHはガラス電極法、アンモニア態窒素は水蒸気蒸留法および有機酸組成は高速液体クロマトグラフ法によりそれぞれ測定した。

4. 菌体数の確認

菌体数は化学分析同様に蔡ら²⁾の方法に従い行なった。乳酸菌はLactobacilli MRS寒天培地(DIFCO Laboratories)を使用して¹¹⁾、嫌気培養装置(ANX-1, ヒラサワ株式会社, 東京)により37℃で2日間培養した。好気性細菌と大腸菌は普通寒天培地(日水製薬株式会社製)を使用して¹²⁾、30℃で2日間培養した。糸状菌と酵母は、10%酒石酸を加えてpHを3.5に調製したポテト・デキストロース寒天培地(日水製薬株式会社製)を用いて¹²⁾30℃で2日間培養した。なお、各微生物の菌数は新鮮試料1g当たりのコロニー形成数(cfu/g)で表示した。

IV 結 果

畜草1号を添加した場合と添加しない場合の材料草のサイレージ発酵品質および微生物菌種構成を表1に示す。pHは、用いた2品種1系統でどの場合も無添加サイレージに比べて畜草1号の添加効果によって有意に低下した。無添加の場合はpH5.27~5.43の範囲であったが、畜草1号の添加により、pH4.38~4.51となり、ナツユタカサイレージで最も低いpH4.38となった。また、無添加サイレージ中の乳酸の含量は現物中0.00~0.02%(FM)の範囲となり、ほとんど乳酸が認められなかったのに対して、畜草1号を添加することにより、0.25~0.56%FMと全ての材料草で有意に高くなった。乳酸の含量は畜草1号添加のナツユタカサイレージで最も高く、0.56%FMであった。また、酢酸含量およびプロピオン酸含量は畜草1号の添加で琉球1号およびナツユタカサイレージで有意に減少した。さらに、酪酸含量およびアンモニア態窒素の含量はどの材料草を用いたサイレージでも畜草1号の添加によって有意に減少した。

微生物の菌種構成では、畜草1号の添加により、どの材料草を用いたサイレージでも乳酸菌が顕著に増加し、琉球1号サイレージで最も多くの乳酸菌が認められた。好気性菌は無添加のナツユタカサイレ

表1 30日間貯蔵したサイレージの発酵品質と微生物の構成

材料草 処理	琉球1号		ナツユタカ		ガットン	
	無添加	添加	無添加	添加	無添加	添加
発酵品質						
pH	5.37 ^B	4.51 ^A	5.27 ^B	4.38 ^A	5.43 ^B	4.49 ^A
乳酸(%FM)	0.02 ^b	0.25 ^a	0.00 ^b	0.56 ^A	0.02 ^B	0.38 ^A
酢酸(%FM)	0.53 ^b	0.33 ^a	0.42 ^B	0.14 ^A	0.25	0.20
プロピオン酸(%FM)	0.18 ^B	0.06 ^A	0.06 ^B	0.00 ^a	0.06	0.01
酪酸(%FM)	0.39 ^B	0.21 ^A	0.38 ^B	0.12 ^A	0.23 ^b	0.12 ^a
アンモニア態窒素(%FM)	0.78 ^B	0.41 ^A	0.53 ^B	0.26 ^A	0.49 ^B	0.28 ^A
微生物の菌種構成						
乳酸菌	4.83	7.04	5.43	6.29	4.61	6.99
酵母	N.D.	N.D.	6.70	N.D.	N.D.	N.D.
好気性菌	4.00	3.15	6.45	2.88	4.04	4.98
大腸菌類	3.04	N.D.	3.48	N.D.	3.95	N.D.
桿菌類	3.53	3.45	2.49	4.20	2.60	1.48

注) 同品種内で同行の異符号間に有意差あり(大文字 P<0.01, 小文字 P<0.05)。

添加: 畜草1号を材料草の生草重に対して0.1%で添加。

FM: 現物(fresh matter)

微生物の構成: log₁₀(cfu/gFM)で表示。cfuはコロニー数, colony-forming unit。

N.D.: 検出されず, not detected。

ージで最も高い値を示し、畜草1号を添加した琉球1号とナツユタカサイレージで添加効果が認められ、減少した。また、畜草1号を添加したサイレージでは大腸菌類は検出されなかった。

表2にサイレージ発酵品質の分散分析表を示す。pH、酢酸、プロピオン酸、酪酸およびアンモニア態窒素の含量で品種間の差異が認められた。畜草1号の添加効果は全ての項目において有意に認められ、品種と添加による交互作用は全てにおいて認められなかった。サイレージ発酵品質の品種間差異では、琉球1号サイレージが畜草1号の無添加区でプロピオン酸、酪酸およびアンモニア態窒素の含量が他の2品種に比べ高い傾向が認められた。また、畜草1号の添加区においても琉球1号サイレージでは、酢酸および酪酸の含量が他の2品種に比べ高い傾向が認められた。

表2 サイレージ発酵品質の分散分析表

要因	自由度	pH	乳酸	酢酸	プロピオン酸	酪酸	アンモニア態窒素
品種	2	*	ns	*	**	**	**
添加	1	**	**	**	**	**	**
品種×添加	2	ns	ns	ns	ns	ns	ns

注) **: P<0.01, *: P<0.05, ns: 有意差なし

材料草の成分を表3に示す。琉球1号はナツユタカおよびガットンに比べ粗灰分、粗タンパクが高く、また、ナツユタカに比べ、粗脂肪、Oaが高い傾向が認められた。また、琉球1号はナツユタカに比べADF、NDF、OCW、Obが低くガットン並で、OCCについてはガットンより低くナツユタカ並みであった。また、琉球1号は水分含量が最も高く、乾物率が低い傾向があった。

表3 材料草の成分

材料草	琉球1号	ナツユタカ	ガットン
粗灰分	9.91	8.67	8.92
粗脂肪	1.84	1.73	2.43
粗タンパク	11.33	8.75	10.33
ADF	41.49	42.33	39.94
NDF	70.54	73.14	70.05
OCW	70.90	72.23	69.46
OCC	19.20	19.10	21.61
Ob	59.77	62.09	57.79
Oa	11.13	10.14	11.68
水分含量	73.5	70.8	71.9

注) 水分含量を除き単位は%DM(乾物あたり%), 水分含量は%FM

ADF: 酸性デタージェント繊維, NDF: 中性デタージェント繊維, OCW: 細胞壁物質, OCC: 細胞内容物, Ob: 低消化性繊維, Oa: 高消化性繊維

V 考 察

ギニアグラス新品種候補の琉球1号は収量性、消化性および採種性が優れた系統として選抜された¹⁾。県内ではギニアグラスは永年生の採草用として利用されており、高い収量が得られることからサイレージ調製用としても広く栽培されている⁴⁾。育種選抜の初期段階でサイレージ調製の適性を検討することは極めて困難であるが、新品種候補系統となった場合には利用面を考慮して、サイレージ調製適性を調査することは重要であると考えられる。そのため、県内で広く利用され、代表的な品種であるナツユタカおよびガットンとともにサイレージ発酵品質を調査した。

