



神奈川県畜産技術センター

# 研究報告

---

第1号 (通巻96号)

Bulletin of  
Kanagawa Prefectural Livestock Industry Technology Center  
No.1

2017年12月

神奈川県畜産技術センター研究報告  
第1号 (通巻96号)

目 次

	頁
<b>【研究報告】</b>	
黒毛和種子牛へのシンバイオティクス給与が腸内細菌叢とふん性状に及ぼす影響 秋山清・坂上信忠・水宅清二・折原健太郎・川嶋賢二・安田憲司・櫛引史郎 -----	1
ホルスタイン種経産牛における性選別精液を用いた体内胚採取のための過剰排卵処理 秋山清・折原健太郎・坂上信忠 -----	7
神奈川県におけるトウモロコシ二期作の経済性 折原健太郎 -----	13
<b>【学位論文要旨】</b>	
リン結晶化法による豚舎汚水からのリン回収システムの開発 東北大学 博士 (工学) 川村 英輔 -----	19
生殖工学技術を利用した子ウシの性別制御に関する研究 麻布大学 博士 (学術) 秋山 清 -----	23
電気化学的呼吸量測定による豚胚の客観的評価と 胚移植による種豚生産システムの開発に関する研究 岡山大学 博士 (農学) 坂上 信忠 -----	27
<b>【場外掲載論文】</b> -----	29
<b>【学会発表】</b> -----	31

**Bulletin of Kanagawa Prefectural  
Livestock Industry Technology Center (No.1)**

**C O N T E N T S**

Effect of Symbiotic Feeding on Japanese Black Calves on Fecal flora and Condition

Kiyoshi AKIYAMA, Nobutada SAKAGAMI, Seiji MIZUYA, Kentaro ORIHARA,

Kenji KAWASHIMA, Kenji YASUDA and Shiro KUSHIBIKI

1

Superovulation in Holstein Cows using Sex-sorted Sperm

Kiyoshi AKIYAMA, Kentaro ORIHARA and Nobutada SAKAGAMI

7

The Cost Performance of Silage Corn for Double Cropping in Kanagawa

Kentaro ORIHARA

13

【研究報告】

## 黒毛和種子牛へのシンバイオティクス給与が 腸内細菌叢とふん性状に及ぼす影響

秋山清・坂上信忠・水宅清二・折原健太郎・川嶋賢二<sup>1</sup>・安田憲司<sup>2</sup>・櫛引史郎<sup>3</sup>  
<sup>1</sup>千葉県畜産総合研究センター・<sup>2</sup>名糖産業株式会社名古屋研究所・<sup>3</sup>農研機構畜産研究部門

Effect of Symbiotic Feeding on Japanese Black Calves on Fecal flora and Condition

Kiyoshi AKIYAMA, Nobutada SAKAGAMI, Seiji MIZUYA, Kentaro ORIHARA,  
Kenji KAWASHIMA, Kenji YASUDA and Shirou KUSHIBIKI

受精卵移植により生産した黒毛和種子牛の人工哺育において、デキストランと *Lactobacillus casei subsp. casei* JCM1134<sup>T</sup>株を組み合わせたシンバイオティクス(以下、SB)の効果を調査した。SB区は生後3日齢から離乳まで代用乳(抗菌剤不含)に日量10g、離乳後から17週齢まで人工乳に日量20gを添加して給与し、対照区はSB無添加とした。ふん性状は毎日観察し、5段階でスコア化し、3以上を下痢とした。SB区は、ふん乳酸菌数が10週齢および17週齢で多く( $P < 0.05$ )、ふん中大腸菌群数は17週齢において少ない傾向であった( $P < 0.1$ )。試験期間中の積算ふんスコアおよび下痢発生日数に有意差はなかった。日増体量、飼料摂取量および血液生化学成分値はSB区と対照区の間有意差は認められなかった。これらのことから、黒毛和種子牛の人工哺育におけるシンバイオティクスの給与は、腸内細菌叢に影響を及ぼすことが示唆された。

キーワード：黒毛和種子牛、シンバイオティクス、ふん乳酸菌数、  
ふん中大腸菌群数、ふん性状

国内の酪農経営では受精卵移植による乳用牛からの黒毛和種子牛の生産が広く普及しており、重要な収入源のひとつとなっている。一般に、黒毛和種はホルスタイン種より妊娠期間がやや長く、生時体重は少ないが、生理的には大きな差異が認められないとされる。しかし、黒毛和種子牛は、消化機能の発達が遅く、固形飼料の摂取量の増加が遅いことから離乳時期が遅く、季節、牛舎環境および群飼への移行などの飼養環境の変化にも注意を払う必要があることが指摘されている(福島 2012)。また、下痢症をはじめとする疾病発生率がホルスタイン種子牛に比べて高く生産現場での課

題となっている(佐野 2009)。子牛の飼養管理において、哺育期は、給与飼料が全乳や代用乳などの液状飼料から固形飼料へ変化するとともに、免疫機能が初乳由来の受動免疫から能動免疫に変化するなど、その後の発育や消化機能の発達に影響を及ぼす重要な期間である。また、この時期の飼養管理は、子牛の腸内細菌叢に影響し、肺炎や下痢等の疾病の原因となり、その後の発育や生産性に影響することが知られている。

腸内細菌叢のバランスを健全に保ち免疫機能の向上と整腸作用による発育促進を図るための資材として乳酸菌などのプロバイオティ

クスやプロバイオティクスの栄養源となるオリゴ糖などを含むプレバイオティクスが家畜の飼養管理に利用されている。プロバイオティクスやプレバイオティクスは、それぞれ単独でも効果を発揮するが、宿主の体内でどちらかが欠けた場合には十分な効果の得られないことが考えられる。そこで、予め資化性を確認したプロバイオティクスとプレバイオティクスを組み合わせて給与することで、より確実に効果を得ることが期待され、このようなプロバイオティクスとプレバイオティクスを組み合わせたシンバイオティクス（以下、SB）の利用が提唱されている（Gibson と Roberfoid 1995）。

小川ら（2004）は、デキストランとデキストラン資化性乳酸菌（*Lactobacillus casei* subsp. *casei* JCM1134<sup>T</sup>株）を組み合わせたSBのマウスへの給与が体液性免疫ならびに細胞性免疫の増強に効果のあることを報告している。また、同様のSBの給与により、産卵鶏の免疫増強（Ogawa 2004）、子豚の体重増加（安田ら2008）、ホルスタイン種泌乳牛の乳量や乳成分の増加（Yasudaら2007）に対する効果が報告されている。さらに、Hasunumaら（2011）は、ホルスタイン種雌子牛にSBを給与したところ、腸内細菌の構成に影響を及ぼし、ふんスコアや下痢日数等の改善に効果のあることを報告している。

そこで、デキストランとデキストラン資化性乳酸菌からなるSBを、受精卵移植により生産された哺育期の黒毛和種子牛に給与し、その効果を調査した。

## 材料及び方法

### 1 試験牛

神奈川県畜産技術センターにおいて受精卵移植により生産された黒毛和種子牛11頭（雄5頭、雌6頭）を供試し、試験期間は生後3日齢から17週齢までとした。供試牛はSB添加飼料を給与したSB区（5頭）および無添加飼料を給与した対照区（6頭）に振り分けた。