サイレージ発酵品質の品種間差異では、琉球1号サイレージが畜草1号の無添加区でプロピオン酸、酪酸およびアンモニア態窒素の含量が高い傾向が認められ、また、畜草1号の添加区においても酢酸および酪酸の含量が高い傾向が認められた。これは、琉球1号の材料草がナツユタカおよびガットンと比較して水分含量が若干多くなっている¹⁾ことや、飼料成分の相違が原因であると考えられる。いっぽう、どの材料草を用いた場合にも、畜草1号を添加することによるpHの低下、酢酸、プロピオン酸、酪酸およびアンモニア態窒素の蓄積の減少、および乳酸の蓄積の増加が認められた。また、品種と畜草1号添加の交互作用が認められなかった。したがって、琉球1号サイレージではナツユタカおよびガットンと同様に畜草1号の添加によるサイレージ発酵品質の改善が認められたと考えられる。また、畜草1号の添加による乳酸菌の増加は他の2品種と比較して琉球1号で最も顕著であった。以上のことから、ギニアグラス新品種候補琉球1号は畜草1号を加えない従来のサイレージ調製ではプロピオン酸、酪酸、ア

ンモニア態窒素の含量が高い傾向が認められるものの、畜草1号の添加効果によりpHの低下と乳酸の蓄積が認められ、また、酢酸、プロピオン酸、酪酸、アンモニア態窒素の蓄積は減少し、サイレージ発酵品質に改善が認められることが明らかとなった。

畜草1号の添加効果は用いたギニアグラス2品種1系統でpHの低下、乳酸の蓄積の増加、乳酸以外の有機酸の蓄積の減少、アンモニア態窒素の蓄積の減少、乳酸菌の増加および大腸菌類の減少として顕著に観察された。これらは、畜草1号により良質なサイレージ発酵が進行していることを示していると考えられる。特に、pHの低下と乳酸の蓄積はサイレージの保存性を高める効果が期待でき、畜草1号のギニアグラスサイレージ発酵品質の向上に対する添加効果が認められたと考えられる。暖地型牧草のサイレージ調製の際に、付着乳酸菌をあらかじめ予備培養した発酵液を添加する方法では、予乾処理が不可欠である⁶⁾。さらにギニアグラスでは予乾処理に加えても付着乳酸菌のみではpHの低下および乳酸の蓄積の増加は認められず、pHは5.45で乳酸の含量は0.38%FMであった⁶⁾。また、予乾処理および付着乳酸菌発酵液を加える処理に、さらに糖蜜を添加した場合にpHは4.7で乳酸の含量が0.35%FMとなっている⁷⁾。これらの処理と畜草1号のみの添加でほぼ同様な効果を得ていると考えられるため、ギニアグラスを材料草とするサイレージ調製では畜草1号の添加が最も適した方法であると考えられる。今回用いたような高水分の材料草で畜草1号のみの添加でサイレージ発酵品質に対する改善効果が表れたことは、利用面での応用に期待できると考えられる。

また、蔡ら²⁾によると飼料イネを用い、60日間の貯蔵でハマサリおよびクサホナミを材料草としたサイレージで、それぞれ1.20および0.93%FMの乳酸含量を示した。また、當眞ら⁶⁾によると、予乾処理を行い、付着乳酸菌発酵液を添加したローズグラス、パンゴラグラスおよびジャイアントスターグラスサイレージではそれぞれ、1.61、1.17および1.23%FMの乳酸含量を示していた。ギニアグラスに畜草1号を添加し30日間貯蔵した乳酸含量は増加していたものの、0.25~0.56%FMの範囲であるため十分であるとはいえない。今後さらに発酵品質の改善を図るためには糖蜜の添加やセルラーゼなどの乳酸発酵を促進する処理および畜草1号を用いた場合の予乾効果の検討が必要であると考えられる。

VI 引用文献

- 1) 幸喜香織・蝦名真澄・稲福政史・奥村健治・伊藤康子(2004)ギニアグラス新品種育成(1)中晩生系統の生産力予備試験, 沖縄畜試研報, **42**, 未定
- 2) 蔡義民・藤田泰仁・村井勝・小川増弘・吉田宣夫・北村享・三浦俊治(2003)飼料イネサイレージ調製への乳酸菌 (*Lactobacillus plantarum* 畜草1号) の利用, 日草誌, **49**(5), 477-485
- 3) 北村享(2003)稲発酵粗飼料専用乳酸菌畜草1号の紹介, 牧草と園芸, **51**(4), 9-12
- 4) 沖縄県農林水産部畜産課(2003)おきなわの畜産, 15
- 5) 稲福政史(2003)ギニアグラスを利用した沖縄の肉用牛生産技術, 畜産技術, **579**, 32-35
- 6) 當眞嗣平・守川信夫・長利真幸・望月智代・嘉陽稔(2003)暖地型牧草付着乳酸菌発酵液添加がサイレージ発酵品質に及ぼす影響, 沖縄畜試研報, **41**, 103-107
- 7) 嘉陽稔・与古田稔・後藤正和・伊村嘉美・川本康博(2000)緑汁発酵液(FGJ)および糖蜜添加による暖地型牧草サイレージの発酵品質(3)ギニアグラスへの添加と予乾による効果, 沖縄畜試研報, **38**, 64-67
- 8) 藤田泰仁(1988)粗飼料の品質評価ガイドブック, 自給飼料品質評価研究会編, 5-15, 日本草地畜産種子協会
- 9) 田中治・大桃定洋(1995)プラスチックフィルムを用いた小規模サイレージの発酵試験法(パウチ法)の開発, 日草誌, **41**, 55-59
- 10) 蔡義民(2001)改訂粗飼料の品質評価ガイドブック, 自給飼料品質評価研究会編, 25-35, 日本草地畜産種子協会
- 11) 小崎道雄・内村泰・岡田早苗(1992)乳酸菌実験マニュアル, 34-64, 朝倉書店
- 12) 山里一英・宇田川俊一・児玉徹・森地敏樹(1986)微生物の分離法, 435-444, R and Dプランニング

既存貯留槽を利用した汚水処理技術の確立

(1)高濃度豚汚水処理におけるばっ気量の違いによる成分濃度変化

鈴木直人 仲村敏 大城まどか 玉代勢秀正

I 要 約

養豚農家に既存する汚水貯留槽を浄化槽への負荷を低減するための前処理槽として活用することを想定し、高濃度汚水処理におけるばっ気量の違いによる成分濃度変化について、ばっ気を行わない無ばっ気区、汚水1m³1時間当たりのばっ気量を示す「ばっ気強度」の強度1, 5および9でばっ気処理を行なったばっ気1区, ばっ気5区およびばっ気9区を設定し、12日間室内試験で比較検討したところ以下のとおりであった。

1. 生物化学的酸素要求量(BOD)は、無ばっ気区で変化がみられなかったのに対し、ばっ気処理を行なったばっ気1区, 5区および9区では低下する傾向にあり、日数の経過およびばっ気量が増すほど低下した。また、原水に対する12日目の低下率は、無ばっ気区0.3%, ばっ気1区38.2%, 5区57.3%および9区90.3%であった。
2. 全窒素(T-N)は、各区日数の経過およびばっ気量が増すごとに低下する傾向にあった。原水に対する12日目の低下率は、無ばっ気区5.6%, ばっ気1区8.8%, 5区11.8%および9区15.8%であった。
3. 浮遊物質(SS)および全リン(T-P)は、ばっ気処理の有無に関係なく濃度変化はみられなかった。
4. 汚水のばっ気処理におけるBODの処理速度に対して窒素, リンの大きな変化はみられず、BOD処理が進むほどBODに対する窒素, リン比率が高い成分バランスの処理原水となった。