### 2 飼養管理

供試したSBは、10g中にデキストラン（名糖産業、名古屋）0.5gおよび*Lactobacillus casei* subsp. *casei* JCM1134<sup>T</sup>株（独立行政法人理化学研究所、和光） $1.0 \times 10^8$ 個を含み、生後3日齢

から離乳までは日量10gを代用乳に、離乳後から17週齢までは日量20gを人工乳に添加して給与した。

哺乳は、生後2日齢までは初乳または全乳、生後3日齢から離乳までは抗菌性物質および生菌剤を含まない代用乳（株式会社日本ミルククリプレーサー、神栖）を、午前9時と午後4時に、哺乳瓶または哺乳バケツを用いて給与した。水、人工乳（ニューメイクスター、全国酪農業協同組合連合会、東京）は生後3日齢から、チモシー乾草（1番草、出穂期、カナダ）は離乳後から自由採食させ、残食量を毎日計量した。離乳は人工乳を日量800g以上摂取した時点で行った。

体重は、午前9時の哺乳および飼料給与前に週1回測定した。血液は、2日齢、3週齢、5週齢、10週齢、13週齢および17週齢の午前9時の哺乳および飼料給与前に採取し、採取後直ちに遠心分離（20,000×g、30分間、4℃）により血漿を分離し、分析まで-20℃で保存した。直腸ふんは、5週齢、10週齢、17週齢に採取し、細菌を分離するまで-20℃で保存した。ふん性状は毎日観察し、硬い=0、普通=1、軟便=2、液状=3、水様=4の5段階でスコア化（Cruywagenら1996）し記録した。また、スコア3以上は下痢と判定した。

### 3 ふん中細菌数

ふん中の乳酸菌数と大腸菌群数は、Liuら（2008）の方法を改変して計測した。すなわち、直腸より採取したふん1gを生理食塩水に懸濁して10倍段階希釈し、懸濁液を検査材料とし、乳酸菌はMRS培地（Becton Dickinson and Company, USA）、大腸菌群はマッコンキー寒天培地（栄研化学、東京）に塗布し、それぞれ嫌気培養（37℃、48時間）および好気培養（37℃、24時間）後にcfuから菌数を算出し、対数値で表記した。

### 4 血液生化学成分

血液生化学成分は、総蛋白質、アルブミン、GOT、GGT、尿素窒素、リン、カルシウム、グルコース、遊離脂肪酸、トリグリセリドおよび総コレステロールを自動血液生化学成分測定装置で測定した。

### 5 統計処理

試験区間の有意差検定はt検定で行い、危険率5%未満は有意差あり、5%以上10%未満は

傾向ありとした。

## 結 果

試験期間中の体重の推移（図1）、日増体量および乾物摂取量（表1）はSB区と対照区間に有意差は認められなかった。また、積算ふんスコアおよび下痢発生日数はSB区と対照区間に有意差は認められなかった（表1）。

ふん中乳酸菌数は10週齢および17週齢でSB区が対照区に比べて有意に多く（ $P < 0.05$ 、図2）、大腸菌群数は17週齢においてSB区が対照区に比べて少ない傾向であった（ $P < 0.1$ 、図3）。

血液生化学成分値の各項目はSB区と対照区間に有意差は認められなかった（表2）。

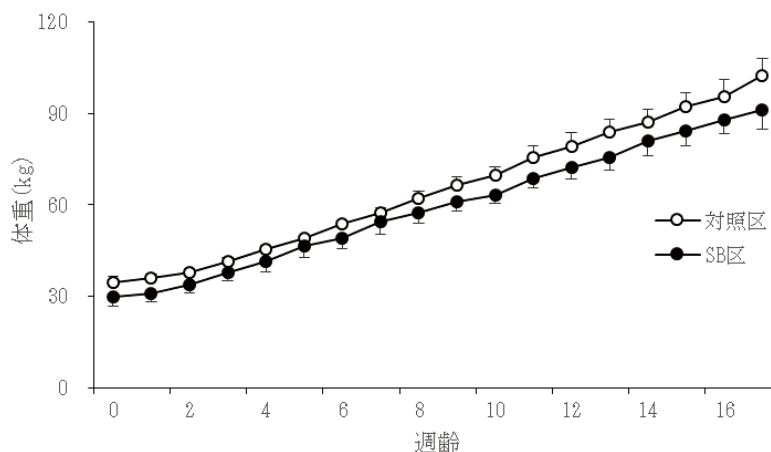


図1 体重の推移

表1 供試牛の日増量、飼料摂取量およびふん性状

試験区	対照区		SB区	
頭数	6		5	
体重, kg				
生時	33.9 ±	1.8	30.0 ±	3.2
離乳時	68.5 ±	1.9	62.7 ±	2.4
17週齢	99.1 ±	5.5	91.2 ±	6.3
日増体量, kg				
全期間	0.54 ±	0.04	0.51 ±	0.04
離乳前	0.51 ±	0.03	0.47 ±	0.02
離乳後	0.59 ±	0.08	0.56 ±	0.07
離乳日齢	69.0 ±	6.3	68.8 ±	2.4
乾物摂取量, kg *	156.8 ±	16.4	141.3 ±	8.2
積算ふんスコア **	146.7 ±	9.4	140.8 ±	5.0
下痢日数 ***	7.2 ±	3.2	4.4 ±	1.7

平均値±標準誤差

\*：試験期間中の代用乳、人工乳およびチモシー乾草の合計

\*\*：試験期間中のふんスコア（0=硬い、1=普通、2=軟便、3=液状、4=水様）の合計

\*\*\*：ふんスコアが3以上の日数

表2 供試牛の血液生化学成分値

成分	試験区	2日		3週		5週		10週		13週		17週	
ALB	SB区	2.8 ± 0.1	3.0 ± 0.5	3.5 ± 0.1	4.0 ± 0.1	3.9 ± 0.1	3.8 ± 0.1						
	対照区	2.8 ± 0.1	3.4 ± 0.1	3.4 ± 0.1	3.7 ± 0.2	3.7 ± 0.2	3.7 ± 0.1						
BUN	SB区	15.5 ± 1.1	9.5 ± 0.5	11.5 ± 1.0	17.0 ± 0.9	21.6 ± 1.2	16.4 ± 1.6						
	対照区	10.9 ± 1.0	12.7 ± 1.4	11.4 ± 0.7	15.2 ± 2.9	16.3 ± 2.0	14.2 ± 2.1						
CA	SB区	11.1 ± 0.4	10.1 ± 0.6	10.1 ± 0.1	10.3 ± 0.1	10.4 ± 0.4	10.3 ± 0.1						
	対照区	11.6 ± 0.5	10.0 ± 0.2	10.4 ± 0.1	8.5 ± 1.7	9.9 ± 0.3	6.4 ± 2.0						
GGT	SB区	1,437.4 ± 362.5	63.8 ± 16.3	39.8 ± 13.5	26.6 ± 4.0	17.3 ± 17.3	18.6 ± 6.7						
	対照区	917.5 ± 204.5	78.7 ± 26.1	31.0 ± 6.4	14.2 ± 3.7	11.8 ± 3.4	12.2 ± 2.4						
GLU	SB区	103.4 ± 4.4	96.2 ± 10.0	109.2 ± 2.2	96.2 ± 4.1	94.8 ± 6.4	96.6 ± 5.4						
	対照区	109.5 ± 4.1	89.3 ± 5.7	91.2 ± 2.6	85.5 ± 4.9	84.3 ± 3.7	87.7 ± 5.1						
GOT	SB区	60.0 ± 5.7	40.8 ± 2.1	56.2 ± 11.5	61.4 ± 6.9	63.8 ± 7.3	62.8 ± 4.4						
	対照区	67.7 ± 16.8	41.8 ± 3.2	46.7 ± 5.4	57.8 ± 5.8	57.3 ± 4.9	63.0 ± 4.9						
IP	SB区	8.6 ± 0.3	8.5 ± 0.4	8.5 ± 0.5	9.2 ± 0.4	9.2 ± 0.2	8.9 ± 0.6						
	対照区	7.3 ± 0.2	7.9 ± 0.3	7.8 ± 0.4	7.3 ± 0.5	7.9 ± 0.4	8.0 ± 0.4						
NEFA	SB区	0.6 ± 0.1	0.4 ± 0.0	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0						
	対照区	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.0	0.3 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.0						
TCHO	SB区	54.0 ± 9.5	155.8 ± 11.9	161.8 ± 19.4	161.6 ± 17.3	66.0 ± 3.7	85.0 ± 8.2						
	対照区	63.5 ± 14.3	113.7 ± 22.6	143.3 ± 17.4	109.7 ± 19.2	98.8 ± 20.1	68.7 ± 8.6						
TG	SB区	49.0 ± 30.2	17.6 ± 4.8	14.2 ± 3.9	20.8 ± 2.8	26.3 ± 6.5	23.6 ± 1.7						
	対照区	25.2 ± 8.8	14.0 ± 2.3	9.0 ± 1.1	20.2 ± 4.8	19.8 ± 4.0	11.8 ± 3.7						
TP	SB区	7.6 ± 0.7	5.8 ± 0.9	6.6 ± 0.3	6.9 ± 0.2	6.8 ± 0.3	6.5 ± 0.5						
	対照区	6.8 ± 0.2	6.3 ± 0.1	6.7 ± 0.1	7.4 ± 0.5	7.2 ± 0.3	7.0 ± 0.3						

平均値±標準誤差

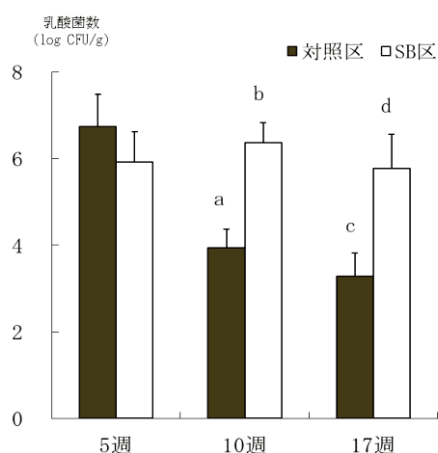


図2 ふん中乳酸菌数の推移  
ab間、cd間に有意差あり ( $P < 0.05$ )

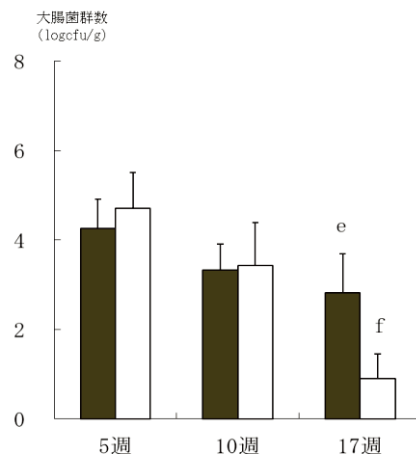


図3 ふん中の大腸菌群数の推移  
ef間に傾向あり ( $P < 0.1$ )

## 考 察

嶋と光岡 (1983) は、出生から6週齢までの哺乳子牛のふん中細菌数は成長に伴って減少する傾向を認めている。また、上野と板橋 (2012) は、プレバイオティクスであるセロピオースを給与した子牛では3週齢において乳酸桿菌が増加したものの、離乳時には非給与区と差が認められないことを報告している。一方、プレバイオティクスであるオリゴ糖の給与は子牛の腸内細菌叢の改善に効果の

あることが報告されている (佐藤 2001 ; 中井ら 2007 ; 向井ら 2008 ; 大塚ら 2013)。さらに、Hasunuma ら (2011) および蓮沼ら (2011) は、ホルスタイン種子牛においてSB由来の乳酸菌が1週齢からふん中に検出され、下部消化管にまで到達していることを確認するとともに、5週齢でふん中乳酸菌数が有意に増加し、10週齢でふん中大腸菌群数が有意に減少していることを報告している。本



研究では、SB由来の乳酸菌の検出は行っていないが、SB区ではふん中大腸菌数が有意に多く、ふん中大腸菌群数が少ない傾向が認められ、黒毛和種子牛においても、哺育期におけるSBの給与が腸内細菌叢に影響を及ぼすことが示唆された。

プロバイオティクスである乳酸菌の子牛への給与は体重増加や下痢防止に効果があることが報告されている (Abeら 1995; Cruywagenら 1996)。Hasunumaら (2011)は、生後3日齢から90日齢のホルスタイン種雌子牛へのSBの給与が、有意ではないがふん性状や下痢日数を改善することを報告している。本研究では、生後3日齢から17週齢の黒毛和種子牛にSBを給与し、下痢日数は対照区に比べて有意差は認められなかった。

なお、これまでの哺育期の子牛に対する研究においては、Hasunumaら (2011)は10g中にデキストラン5gと乳酸菌 $10^9$ 個、蓮沼ら (2011)はデキストラン1gと乳酸菌 $10^{10}$ 個を含むSBを用い、ふん性状や下痢日数の改善効果が認められたこと報告している。

本研究で用いたSBは10g中にデキストラン0.5gと乳酸菌 $10^8$ 個を含み、これまでの研究と比べてデキストランや乳酸菌の含量が少ないものであったが、腸内細菌叢への影響が示唆された。一方、ふんの性状、発育、飼料摂取量に対する効果は確認できなかったことから、今後は、SBの給与量や濃度の設定等について、さらなる検討が必要であると考えられた。