II 結 言

「家畜排せつ物の管理の適正化及び利用の促進に関する法律」の施行により、畜産農家での汚水処理施設の整備が進められている。汚水を浄化処理し河川や海に放流する技術として、浄化槽内で活性汚泥を培養し、汚水を処理する活性汚泥法が一般的に行われている。沖縄県内の養豚農家はふん尿を混合して貯留する形態を取っている農家が多く、高濃度の汚水を浄化処理することとなるため、容積の大きな浄化槽および経費を必要とし、そのことが養豚農家での浄化槽設置を妨げる一要因になっていると思われる。そこで、本試験では各養豚農家に既存する汚水貯留槽にばっ気処理機器等を付設し、前処理槽として活用することにより浄化槽へ送られる汚水の負荷を下げ、浄化槽容積の縮小化を図ることを目的とする。ばっ気処理による汚水の負荷低減については伊藤ら¹⁾や伊東ら²⁾により報告されているが、高濃度汚水処理についての報告は少なく、前処理を想定した成分濃度変化について不明な点が多い。そこで、高濃度汚水の負荷低減についての基礎データを得るため、汚水処理におけるばっ気量の違いによるBOD, 窒素およびリン等汚水成分濃度の経時的変化について室内試験により比較検討したので報告する。

III 材料および方法

1. 試験期間および場所

試験は、2004年8月から2005年2月まで沖縄県畜産試験場で行なった。

2. 試験方法

試験は、試験装置(図1)を用い25℃の恒温室内で行なった。汚水10 lを試験装置の透明アクリル製円筒型水槽に投入後、ばっ気量を流量計で調整しながら下から散気管を通し12日間連続ばっ気した。また、固型消泡剤(アワセンサーH 四国化成工業社製)を上からつり下げ泡の発生を抑えた。試験は3反復行なった。

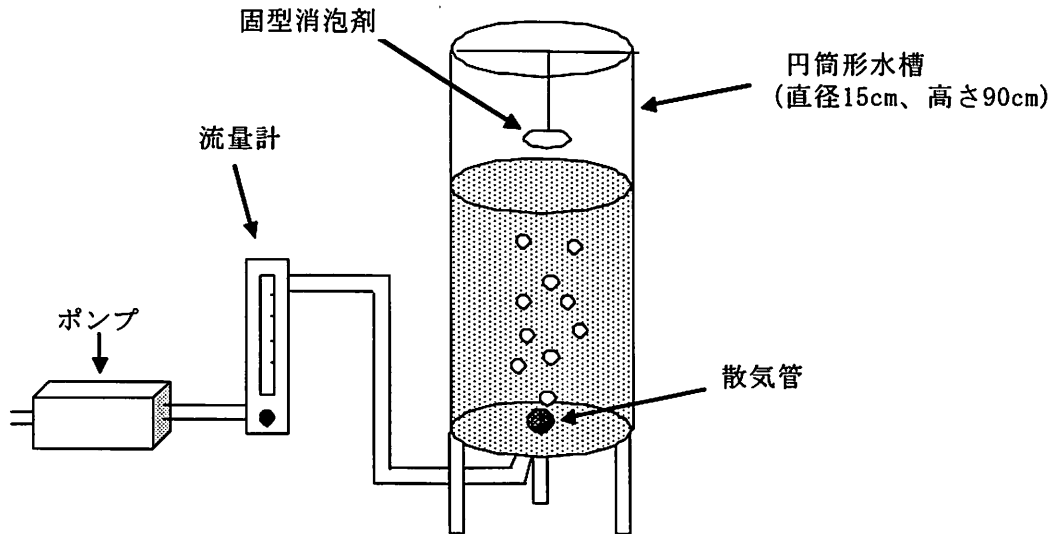


図1 試験装置の概略図

3. 試験区分および供試原水

試験区分を表1に示した。試験区分は、ばっ気処理を行なわなかった無ばっ気区、汚水1m³1時間当たりのばっ気量を示す「ばっ気強度」で強度1,5および9m³/m³・hrの設定でばっ気処理したばっ気1区、ばっ気5区、ばっ気9区とした。

原水は場内の豚舎から採取したふん尿混合汚水を網目間隔0.5mmの振動ふるい機で固液分離し、その分離液を供試した。

表1 試験区分

区分	ばっ気強度 (m ³ /m ³ ・hr)	試験装置でのばっ気量 (l/min)
無ばっ気区	0	0
ばっ気1区	1	0.17
ばっ気5区	5	0.83
ばっ気9区	9	1.50

注1) 「ばっ気強度」は、汚水1m³1時間当たりのばっ気量。

2) 「試験装置でのばっ気量」は汚水10 lに対する1分当たりのばっ気量。

4. 調査項目

調査項目および測定法を表2に示した。調査項目はBOD, SS, T-N, pH, T-Pとした。サンプルは試験開始直後から3日おきに水槽内を攪拌後採取し測定に用いた。

表2 調査項目および測定法

調査項目	測定法
生物化学的酸素要求量(BOD)	BOD自動測定器(BODtrak ハック社製)
浮遊物質(SS)	遠心分離法 ³⁾
全窒素(T-N)	紫外線吸光光度法 ⁴⁾
pH	pH計(セブンイージャー メトラートレド社製)
全リン(T-P)	ペルオキシ二硫酸ナトリウム分解-モリブデン青(アスコルビン酸還元)吸光光度法 ⁵⁾

IV 結果および考察

1. BODの推移

BODの推移を図2に示した。原水のBODは12519mg/lであった。ばっ気処理を行ったばっ気1区、5区および9区においてBODはばっ気量が増すほど低下する傾向にあり、9日目、12日目には有意に低下した。また、ばっ気を行なった区は日数の経過により低下する傾向を示した。いっぽう、無ばっ気区において日数の経過による濃度低下はみられなかった。また、原水に対する12日目でのBOD低下率は、無ばっ気区0.3%、ばっ気1区38.2%、5区57.3%および9区90.3%となった。

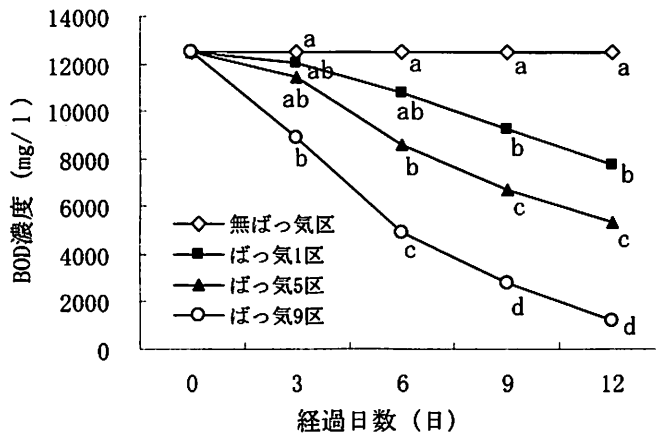


図2 BODの推移

注)同経過日数の小文字異符号間に5%水準で有意差。

2. SSの推移

SSの推移を図3に示した。SSは、無ばっ気区でやや低下傾向にあったもののばっ気処理を行なった各区においてばっ気量の違いおよび日数の経過による濃度低下の傾向は認められなかった。したがって、ばっ気処理を行なってもSSはほとんど低下しないと考えられた。汚水浄化処理過程で発生し、引き抜きが必要となる余剰汚泥の生成量は $a \times RBOD + RSS - b \times V \times MLVSS$ (a : BODからの余剰汚泥生成率, $RBOD$: ばっ気槽における除去BOD量, RSS : ばっ気槽における除去SS量, b : 活性汚泥の低下する割合, V : ばっ気槽の容積, $MLVSS$: 活性汚泥に含まれる有機物)⁹⁾で算出される。この式によると余剰汚泥生成量は、浄化槽へ投入したほとんどのBODとSS量に影響を受けることとなる。したがって、既存貯留槽でばっ気による前処理を行なう本法においては、BOD濃度低下分の浄化槽容積を縮小することとなるため、浄化槽容積当たりのBOD負荷は変わらないがSS濃度は低下していないため、前処理を行なわない従来法よりも浄化槽容積当たりのSS負荷は高まることとなり、余剰汚泥生成速度は速まることが予想された。今後は本法の浄化槽における余剰汚泥生成速度を把握し、活性汚泥濃度の維持管理が可能な砂ろ床等による余剰汚泥引き抜き頻度の解明を行なう必要がある。