### 引用文献

- Abe F, Ishibashi N, Shimamura S. 1995. Effect of administration of bifidobacteria and lactic acid bacteria to newborn calves and piglets. *Journal of Dairy Science* 78, 2838-2846.
- Cruywagen CW, Jordan I, Venter L. 1996. Effect of *Lactobacillus acidophilus* supplementation of milk replacer on preweaning performance of calves. *Journal of Dairy Science* 79, 483-486
- 福島護之. 2012. 子牛の栄養と感染症. 家畜感染症学会誌 1, 49-55
- Gibson GR, Roberfoid MB. 1995. Dietary modulation of human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition* 125, 1401-1412.
- Hasunuma T, Kawashima K, Nakayama H, Murakami T, Kanagawa H, Ishii T, Akiyama K, Yasuda K, Terada F, Kushibiki S. 2011. Effect of cellooligosaccharide or symbiotic feeding on growth performance, fecal condition and hormone concentrations in Holstein calves. *Animal Science Journal* 82, 543-548.
- 蓮沼俊哉, 川嶋賢二, 中山博文, 野田正人, 金川博行, 村上俊明, 石田美保, 永島茂男, 石井貴茂, 脇本亘, 秋山清, 安田憲司, 上野豊, 櫛引史郎. 2011. 乳用子ウシの発育に対するセロオリゴ糖およびシンバイオティクスの給与効果. 富山県農林水産総合技術センター畜産研究所研究報告 2, 1-32.
- Liu P, Piao XS, Kim SW, Wang L, Shen YB, Lee HS, Li SY. 2008. Effect of chito-oligosaccharide supplementation on the growth performance, nutrient digestibility, intestinal morphology, and fecal shedding of *Escherichia coli* and *Lactobacillus* in weaning pigs. *Journal of Animal Science* 86, 2609-2618.
- 向井真知子, 近藤夏子, 大塚浩通, 藤原めぐみ, 小比類巻正幸, 勝田賢, 安藤貴朗, 及川正明. 2008. 感染症の多発した1農場における導入子牛へのイソマルトオリゴ糖製剤給与における疾病予防効果. 日本家畜臨床感染症研究会誌 3, 23-31.
- 中井朋一, 佐藤忠, 佐渡谷裕朗, 名倉泰三, 花田正明, 岡本明治. 2007. 哺乳子牛の成長に伴う糞便中の細菌数及び有機酸濃度の変化とラフィノース給与の影響. 日本畜産学会報 78, 167-172.
- 小川知彦, 朝井康行, 安田憲司, 坂本弘美, 橋川真之介. 2004. デキストラン資化性 *Lactobacillus casei* subsp. *casei* の経口的免疫増強作用. 機能性食品と薬理栄養, 2, 15-21.
- Ogawa T, Asai Y, Sakamoto H, Yasuda K. 2006 Oral immunoadjuvant activity of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* in dextran-fed layer chickens. *British Journal of Nutrition*. 95, 430-434.
- 大塚誠, 山本英治, 高田良三. 2013. 離乳子牛へのセロビオース投与がルーメン細菌叢に及ぼす影響. 関東畜産学会報 64, 1-6.



- 佐野公洋. 2009. 子牛の科学、日本家畜臨床感染症研究会編、チクサン出版社、東京、pp85-91.
- 佐藤友吾. 2001. 肉用牛の増体・下痢に対するデキストランオリゴ糖の効果. 家畜診療 48, 653-657.
- 嶋英邦, 光岡知足. 1983. 子牛の腸内フローラに及ぼすパントテイン酸投与の影響. 日本獣医師会雑誌 36, 584-588.
- 上野豊, 板橋久雄. 2012. 分子生物学的手法による子牛の下部消化管細菌叢動態の解析. 栄養生理研究会報. 56. 13-24
- 安田憲司. 2008. デキストラン資化性乳酸桿菌を用いたシンバイオティクスの畜産分野への応用. 栄養生理研究会報 52, 23-30.
- Yasuda K, Hashikawa S, Sakamoto H, Tomita Y, Shibata S, Fukata T. 2007. A new synbiotic consisting of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* and dextran improves milk production in Holstein dairy cows. *Journal of Veterinary Medical Science* 69, 205-208.

## ホルスタイン種経産牛における性選別精液を用いた 体内胚採取のための過剰排卵処理

秋山清・折原健太郎・坂上信忠

Superovulation in Holstein Cows using Sex-sorted Sperm

Kiyoshi AKIYAMA, Kentaro ORIHARA and Nobutada SAKAGAMI

ホルスタイン種経産牛に対して性選別精液を用いて体内胚を採取するための過剰排卵処理方法を検討した。

試験1：卵胞波調整と排卵促進処理を併用した過剰排卵処理を行った供胚牛に対して、非選別区は通常精液、選別区は性選別精液を人工授精して胚を採取した。非選別区は2頭中1頭、選別区は2頭中2頭で正常胚が得られ、正常胚数は2.5個および10.5個、正常胚率は49.5%および84.7%であった。

試験2：過剰排卵処理を行った供胚牛に対して、PG48h区はFSH投与開始から48時間、PG72h区はFSH投与開始から72時間にPGF2 $\alpha$ 製剤を投与し、性選別精液を人工授精して胚を採取した。PG48h区では3頭中2頭、PG72h区では3頭すべてから正常胚が得られ、正常胚数は3.3個および11.7個、正常胚率は32.8%および89.8%であった。

試験3：過剰排卵処理前の卵胞波調整方法として、DFR区は黄体ホルモン製剤留置後5日に直径8mm以上の卵胞を吸引除去し、EB区は黄体ホルモン製剤挿入時にエストラジオール製剤を投与した後に過剰排卵処理を行い、性選別精液を人工授精して胚を採取した。両区とも4頭中3頭で正常胚が採取され、正常胚数は8.0個および6.8個、正常胚率は61.7%および44.6%であり、有意差は認められなかった。

全ての試験成績の合計から、性選別精液を用いて採胚を行った14頭中11頭で正常胚が採取され、正常胚数は8.9個であり、卵胞波調整と排卵促進処理を併用した過剰排卵処理により実用性のある採胚成績が得られることが確認された。

キーワード：ホルスタイン種経産牛、性選別精液、過剰排卵処理、  
卵胞波調整、排卵促進

---

酪農経営において畜主が希望する性別の子牛を得ることは、後継牛の計画的な生産を実現し、経営の安定化と効率化のために極めて有効な手段になると考えられる。最近、希望する性別の子牛を90%以上の確率で生産することができる性選別精液が市販され、後継牛生産に利用することが期待されている。しかし、性選別精

液はストロー1本あたりに充填された精子数が通常精液に比べて少ないことなどから、経産牛では人工授精後の受胎率が低いこと（Anderssonら2006；DeJarnettら2008；Schenkら2009；DeJarnetteら2011）や過剰排卵処理後に採取した胚の移植可能胚率や受精卵率が低いこと（Hayakawারা2009；Peippoら2009；Larsonら

2010) などが指摘されており、技術普及のために改善が望まれている。

Hayakawa ら (2009) は、過剰排卵処理後の経産牛に性選別精液を用いて1回のみ的人工授精を行った場合に通常精液と比べて正常胚率の低下と未受精卵率の増加が認められることを報告している。一方、高岡ら (2014) は人工授精を発情発見後24時間とその12時間後の2回とし、性選別精液の使用本数を増やすことで、経産牛において移植可能胚率や凍結可能胚率の低下が認められないこと、Larson ら (2010) は授精回数を3回、精液本数を4本とすることで性選別精液と通常精液で未受精卵数に差が認められないことを報告しており、適期の人工授精が有効なことが推察される。