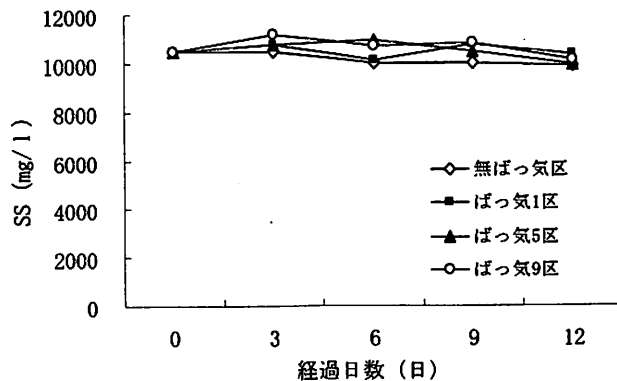


図3 SSの推移

3. T-NおよびpHの推移

T-N, pHの推移を図4, 5に示した。T-Nは各区日数が経過するほど低下する傾向を示した。また、各区経過日数6日目以降ばっ気量が増すほど低い濃度になる傾向にあった。原水に対する12日目での低下率は、無ばっ気区5.6%, ばっ気1区8.8%, 5区11.8%および9区15.8%であり、同区12日目のBOD低下率と比較すると無ばっ気区を除いて低い低下率であった。

pHは、無ばっ気区において変化がみられなかったのに対し、ばっ気処理を行なった区で3日目以降上昇し、8以上の値を示した。また、ばっ気量が増すほど高い値を示す傾向にあった。pHが8以上になると水中からアンモニアが放出される⁷⁾とされており、ばっ気処理を行なった区ではアンモニアが放出されやすい環境にあったと考えられる。

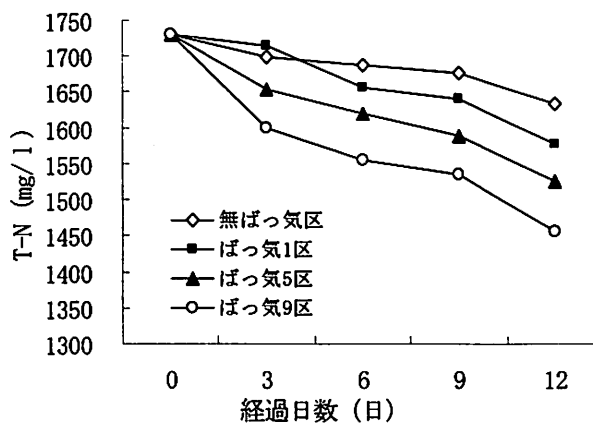


図4 T-Nの推移

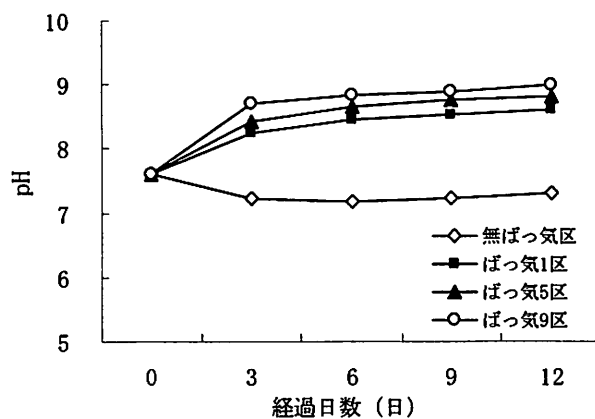


図5 pHの推移

4. T-Pの推移

T-Pの推移を図6に示した。T-Pは各区170mg/l程度で推移し、ばっ気量の違いおよび日数の経過による濃度低下の傾向は認められなかった。したがって原水中のリンは、ばっ気処理を行なってもほとんど低下しないと考えられた。

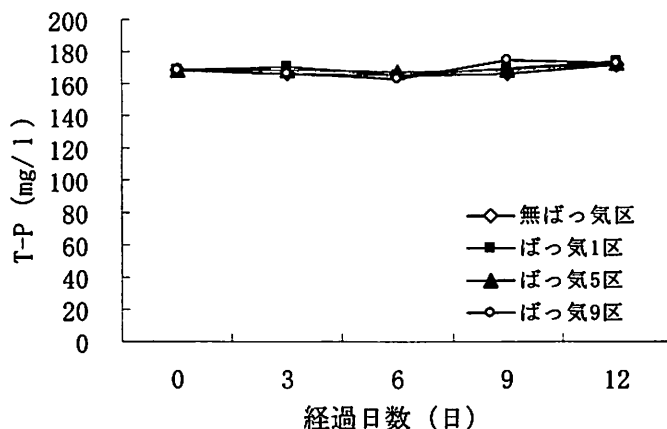


図6 T-Pの推移

今回の試験において汚水成分のBOD, T-Nについてはばっ気強度の増加, 日数の経過にしたがって処理, 放出され濃度が低下する傾向が示唆された。特にBODはばっ気処理による低減効果の著しい成分と考えられた。しかし、T-P, SSについては、ばっ気量の違いおよび日数の経過による濃度低下の傾向がみられず、ほぼ残存することが示唆された。

活性汚泥法において一般に浄化処理に適した処理原水のBOD:N:P比は100:5:1程度であり、窒素の割合が高いと浄化処理が困難になる⁸⁾とされている。今回供試した原水のBOD:N:P比は100:13:1.3であり、浄化処理に適した処理原水の比率と比較するとN比がやや高い汚水であった。今回の試験において、ばっ気処理を行なった区では同区, 同経過日数のBOD低下率に対して窒素の低下率が低い値であ

琉球在来豚（アグー）を活用した銘柄豚の確立

(4) アグー凍結精液の作製および融解後の受精能評価

仲村敏 大城まどか 鈴木直人 玉代勢秀正
吉岡耕治* 鈴木千恵* 菊地和弘** 建本秀樹***

I 要 約

沖縄県畜産試験場で飼養するアグー3頭、ランドレース2頭の計5頭を用いて凍結精液の作製を試みた。また、作製した凍結精子の性能評価として凍結融解後の精子における、Computer-assisted Sperm Analyzer (CASA)による運動性、Williams染色による精子奇形形態、ならびに、トリプルステイン(TS)法による精子の先体保有および生存性について検討を行なった。さらに、同凍結精子を用いた体外受精(IVF)を行い、各観察結果とIVF成績との間に相関があるか否かについて検討した。その結果、以下の点が明らかとなった。

1. アグーは供試した全ての精子が凍結融解後においても運動性を保持していた。
2. アグー凍結精子の運動性は、融解後15分で活発となり、融解後360分で全ての供試豚の運動精子率が10%以下となった。また、ランドレースは融解後15~60分まで約50%の運動精子率を維持したがアグーの融解後60分の運動精子率はランドレースと比較して低い傾向にあった。
3. 供試したアグー精子は融解後360分に全ての個体で運動精子が観察されなくなった。
4. 雄個体No. 2A由来のアグー凍結精液は精子運動性が極端に低く、アグー個体間で凍結融解精子の運動性に差があることが示された。
5. アグー凍結精液における融解後の精子奇形率は20%以内で、精子頭部の変形や損傷の割合は小さかった。このことから本法で作製された凍結精液は、凍結融解処理における精子形態への悪影響は少なかったと考えられた。
6. アグー凍結精子の先体保有および生存性は、先体を有する生存精子の割合が55.0~63.5%と最も高く、先体を有しない生存精子および死滅精子の割合はそれぞれ5%以下と低かった。
7. アグー凍結精子による精子侵入率および多精子受精率はそれぞれ18.3~58.9%、15.4~31.7%で、ランドレース凍結精子と比較して精子侵入率は低い傾向にあった。
8. アグー凍結精子の融解後15分~30分の運動精子率とIVFにおける精子侵入率の間に有意な正の相関が認められた。このことから、CASAによる運動性解析結果から凍結精子の卵子への侵入能がある程度推定できる可能性が示唆された。
9. IVFによりアグーを含む全ての供試豚の凍結精子が受精し胚盤胞期胚が得られた。このことから、本法により作製したアグー凍結精液を用いて人工授精や受精卵移植を行うことにより産子を得ることが期待できると考えられた。

II 緒 言

本県には戻し交配により復元された琉球在来豚アグーがいる。アグーは14世紀頃中国から導入された豚が原型といわれているが、発育が遅く、小型で産子数が少ないためその経済性がみだせず消滅しかけたこともある¹⁾。しかし、近年、肉質においてアグーの特性が認められるようになり、県産豚ブランドとしての活用が期待されている。当场では、これまでの調査で、アグーには優れた肉質特性があるいっぽうで近交退化の影響と考えられる繁殖性の低下等が認められ近交度を考慮した効率的な交配を行う必要があることを提言した^{2, 3)}。そのため今後のアグーの維持・増殖においては、貴重な遺伝資源を効率的に活用できる凍結保存技術のアグー精子に対する活用が期待されている。しかし、ウシ精子に比較してブタ精子の耐凍能は著しく劣っており、その結果、凍結・融解後のブタ精子の生存性や運動性は低

く、授精後の受胎率も低い。そのため、凍結精液による人工授精は豚では未だ普及率は低く、実用化まで至っていない^{4, 5)}。また、当場で飼養しているアグーは、液状精液作成に伴う希釈処理により精子活力が著しく低下するため、人工授精時には新鮮射出精液しか使用できず、実情ではアグー精液を効率的に利用することは困難である。

そこで、今後、近交度を考慮した上でアグーの維持・増殖を目的とした効率的な繁殖技術を確立するための基礎試験として、本研究では、当場で飼養しているアグーおよび、比較対照としてランドレースの射出凍結精液を作製し、凍結融解後の精子奇形形態、先体保有および生存性について調べるとともに、IVFによる凍結融解精子の受精能力を評価した。

Ⅲ 材料および方法

1. 供試精液

当場で飼養しているアグー3頭(1A, 2A, 3A)、ランドレース2頭(4L, 5L)の計5頭の種雄豚から擬牝台を使用し、手圧法⁶⁾で精液を採取した。精液の採取時に、アグー精液においては濃厚部が不明瞭なため射出された精液の全量採取し、ランドレース精液においては濃厚部のみを分離採取した。また、膠様物を取り除くため精液採取瓶の口を2枚の牛乳濾紙で覆うことで濾過処理を行なった。

2. ブタ凍結精液の作製

凍結精液の作製は、Purselら⁷⁾およびYiら⁸⁾の方法を参考に修正を加えて実施した(図1)。採取した精液を室温で約60分間静置した後、精液と等量の前処理液(VMD-MULBERRYⅢ)を静かに混和し、遠心分離(600×g, 10分, 24℃)による洗浄を行い、上清を除去した。上清除去後の精子を室温に調整したLactose-egg yolk (LEY)一次希釈液(表1)で精子濃度が 10×10^8 sperm/mlになるように希釈し約2時間かけて徐々に5℃まで冷却した。さらに5℃になった時点から約1時間静置した後、LEY希釈液に1%濃度でOrvus ES Paste(OEP)と4%濃度でグリセリンを加えた同温の二次希釈液(表2)を等量加え、最終精子濃度が 5×10^8 sperm/mlになるように調整した。精液の凍結は、二次希釈液を添加後直ちに小穴を開けたドライアイス上で0.1mlずつ錠剤化凍結し、約5分後に錠剤化凍結精液を液体窒素中に浸漬した。

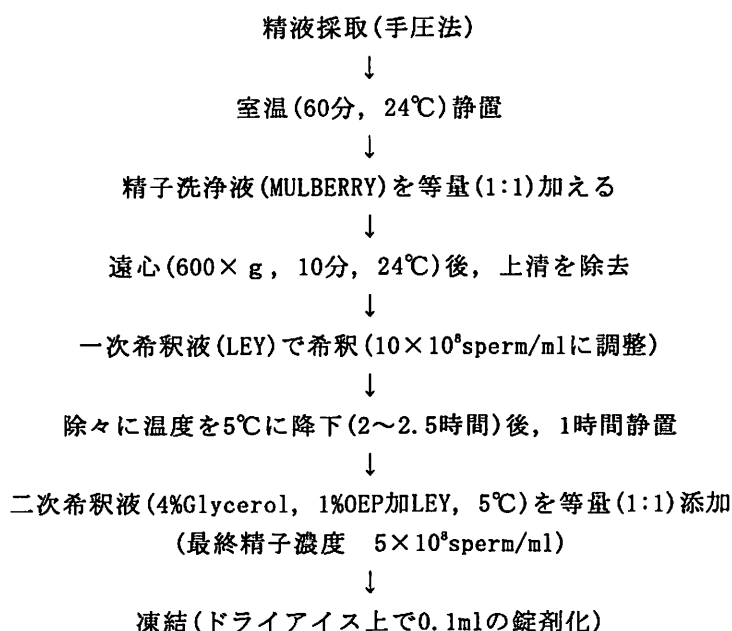


図1 凍結精液作成手順

Lactose·H ₂ O	310.0mM	8,936.0mg
Egg yolk		20ml
Penicillin G	100IU/ml	6.5mg
Streptomycin	50Ug/ml	5.0mg

1st LEY solution	95ml
OEP	1ml
Glycerol	4ml

3. 凍結融解後の精子運動性

錠剤化凍結精液の1錠(0.1ml)を38℃に加温した3mlの修正モデナ液中で素早く融解した後、38℃で保温した。凍結融解精子の運動性は、融解後5, 15, 30, 60, 120, 180, 300, 360, 420分に約8 μ lの精子懸濁液をスライドチャンパー上に滴下し、カバーガラスをかけ38℃に保温した状態で精子運動性解析装置(Ceros Sperm Analyzer, Hamilton-Thorne Research)を用いて解析し、これを4反復行なった。