生体内卵子吸引 (以下、OPU) により体内成熟卵子を採取するために過剰排卵処理後の排卵時間を調査した Matoba ら (2014) の報告によると、ホルスタイン種乾乳牛に対して大型卵胞の吸引除去による卵胞波調整と性腺刺激ホルモン放出ホルモン製剤 (以下、GnRH 製剤) 投与による排卵促進を併用した過剰排卵処理を行い、超音波画像診断により経時的に排卵時間を調査したところ、GnRH 投与後 29~32 時間に排卵が集中することを報告している。そこで、卵胞波調整と排卵促進を併用した過剰排卵処理方法をホルスタイン種泌乳牛の体内胚採取に応用すれば、GnRH 製剤投与時間を基準とした適期の人工授精が可能となり、性選別精液を用いた場合にも採胚成績の向上につながるものと考えられる。

本研究はホルスタイン種経産牛に対して性選別精液を用いて体内胚を採取するための過剰排卵処理方法を構築することを目的として以下の試験を行った。

試験1では、通常精液と性選別精液による採胚成績を比較し、卵胞波調整と排卵促進処理を併用した過剰排卵処理の有効性を検討した。

試験2では、通常精液を用いた場合に正常胚数の増加が認められた卵胞刺激ホルモン製剤 (以下、FSH) 投与後のプロスタグランジン F<sub>2</sub>α 製剤 (以下、PG) 投与時間を遅らせた過剰排卵処理 (中原ら、2012) が、性選別精液を用いた採胚に対する効果を検討した。

試験3では、性選別精液を利用するための過剰排卵処理方法を野外に普及するために、DFR による卵胞波調整の代替としてエストラジオール製剤の利用について検討した。

## 材料及び方法

### 1 供試牛

当所で飼養するホルスタイン種経産牛 (延べ11頭) を供試した。

### 2 過剰排卵処理

Matoba ら (2014) および秋山ら (2016) の方法に準じて、発情周期の任意の時期の供試牛に腔内留置型黄体ホルモン製剤 (以下、CIDR、シダー1900; (株)ファイザー製薬、東京) を留置 (0日目) し、5日目に直径8mm以上の卵胞を吸引除去した (以下、DFR)。6日目夕方から10日目の朝まで FSH (アントリン R10; (株)共立製薬、東京) を漸減投与 (夕朝8回、6、6、4、4、3、3、2、2AU、合計30AU) し、8日目夕方に PG (0.225mg、ダルマジン; 共立製薬、東京) を投与し、9日目朝に CIDR を抜去して発情を誘起した。10日目朝に GnRH 製剤 (0.2mg、スポルネン; (株)共立製薬、東京) を投与した。

### 3 人工授精および採胚

ホルスタイン種の通常精液 (家畜改良事業団、東京) は1本を左右子宮角に半量ずつ注入し、性選別精液 (精子濃度  $6 \times 10^6$  個/mL、Sort90 採卵用、家畜改良事業団、東京) は左右子宮角に1本ずつ注入した。精液の融解は Sort90 人工授精マニュアル (家畜改良事業団、東京) に従って行い、GnRH 投与の24時間後に通常精液注入器 ((株)富士平工業、東京) を用いて両子宮角の浅部に注入し、採胚は人工授精後6日目の午前中に子宮灌流により行った。

### 4 卵胞数

卵胞数は超音波画像診断装置 (SSD3500; (株)アロカ、東京) を用いて、直径8mm以上の卵胞を吸引除去した時、FSH 投与開始時、GnRH 投与時、人工授精時および人工授精後24時間に直径8mm以上の大卵胞を計数した。

### 5 試験区

#### (1) 試験1

ホルスタイン種経産牛4頭を通常精液を授精する非選別区および性選別精液を授精する選別区に振り分けて供試した。

#### (2) 試験2

ホルスタイン種経産牛3頭を供試し、PG 投与を FSH 投与開始から48時間に行う PG48h 区と FSH 投与開始から72時間に行う PG72h 区の処理を60日以上の間隔を空けて反転して行った。

#### (3) 試験3

ホルスタイン種経産牛4頭を供試し、卵胞波調整を CIDR 挿入後3日目の DFR により行う DFR

区と CIDR 挿入時の安息エストラジオール製剤 (1mL、オバホルモン; (株)あすかアニマルヘル

ス、東京) 投与により行う EB 区の処理を 60 日以上の間隔を空けて反転して行った。

試験 1 試験 2 の PG48h 区		試験 2 の PG72h 区 試験 3 の DFR 区		試験 3 の EB 区	
日	9:00	日	9:00	日	9:00
0	CIDR挿入	0	CIDR挿入	0	CIDR挿入, EB
5	DFR	5	DFR	4	FSH
6	FSH	6	FSH	5	FSH
7	FSH	7	FSH	6	FSH
8	FSH, PG	8	FSH	7	FSH, PG
9	FSH, CIDR除去	9	FSH, PG	8	FSH, CIDR除去
10	FSH, GnRH	10	FSH, CIDR除去	9	GnRH
11	人工授精	11	GnRH	10	人工授精
17	採胚	18	採胚	16	採胚

CIDR: 膈内留置型黄体ホルモン製剤  
DFR: 直径8mm以上の卵胞の吸引  
EB: エストラジオール製剤  
FSH: 卵胞刺激ホルモン製剤  
GnRH: 性腺刺激ホルモン放出ホルモン製剤  
PG: プロスタグランジンF2 $\alpha$ 製剤

図 1 各試験区の処理スケジュール

## 6 統計処理

試験 3 の試験区間の有意差検定は t 検定で行い、危険率 5%未満は有意差ありとした。

### 結果

試験 1 では、非選別区は 2 頭中 1 頭、選別区は 2 頭中 2 頭で正常胚が得られ、正常胚数は 2.5 個および 10.5 個、正常胚率は 49.5%および 84.7%であった (表 1)。正常胚の発育ステージは、非選別区では初期胚盤胞、選別区では胚盤胞が多かった (表 2)。処理中の大卵胞数は、非選別区では GnRH 投与時、選別区では AI 時が多かった (表 3)。

試験 2 では、PG48h 区では 3 頭中 2 頭、PG72h 区では 3 頭すべてから正常胚が得られ、正常胚

数は 3.3 個および 11.7 個、正常胚率は 35.8%および 89.8%であった (表 4)。正常胚の発育ステージは両区ともに後期桑実胚が最も多かった (表 5)。大卵胞数は PG48h 区では AI 時、PG72h 区では GnRH 投与時が多かった (表 6)。

試験 3 では、両区とも 4 頭中 3 頭で正常胚が採取され、正常胚数は 8.0 個および 6.8 個、正常胚率は 61.7%および 44.6%であった (表 7)。正常胚の発育ステージは両区ともに後期桑実胚が最も多かった (表 8)。大卵胞数は、FSH 投与開始時に DFR 区は 0.0 個、EB 区では 2.0 個であり、両区とも GnRH 投与時が多かった (表 9)。いずれの項目も有意差は認められなかった。

表 1 試験 1 の採胚成績

試験区	供試頭数	推定黄体数	遺残卵胞数	採胚総数	正常胚数	正常胚率 (%)	変性胚数	変性胚率 (%)	未受精卵数	未受精卵率 (%)
非選別区	2	6.5	2.0	4.0	2.5	49.5	1.5	55.0	0.0	0.0
選別区	2	13.0	2.5	12.5	10.5	84.7	0.5	11.4	1.5	4.0