4. 凍結融解後の精子奇形形態

錠剤化凍結精液1錠(0.1ml)を3mlの生理食塩液中で融解した後、Williams染色⁹⁾を行った。染色標本は、400倍または1000倍の光学顕微鏡下で、1枚の標本につき400個の精子を無作為に観察し、精子の奇形を形態別に分類した。

5. 凍結融解後の精子の先体保有および生存性

精子の先体保有および生存性の判別は、Talbotら^{10,11)}の方法に準拠しTS法により行った。すなわち、錠剤化凍結精液3錠(0.3ml)を9mlの修正モデナ液で融解し、遠心洗浄(1500rpm, 5分)した後、1mlの体外受精用培地 Porcine Gamete Medium(PGM)tac5を加え精子懸濁液とした。この精子懸濁液の塗沫標本を作製して図2に示す染色を行った。染色標本は、1000倍の光学顕微鏡下で、1枚の標本につき200個の精子頭部を無作為に観察した。また、TS法の染色結果により、精子後帽部が淡褐色で先体部がピンク色のものを先体を有する生存精子、後帽部が淡褐色で先体部が不染のものを先体を有しない生存精子、後帽部が暗褐色で先体部がピンク色のものを先体を有する死滅精子、後帽部が暗褐色で先体部が不染のものを先体を有しない死滅精子として4種類に分類した。

6. 体外受精

ブタ未成熟卵子の採取、体外成熟培養(IVM)、IVFならびに受精卵の体外培養(IVC)は、吉岡¹²⁾の方法に準拠して行った。また、全ての培養は、湿度飽和条件下のマルチガスインキュベーター内(39℃, 5%CO₂, 5%O₂, 90%N₂)で行った。

1)ブタ卵胞卵子の採取

と場由来の卵巣の直径3~6mmの卵胞から18G注射針を装着した10ml注射筒で吸引することで卵丘細胞卵子複合体(COCs)を採取した。

2)体外成熟培養

IVMは、採取したCOCsを卵子洗浄用溶液(TALP-Hepes)で2回洗浄した後、卵子成熟用培養液(NCSU-37)で2回洗浄し、20~22時間培養した。その後、dbcAMPとホルモンを除去したNCSU-37でさらに24時間培養した。

3)精子処理と体外受精

IVFには、錠剤化凍結精液5錠(0.5ml)を修正モデナ液30mlに融解して遠心洗浄(500 \times g, 5分)した後、80%および40%パーコールを含む同液に洗浄後の精液を重層し遠心(700 \times g, 20分)した。下層部の精子は、さらにPGMtac5で遠心洗浄(500 \times g, 5分)後、最終精子濃度を 2×10^6 sperm/mlに調整し、成熟培養後の卵子とともにPGMtac5中で10時間培養した。

4)体外発生培養

媒精後の卵子は、卵子洗浄用培養液(PXM-Hepes)1mlが入った遠沈管に入れ、4分間ボルテックスにて振動攪拌し、卵丘細胞を除去した後、PXM-Hepesで3回洗浄した。一部の卵については、ホールマウント

標本を作製して位相差顕微鏡下で核相を観察することで受精状況を調べた。残りの卵子は体外発生用培養液(PZM-5)で2回洗浄した後、同培養液で5日間培養して胚盤胞期への胚発生率を調べるとともに、胚盤胞期まで発生した胚に対しては、空気乾燥標本を作製して胚盤胞期胚の細胞数を計測した。

IV 結 果

1. 凍結融解後の精子運動性

図3に凍結融解後の運動精子の経時的な変化を供試豚ごとに示した。その結果、アグーおよびランドレース共に精子の運動性は融解後15分で活発となり、融解後360分で全ての供試豚の運動精子率が10%以下となった。また、ランドレースは融解後15~60分まで約50%の運動精子率を維持したがアグーの融解後60分の運動精子率はランドレースと比較して低い傾向にあった。

融解後60分以内の運動精子率の最大値および最小値では、No. 3Aのアグーの融解後15分の運動精子率(61%)が最も高く、No. 2Aのアグーの融解後60分の運動精子率(22%)が最も低かった。

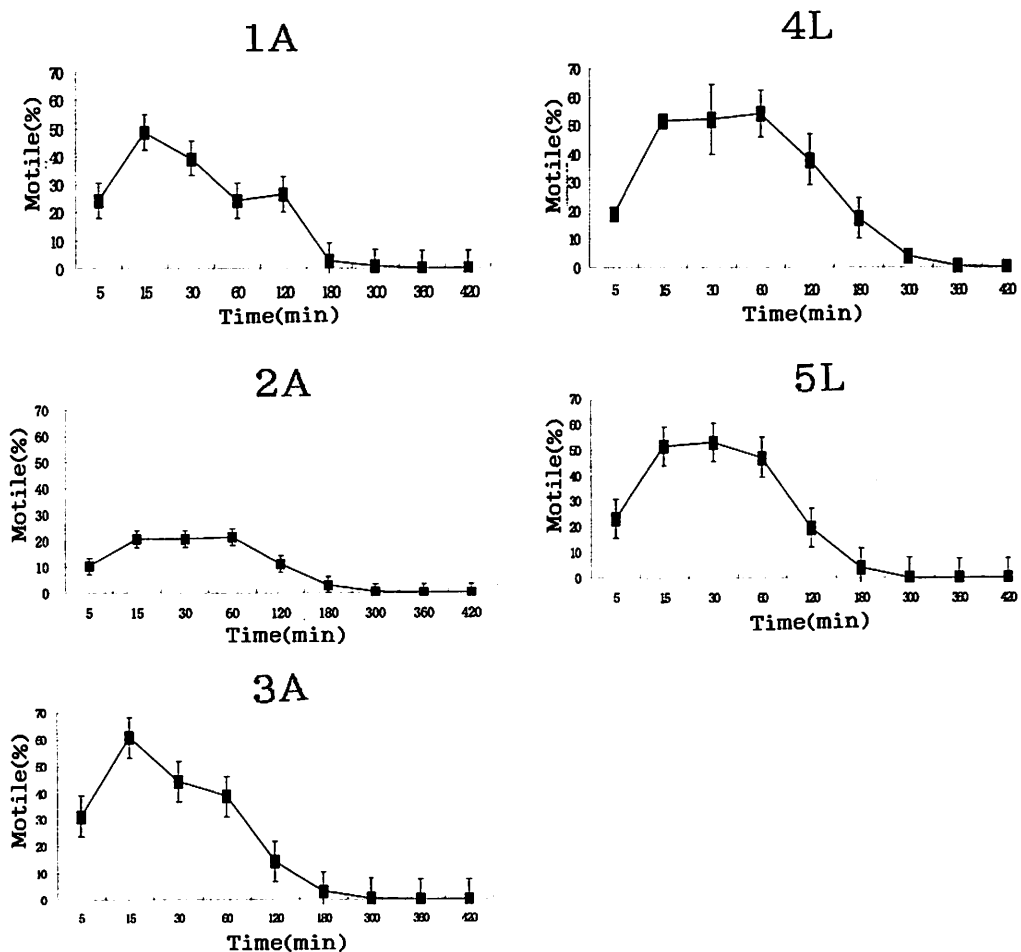


図3 凍結融解後の運動精子の経時的変化
注) 平均±標準誤差。

2. 凍結融解後の精子奇形形態

表3に供試豚ごとに凍結融解後の精子の奇形形態別分類結果を示した。アグー精子の奇形率は14.0~18.5%であり、ランドレース精子と同じかあるいは低い傾向にあり、アグーの個体間に有意な差は認められなかった。奇形を形態別に分類した奇形発生率では、アグー精子は精子尾部の欠損あるいは発育不

不全の出現率がランドレース精子より高かったが、アグーとランドレースの間に有意な差は認められなかった。また、No. 2Aのアグーは精子頭部の屈折の出現率が高く、No. 3Aのアグーは、精子頭部の過大あるいは精子頭部の過小が多いという特徴が認められた。

表3 凍結融解後の精子における奇形形態別分類の結果

単位：%

供試雄個体No.	頭部				頸部				欠損 發育不全	尾部			合計
	過大 ・ 過小	変形 ・ 損傷	その他	計	小滴 屈折 ・ 附着	その他	計	屈折 ・ 湾曲		その他	計		
1A	2.0 ^{bc}	1.5	0.5 ^{ab}	4.0 ^{ab}	0.5 ^b	1.5	1.0	3.0 ^{bc}	5.0	2.0 ^b	0.0	7.0	14.0
2A	1.0 ^c	0.5	1.5 ^a	3.0 ^{bc}	6.5 ^a	3.5	0.0	10.0 ^{ab}	4.5	1.0 ^b	0.0	5.5	18.5
3A	5.0 ^{ab}	1.5	0.0 ^b	6.5 ^{ab}	0.0 ^b	1.0	0.0	1.0 ^{bc}	4.5	1.5 ^b	0.5	6.5	14.0
4L	6.5 ^a	1.5	0.0 ^b	8.0 ^a	0.0 ^b	3.0	0.5	3.5 ^{bc}	3.5	3.5 ^{ab}	0.0	7.0	18.5
5L	0.5 ^c	0.0	0.0 ^b	0.5 ^c	6.0 ^a	1.5	0.5	8.0 ^{ab}	3.5	6.5 ^a	0.0	10.0	18.5

注) 同列の異符号の文字間に有意差有り (P<0.05)。

3. 凍結融解後の精子の先体保有および生存性

表4に凍結精液の融解後の精子先体の有無および生存性で分類した結果を示した。その結果、生存精子で先体を有する割合が55.0~79.5%と高く、ついで死滅精子で先体を有する割合が15.0~41.0%であった。生存精子で先体を有しないおよび死滅精子で先体を有しない割合は5%以下と低かった。また、アグーとランドレースを比較した場合、アグーは、ランドレースより生存精子で先体を有する割合が低く、逆に死滅精子で先体を有する割合が高い傾向にあった。しかし、分類された各項目におけるアグーとランドレース間に有意な差は認められなかった。

表4 凍結融解後の精子における先体保有および生存性の分類結果

供試雄個体No.	生存精子 (%)			死滅精子 (%)		
	先体			先体		
	有	無	計	有	無	計
1A	55.0	5.0	60.0	35.5	4.5	40.0
2A	63.5	0.5	64.0	34.5	1.5	36.0
3A	55.5	2.5	58.0	41.0	1.0	42.0
4L	77.0	3.0	80.0	18.5	1.5	20.0
5L	79.5	3.5	83.0	15.0	2.0	17.0

4. 体外成熟卵子との体外受精

表5に凍結融解精子を用いたIVM卵子へのIVFの成績を示した。その結果、精子侵入率は18.3~72.6%であり、多精子侵入率は15.4~54.7%ならびに雄性前核形成率は56.5~92.3%であった。また、アグーとランドレースを比較した場合、アグーの精子侵入率はランドレースのそれより低い傾向にあった。そしてNo. 2Aのアグーの精子侵入率(18.3%)は、他の供試豚の精子侵入率より有意に低かった (P<0.05)。いっぽう、雄性前核形成率はランドレースよりアグーの方が高い傾向にあったが、個体間の差は認められなかった。

表6にはIVF後の胚の発生成績を示した。媒精後2日目の卵割率および5日目の胚盤胞期への胚発生率は、それぞれ35.6~71.7%、2.5~16.7%であり、卵割率においては個体間に有意差が認められたが (P<0.05)、発生率においては有意な差はなかった。また、アグー精子による胚盤胞期胚の平均細胞数は約47.0~54.3個でランドレースより多い傾向にあったが、個体間で有意差は認められなかった。

表5 体外成熟卵子との体外受精の結果

供試雄 個体No.	検査卵子数	卵子数		
		精子侵入(%)	多精子侵入(%)	雄性前核形成(%)
1 A	74	41(55.4) ^a	13(31.7) ^{AB}	27(65.9)
2 A	71	13(18.3) ^b	2(15.4) ^B	12(92.3)
3 A	73	43(58.9) ^a	10(23.3) ^A	36(83.7)
4 L	74	46(62.2) ^a	14(30.4) ^A	26(56.5)
5 L	73	53(72.6) ^a	29(54.7) ^A	38(71.7)

注1) 同列異符号の文字間に有意差有り (P<0.05)。

2) 多精子侵入率=多精子侵入卵数/精子侵入卵数。

3) 雄性前核形成率=雄性前核形成卵数/精子侵入卵数。

表6 体外受精後の胚の発生の結果

供試雄 個体No.	検査胚数	卵割胚数(%)	胚盤胞数(%)	胚盤胞期細胞数
		[2日目]	[5日目]	(平均±標準偏差)
1 A	102	49(48.0) ^{bc}	8(7.8)	47.0±14.4
2 A	118	42(35.6) ^{bc}	3(2.5)	54.3±29.3
3 A	102	54(52.9) ^b	14(13.7)	53.4±14.6
4 L	111	58(52.3) ^b	17(15.3)	38.5±14.5
5 L	120	86(71.7) ^a	20(16.7)	35.5±24.7

注) 同列異符号の文字間に有意差有り (P<0.05)。

5. 精子の運動性、奇形率、先体保有および生存性と体外受精との相関

融解後の精子運動性とIVFの成績では、融解後15分および30分の運動精子率とIVFにおける精子侵入率との間に有意な正の相関が認められた(融解後15分; $r=0.897$; $P<0.05$, 融解後30分; $r=0.969$; $P<0.05$)。

いっぽう、精子の奇形率、先体保有および生存性とIVFの成績との間には有意な相関関係は認められなかった。

V 考 察

今回、Purselら⁷⁾とYiら⁸⁾の方法を参考にして、当場で初めてアグーの射出凍結精液を作製した。当場で飼養しているアグーはランドレース等の一般経済豚と比較して精液の濃厚部が不明瞭なため、射出された精液の全量を用いて凍結処理したが、供試した全てのアグー精子が凍結融解後においても運動性を保持していた。特にNo. 1Aおよび3A由来の凍結精液は、副生殖腺液の含有量が少ない濃厚部の精液のみを凍結したランドレース精子と融解後15分における運動精子率を比較した場合、ランドレースと遜色ない精子運動性を示した。しかし、No. 2A由来の凍結精液では融解後の精子運動性が極端に低かった。

一般にブタ精子は、冷却に対する感受性が高く、耐凍能に顕著な個体差が認められる¹³⁾と言われており、アグーについても同様な個体差があることが示唆された。

精子の奇形率は正常な家畜精液で通常10%以内であり、これが20~30%を超える場合には受胎率の低下をきたすといわれている。さらに、凍結融解処理に伴う細胞障害により先体異常精子の出現率が増加することが知られている¹⁴⁾。今回作製したアグー凍結精液における融解後の精子奇形率は10%以上20%以内であり、また、頭部の損傷、変形の割合も小さかった。これらの結果から、本法で作製されたアグーの凍結精液は、凍結融解処理による精子形態への悪影響は少なかったと考えられる。