表 2 試験 1 の正常胚の品質ランクと発育ステージ

試験区	供試頭数	ランク				発育ステージ			
		A	A'	B	C	M	CM	EB	BL
非選別区	2	0.0	1.0	1.5	0.0	0.0	0.5	2.0	0.0
選別区	2	0.5	2.5	4.0	3.5	0.5	1.5	1.0	7.5

M: 桑実胚、CM: 後期桑実胚、EB: 初期胚盤胞、BL: 胚盤胞

表3 試験1の大卵胞数の推移

試験区	供試頭数	DFR時	FSH投与開始	GnRH投与時	AI時	AI後24時間
非選別区	2	1.5	0.5	9.5	6.5	3.0
選別区	2	1.0	0.0	19.5	23.5	5.5

表4 試験2の採胚成績

試験区	供試頭数	推定黄体数	遺残卵胞数	採胚総数	正常胚数	正常胚率(%)	変性胚数	変性胚率(%)	未受精卵数	未受精卵率(%)
PG48h区	3	11.3	5.3	8.0	3.3	35.8	2.0	45.0	2.7	22.2
PG72h区	3	15.0	5.0	14.0	11.7	89.8	1.7	7.6	0.7	2.7

表5 試験2の正常胚の品質ランクと発育ステージ

試験区	供試頭数	ランク				発育ステージ			
		A	A'	B	C	M	CM	EB	BL
PG48h区	3	0.0	1.0	1.0	1.3	0.7	2.7	0.0	0.0
PG72h区	3	0.7	1.7	3.7	5.7	2.3	6.0	1.0	2.3

M: 桑実胚、CM: 後期桑実胚、EB: 初期胚盤胞、BL: 胚盤胞

表6 試験2の大卵胞数の推移

試験区	供試頭数	DFR時	FSH投与開始	GnRH投与時	AI時	AI後24時間
PG48h区	3	4.0	0.0	18.3	21.0	10.0
PG72h区	3	1.7	1.7	25.0	16.7	8.3

表7 試験3の採胚成績

試験区	供試頭数	推定黄体数	遺残卵胞数	採胚総数	正常胚数	正常胚率(%)	変性胚数	変性胚率(%)	未受精卵数	未受精卵率(%)
DFR区	4	14.8	1.8	12.0	8.0	61.7	2.5	21.7	1.5	16.7
EB区	4	19.3	3.0	17.5	6.8	44.6	6.8	34.7	4.0	20.7

表8 試験3の正常胚の品質ランクと発育ステージ

試験区	供試頭数	ランク				発育ステージ			
		A	A'	B	C	M	CM	EB	BL
DFR区	4	3.5	1.3	2.3	1.0	0.3	7.5	0.3	0.0
EB区	4	0.5	2.5	2.3	1.5	0.0	5.5	0.5	0.8

M: 桑実胚、CM: 後期桑実胚、EB: 初期胚盤胞、BL: 胚盤胞

表9 試験3の大卵胞数の推移

試験区	供試頭数	CIDR挿入時	FSH投与開始	GnRH投与時	AI時	AI後24時間
DFR区	4	2.5	0.0	17.8	13.0	2.3
EB区	4	2.0	2.0	23.0	14.0	2.3

### 考察

本研究は、卵胞波調整と排卵促進を併用した過剰排卵処理を行ったホルスタイン種経産牛に対して性選別精液を利用するための処理方法に

ついて検討したものである。

試験1では、ホルスタイン種経産牛において6 × 10<sup>6</sup>個/mLの性選別精液2本をGnRH投与後24時



間に人工授精したところ、通常精液に比べて正常胚率が高く、これまでの報告(Hayakawaら2009; Kaimioら2013; 高岡ら2014)にあるように人工授精回数や精液本数を増やさなくても未受精卵率の増加は認められなかった。このことから、卵泡波調整と排卵促進を併用した過剰排卵処理を行いGnRH投与後24時間に人工授精を行うことで、性選別精液を利用して効率的な体内胚の採取が可能であると推察された。

試験2では、中原ら(2012)の報告に準じてFSH投与後のPG投与時間を72時間とし性選別精液を用いて採胚を行った。その結果、PG48h区に比べて正常胚数が増加し、さらに正常胚率も高い結果が得られた。Mapletoftら(2015)はFSH投与日数を7日間とした場合にFSH投与日数を4日間とした場合と比べて黄体数や正常胚数が増加し、FSH投与期間を延長することが採胚成績の向上に有効なことを報告している。本研究ではFSH投与期間は延長せずPG投与をFSH投与後48時間から72時間に遅らせた。このことにより、PG投与前のFSH投与回数が増加し卵泡発育が促されたことで、採胚成績の向上につながった可能性があると考えられた。

試験1および試験2では、CIDR留置後に直径8mm以上の卵泡を吸引除去することにより卵泡波調整を行った。しかし、性選別精液を利用するための過剰排卵処理方法を野外に普及するためには、ホルモン剤を利用して卵泡波調整を行う方法が実用的である。そこで、試験3ではCIDR留置と同時にエストラジオール製剤を投与し卵泡波調整を行う方法で採胚成績を調査した。その結果、エストラジオール製剤を投与したEB区の採胚成績は大型卵泡を吸引除去したDFR区と比べて有意差は認められなかった。卵泡波調整には主席卵泡の吸引除去のほかエストラジオール製剤を用いる方法とGnRH製剤を用いる方法がある。日高ら(2015)は黒毛和種牛に対するOPUの前処置としてGnRH製剤投与とエストラジール製剤投与を比較したところ、卵泡数や採取卵子数はいずれの方法も無処置区より増加し、どちらの方法も卵泡波の調整に効果があることを報告している。しかし、GnRH製剤投与による卵泡波調整は、その後のPG投与までの日数によってはPGに反応することができる黄体が形成されないことが考えられる。このことから、体内胚採取

のための卵泡波調整にはエストラジオール製剤を投与する方法が有効であり、本研究の結果からも主席卵泡の吸引除去の代用として利用可能と考えられた。

本研究は少頭数の試験成績ではあるが、性選別精液を用いた場合にも多数の正常胚が得られることが確認された。平井(2014)はホルスタイン種の体内胚の採取において正常胚数が0個の個体の割合は、経産牛で21%であり未経産牛や黒毛和種に比べて多く、正常胚数は5.3個であったと報告している。本研究の各試験の成績を合計してみると、性選別精液を用いて採胚を行った14頭のうち正常胚が0個の個体は3頭(21%)、正常胚数は8.9個であり、平井(2014)の報告と比べても実用性のある採胚成績が得られることが確認された。

以上のことから、本研究で用いた卵泡波調整と排卵促進を併用した過剰排卵処理は、性選別精液を用いてホルスタイン種経産牛から体内胚を採取するために有効な方法であると考えられた。

#### 謝辞

本試験の実施に当たりご指導いただいた家畜改良センター十勝牧場稲葉泰志氏および家畜改良事業団家畜バイテクセンター濱野晴三氏に感謝の意を表します。

#### 引用文献

- 秋山清、坂上信忠、中川浩、瀬田剛史、河合愛美、長井誠、林みち子、的場理子、稲葉泰志、松田秀雄、今井敬、下司雅也. 2016. 多排卵処理後に採取した卵泡内卵子と性選別精液の体外受精によるウシ性判別胚の生産. 日本畜産学会報 87, 107-113.
- Andersson M, Taponen J, Kommeri M, Dahlbom M. 2006. Pregnancy rates in lactating Holstein-Friesian cows after artificial insemination with sexed sperm. *Reproduction Domestic Animal* 41, 95-97.
- DeJarnett JM, Nebel RL, Marshall CE, Moreno JF, McCleary CR, Lenz RW. 2008. Effect of sex-sorted sperm dosage on conception rates in Holstein heifers and lactating cows. *Journal of Dairy Science* 91, 778-1785.
- DeJarnett JM, Nebel RL, Marshall CE. 2011.