精子は活発な運動性と共に、先体反応と呼ばれる生理・形態学的変化を引き起こして、初めて卵子への侵入が可能となる。そのため、精子の先体の有無および生存性の比率を事前に知ることは、体外受精における精子の前処理法を検討したり、保存精子の受精能を推定する上で有意義とされている¹⁵⁾。今

回、実施したTS法による判別では、精子の先体の有無や生存性に個体差は認められなかったことから、凍結融解精子の先体損傷に個体差がないことが示唆された。しかし、IVFにおける精子侵入率については、個体差が認められたことから、ブタ精子は、IVFに伴う受精能獲得等の生理学的作用機序を惹起する際、個体間で異なる反応を示すことが推察された。すなわちTS法による先体の有無や生存性をIVF成績の指標とするためには、融解後の精子を経時的に検査する等のさらなる詳細な検討が必要であると思われる。

本研究では、凍結精子の融解後15～30分の精子運動率とIVFにおける精子侵入率の間に有意な正の相関が認められたことで、CASAによる融解後の精子運動性の解析結果から凍結精子の卵子への侵入能がある程度推定できる可能性が示唆された。しかし、IVFに際しては精子だけでなく卵子側の様々な要因により受精状況が大きく左右されるため、凍結精子の受精能評価については、さらなる検討を加える必要がある。また、生体内では精子が雌性生殖器内に射出されてから受精に至るまで数時間を要することや、多胎動物であるブタにおいては排卵が持続的に起こる。したがって、生体内におけるアグー凍結融解精子の受精能力は、精子運動性の持続時間や人工授精による受精率等を調査し、確認する必要があると思われる。

本研究で作製した射出凍結精子を用いた一連のIVM-IVF-IVC法の結果から、アグーを含む全ての供試豚の凍結精子が受精し胚盤胞期胚が得られた。Yoshiokaら^{16, 17)}は同様な方法で作出されたブタ胚盤胞期胚を雌子宮内に移植しから産子を得ることに成功している。すなわちアグーの凍結精子においても人工授精や受精卵移植により、産子を得ることが期待できると考えられる。今後は、アグーの貴重な遺伝資源を維持し有効に活用する意味に於いて、実用化に向けた試験・研究を推進することが重要である。

VI 引用文献

- 1) 宮城吉通 (1998) 沖縄在来豚「アグー」の復元と沖縄の食文化(1), 畜産コンサルタント, 407, 46-50
- 2) 大城まどか・仲村敏・鈴木直人・太田克之・渡久地政康 (2003) 琉球在来豚(アグー)を活用した銘柄豚の確立(2)アグーの繁殖性および哺育・育成成績への近親交配による影響, 沖縄畜試研報, 41, 67-70
- 3) 大城まどか・仲村敏・鈴木直人・太田克之・渡久地政康 (2003) 琉球在来豚(アグー)を活用した銘柄豚の確立(3)アグーの肥育試験および肉質評価, 沖縄畜試研報, 41, 71-78
- 4) 藤野幸広 (2002) 凍結・融解精液の利用実用化試験, 豚の繁殖衛生セミナー通信, 29, 11-13
- 5) 日本家畜人工授精師協会 (2003) 家畜人工授精講習会テキスト (家畜人工授精編), 290-293, 日本家畜人工授精師協会
- 6) 日本家畜人工授精師協会 (2003) 家畜人工授精講習会テキスト (家畜人工授精編), 302-306, 日本家畜人工授精師協会
- 7) Pursel V.G., Johnson L.A. (1975) Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure, *J. Anim. Sci.*, 40, 99-102
- 8) Yi Y.J., Im G.S. and Park C.S. (2002) Lactose-egg yolk diluent supplemented with N-acetyl-D-glucosamin affect acrosome morphology and motility of frozen-thawed boar sperm, *Animal Reproduction Science*, 74, 187-194
- 9) 全国家畜産物衛生指導協会編 (2000) 獣医繁殖学マニュアル, 51-54, 農文協
- 10) Talbot P., Chacon R.S. (1981) A triple-stain technique for evaluating normal acrosome reaction of human sperm, *Exp Zool. J.*, 215, 201-208
- 11) Talbot P., Chacon R.S. (1981) Observations on the acrosome reaction of human sperm in vitro, *Amer J Primatol*, 1, 211-219
- 12) 吉岡耕治 (2003) ブタ胚の体外生産, 豚の繁殖衛生セミナー通信, 30, 24-41
- 13) 飯田勲編 (1971) 哺乳動物の精子, 355-362, 学窓社
- 14) 日本家畜人工授精師協会 (2003) 家畜人工授精講習会テキスト (家畜人工授精編), 321-328, 日本家畜人工授精師協会

-
- 15)Kusunoki H., Sakaue M., Kato S. and Kanda S. (1987) Identification of acrosome-reacted boar spermatozoa by a triple-stain technique, *Jpn J Anim Reprod*, 33, 123-127
- 16)Yoshioka K., Suzuki C., Tnaka A., Anas I.M.K. and Iwamura S. (2002) Birth of piglets derived from porcine zygotes cultured in a chemically defined medium, *Biology Of Reproduction*, 66, 112-119
- 17)Yoshioka K., Suzuki C., Itoh S., Kikuchi K., Iwamura S. and Rodrigues-Martines H. (2003) Production of piglets derived from in vitro-produced blastocysts fertilized and cultured in chemically defined media: Effects of theophylline, adenosine, and cysteine during in vitro fertilization, *Biology of Reproduction*, 69, 2092-2099
-

研究補助：仲程正巳，赤嶺圭作

職員一覧表 (2005年3月31日現在)

場 長： 國仲元裕
次 長： ○玉代勢秀正 (中家畜研究室長兼務)

庶務課 課 長：阿波根昌行
主 査：宮里朋幸・安次富三枝子
課 員：津波良信

大家畜研究室 室 長：○玉城政信
研 究 員：運天和彦・真喜志修・岩崎義史・岡野祥・玉城真 (臨任)
農業技術補佐員：伊藝博志・又吉康成・宮城広明・石垣新・宮里貴志・下地貴士

中家畜研究室 室 長：玉代勢秀正 (兼務)
研 究 員：仲村敏・○鈴木直人・大城まどか
農業技術補佐員：仲程正巳・赤嶺圭作

飼料研究室 室 長：○守川信夫
研 究 員：長利真幸・當眞嗣平・望月智代
農業技術補佐員：小濱健徳・竹内千夏

バイオテクノロジー
研 究 室 室 長：千葉好夫
研 究 員：山城存・○比嘉直志
農業技術補佐員：小波津明彦・下里安志

牧草育種研究室 室 長：○蝦名真澄
研 究 員：幸喜香織
農業技術補佐員：比嘉正徳・嘉数薫 (臨任)

○は編集委員

試験研究報告 (第42号)

平成17年8月30日 印刷
平成17年8月30日 発行

発行所 沖縄県畜産試験場
〒905-0426
沖縄県国頭郡今帰仁村字諸志2009-5
電 話 0980(56)-5142
F A X 0980(56)-4803

印 刷 株式会社近代美術
〒901-1111
沖縄県南風原町字兼城206
メディア21ビル6F
電 話 (098)889-4113
F A X (098)889-8484