- Evaluating the success of sex-sorted semen in US dairy herds from on farm records. *Theriogenology* 71, 49-58.
- Hayakawa H, Hirai T, Takimoto A, Ideta A, Aoyagi Y. 2009. Superovulation and embryo transfer in Holstein cattle using sexed sperm. *Theriogenology* 71, 68-73.
- 日高健雅、森本和秀、今井昭、栗原幸一、福本豊、山崎瑞穂、横田文彦、山本祐輔、尾形康弘、山田博道、堀内俊孝. 2015. エストラジオール製剤投与が経膈採卵一体外受精精液に及ぼす影響. 広島県獣医学会雑誌 30, 43-48.
- 平井俊哉. 2014. 道東における牛の過剰排卵処理・胚回収の取り組み. 日本胚移植学雑誌 35, 43-46.
- Kaimio I, Mikkalo M, Lindeberg H, Heikkinen J, Hasler JF, Taponen J. 2013. Embryo production with sex-sorted semen in superovulated dairy heifers and cows. *Theriogenology* 80, 950-954 から 2013
- Larson JE, Lamb GC, Funnell BJ, Bird S, Martins A, Rodgers JC. 2010. Embryo production in superovulated Angus cows inseminated four times with sexed-sorted or conventional, frozen-thawed semen. *Theriogenology* 73, 698-703.
- Matoba S, Yoshioka H, Matsuda H, Sugimura S, Aikawa Y, Ohtake M, Hashiyada Y, Seta T, Nakagawa K, Lonergan P, Imai K. 2014. Optimizing production of in vivo-matured oocytes from superstimulated Holstein cows for in vitro production of embryos using X-sorted sperm. *Journal of Dairy Science* 97, 743-53.
- Mapletoft RJ, Garcia Guerra A, Dias FC, Singh J, Adams GP. 2015. In vitro and in vivo embryo production in cattle superstimulated with FSH for 7 days. *Animal Reproduction* 12, 383-388.
- 中原仁、小田亘、立川優子. 2012. ホルスタイン種における過剰排卵処理方法の検討. 第 19 回日本胚移植研究会大会講演要旨. 13.
- Peippo J, Vartia K, Kananen-Anttila K, Rätty M, Korhonen K, Hurme T, Myllymäki H, Sairanen A, Mäki-Tanila A. 2009. Embryo production from superovulated Holstein-Friesian dairy heifers and cows after insemination with frozen-thawed sex-sorted X spermatozoa or unsorted semen. *Animal Reproduction Science* 111, 80-92.
- Schenk JL, Cran DG, Everett RW, Seidel Jr GE. 2009. Pregnancy rates in heifers and cows with cryopreserved sexed sperm: Effects of sperm numbers per inseminate, sorting pressure and sperm storage before sorting. *Theriogenology* 71, 717-728.
- 高岡亜沙子、谷口雅康、音井威重. 2014. ホルスタイン種牛の過剰排卵処置における雌雄選別精液の有用性の検討. 日本胚移植学雑誌 36, 59-63.



## 神奈川県におけるトウモロコシ二期作の経済性

折原健太郎

The Cost Performance of Silage Corn for Double Cropping in Kanagawa

Kentaro Orihara

トウモロコシサイレージの生産費について、単作および二期作体系における生産費および作付面積における損益分岐点について検討した。サイレージ給与量から試算した、トウモロコシサイレージ 1kg の生産費の損益分岐点は、1日1頭あたり 10kg 給与では 17.4 円、20kg 給与では 21.1 円であった。経営圃場面積の損益分岐点は、1日1頭あたりのトウモロコシサイレージの給与量が 20kg および 10kg 場合、二期作では 2.6ha および 3.7ha、単作では 4.1ha および 5.8ha であった。

キーワード：作付面積、生産費、損益分岐点、トウモロコシサイレージ、トウモロコシ二期作

神奈川県における 2014 年の飼料作物の作付面積は、牧草が 184ha、トウモロコシが 251ha、ソルガムが 40ha であり、それぞれ 7,270t、11,500t、1,480t が収穫され、10a あたりの収量は、3,950kg、4,600kg、3,710kg であった（農林水産省関東農政局統計部企画課 2016）。トウモロコシは、高収量で栄養価が高く、嗜好性も良いことから、自給飼料の増産を図るためには、トウモロコシの作付面積を拡大することが有効である。

神奈川県におけるトウモロコシの作付けは、トウモロコシの単作あるいはトウモロコシと冬作物の二毛作が大部分を占めているが、先進的な酪農家では近年の温暖化の影響により、九州地方等の暖地の作付体系と考えられてきたトウモロコシ二期作が、関東南部においても安定栽培が可能となり（折原ら 2012、折原ら 2012a、2012b、2012c、2012d、折原 2017）、神奈川県においても取り組みが広がっている（折原 2010、2014）。

関東南部におけるトウモロコシ二期作は、温暖地における多収な作付体系であるトウモロコシとイタリアンライグラスの二毛作と比較して、生草収量は同程度であるが、乾物収量および TDN 収量では 24% および 30% 多収となる土地生産性に優れた多収な作付体系であり（折原ら 2012a）、新たに土地を入手する必要もなく、トウモロコシの作付面積拡大の有効な手段の一つである。

そこで、本研究では、トウモロコシサイレージの生産費について、トウモロコシ単作体系（以下、

単作）およびトウモロコシ二期作体系（以下、二期作）における生産費および作付面積における損益分岐点について検討した。

### 材料と方法

生産費は、経営面積 8ha の圃場において、トウモロコシ二期作、トウモロコシとイタリアンライグラスまたはエンバクの二毛作で自給飼料を生産している農家から、生産資材費、作業内容および時間、機械の取得金額および耐用年数について聞き取った。サイレージ調製は、全て細断型ロールベアラでロールベールサイレージを調製し、農場から 1km 離れた圃場から運搬した場合について試算した。機械の減価償却費は取得金額を耐用年数で除した金額、修繕費は取得金額の 1.5%、労働費は時給 2,500 円として求めた。

トウモロコシの栽培方法は、単作および二期作の 1 作目では堆肥散布、耕耘、播種、除草剤散布、収穫の作業を実施し、二期作の 2 作目では堆肥散布、耕耘の作業を省略し、不耕起播種機で播種し、除草剤散布および収穫の作業を実施した。収穫は、細断型ロールベアラでサイレージ調製し、農場に運搬して貯蔵した。

サイレージ生産量は、単作では引地ら（2009）の報告、二期作では折原ら（2012b）の報告から、単作および二期作の作付面積 1ha あたりのサイレージ生産量を 50t および 90t と設定した。

サイレージ生産費の損益分岐点は、すべて購入

表1 作付面積1haあたり必要な生産資材費

資材	内容	単位	単価	使用量	金額 (円)
種子		50a用	20,000	2	40,000
肥料	硫安	20kg	1,000	50	50,000
農薬	種子消毒剤	200ml	1,500	4	6,000
	除草剤	1L	6,500	2	13,000
	除草剤	100g	1,000	5	5,000
燃料	軽油	1L	140	300	42,000
合計					156,000

表2 サイレージ1tあたり必要な生産資材

資材	規格	単位	単価	金額 (円)	備考
ラップフィルム	50cm	本	15,500	1,384	32個/本
ネット	100cm	本	33,000	629	150個/本
合計				2,013	

<sup>1</sup>ロールベール1個あたり350kgとして計算した

表3 機械償却費および修繕費

機械	規格	適応トラクタ (PS)	耐用年数
トラクタ	90PS		15
トラクタ + フロントローダ	95PS, バケット, ベールグラブ		15
ロータリ	作業幅 2.2m	55~75	15
マニュアルスプレッタ	積載容量 6 m <sup>2</sup>	45~80	15
プラウ	3連 (リバーシブル)	80~100	25
ツースハロ	作業幅3m	25~45	25
播種機	2条	25~60	15
K型ローラ	作業幅2.4m	35~80	25
スプレイヤ	600 L	15以上	20
コーンハーベスタ	1条	35~80	10
細断型ロールベアラ	φ85cm × 85cm		10
ラップマシーン	自走式		10
トレーラ	最大積載量3,500kg	35~80	25
トラクタ	30PS		15
不耕起播種機	2条	28~	15

飼料を給与した場合と比較して、同額となるサイレージ生産費とした。

## 結 果

作付面積に従って必要量が変化する資材を表1、サイレージ生産量に従って必要量が変化する資材を表2に示した。作付面積に従って必要量が変化

する資材は、種子、肥料、農薬、燃料で作付面積1ha 当たりに必要な生産資材は 156,000 円であった。サイレージ生産量に従って必要量が変化する資材は、ラップフィルムおよびネットで、サイレージ 1t 当たり必要な生産資材は 2,013 円であった。

トウモロコシサイレージの生産に必要な機械、および耐用年数を表3に示した。単作ではトク

タ2台、ロータリ、マニユアスプレッタ、プラウ、ツースハロ、播種機、K型ローラ、スプレイヤ、コーンハーベスタ、細断型ロールベアラ、ラップマシーン、トレーラが必要であり、取得金額の総額は29,410,000円であり、年間の減価償却費および修繕費は2,082,067円および441,150円であった。二期作では、単作に必要な機械に加えて、トラクタ1台および不耕起播種機が必要となり、取得金額の合計は33,610,000円であり、年間の減価償却費は2,362,067円、修繕費は504,150円であった。

単作における、労働時間および労働費を表4に示した。作付面積1haあたりの延べ労働時間は71時間、労働費は177,500円であった。二期作では、1作目は単作と同一の延べ労働時間は71時間、労働費は177,500円、2作目は1作目と比較して堆肥散布、耕耘が省略され、播種は作業人数1人で2時間の作業となるため、延べ労働時間は42時間、労働費は105,000円であり、年間の延べ労働時間は113時間、労働費は282,500円であった。

単作および二期作におけるサイレージ生産費を表5に示した。種子、肥料、農薬、燃料および消耗品等の生産資材費および労働費は、圃場面積の増加に従って増加したが、減価償却費および修繕費の機械費は圃場面積に関わらず一定であった。圃場面積が5haの場合、平年の1kgあたりのサイレージ生産費およびTDN生産費は、単作では18.8円および102.0円、二期作では15.0円および81.5

円であった。

サイレージ生産費に占める機械費の割合を図1に示した。圃場面積1~10haにおける平年の生産費に占める機械費の割合は、単作では85~37%、二期作では79~27%であり、面積の増加に従って機械費の割合は減少した。圃場面積が同じなら、二期作の方が単作より少なくなった。

サイレージ給与量による生産費の損益分岐点を表6に示した。1日1頭あたりのサイレージ給与量を10kgおよび20kgとした場合、トウモロコシサイレージを給与しない場合と比較して、配合飼料では2kgおよび3kg削減、チモシー乾草では同量および4kgの削減、スーダングラス乾草ではそれぞれ2kgの削減、アルファルファ乾草では1kgおよび2kgの増加となった。購入飼料費は、トウモロコシサイレージを給与しない場合では1,574円であったが、トウモロコシサイレージを10kgおよび20kg給与することにより1,400円および1,152円となり、それぞれ174円および422円の削減となった。購入飼料費の削減額と給与量から試算したトウモロコシサイレージ1kgの生産費の損益分岐点は、10kg給与では17.4円、20kg給与では21.1円であった。

サイレージ給与量による経営圃場面積の損益分岐点を表7に示した。1日1頭あたりトウモロコシサイレージを20kgおよび10kg給与した場合、二期作では2.6haおよび3.7ha、単作では4.1haおよび5.8haであった。

表4 単作における作付面積1haあたりの労働費

作業	作業機	作業人数	延べ労働時間 (時間)	労働費 <sup>1</sup> (円)
堆肥散布	マニユアスプレッタ	1	8	20,000
	ローダ			
耕耘	プラウ	1	12	30,000
	ロータリー			
播種	ツースハロー	1	11	27,500
	播種機			
	K型ローラー			
除草剤	スプレイヤ	1	4	10,000
収穫	細断型ロールベアラ	2	24	60,000
	自走式ラップマシーン			
運搬	バールグラブ	2	12	30,000
	トレーラ			
合計			71	177,500

<sup>1</sup>時給2,500円で算出

表5 圃場面積によるサイレージ生産費

圃場面積 (ha)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
単作										
作付面積 (ha)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
生産量 (t)	50	100	150	200	250	300	350	400	450	500
生産資材費 <sup>1</sup> (千円)	257	513	770	1,027	1,283	1,540	1,796	2,053	2,310	2,566
労働費 <sup>2</sup> (千円)	178	355	533	710	888	1,065	1,243	1,420	1,598	1,775
機械費 <sup>3</sup> (千円)	2,523	2,523	2,523	2,523	2,523	2,523	2,523	2,523	2,523	2,523
サイレージ生産費 (円/kg)	59.1	33.9	25.5	21.3	18.8	17.1	15.9	15.0	14.3	13.7
TDN生産費 <sup>4</sup> (円/kg)	321.5	184.3	138.6	115.8	102.0	92.9	86.4	81.5	77.7	74.6
二期作										
作付面積 (ha)	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
生産量 (t)	90	180	270	360	450	540	630	720	810	900
生産資材費 <sup>1</sup> (千円)	493	986	1,479	1,973	2,466	2,959	3,452	3,945	4,438	4,931
労働費 (千円)	283	565	848	1,130	1,413	1,695	1,978	2,260	2,543	2,825
機械費 <sup>2</sup> (千円)	2,866	2,866	2,866	2,866	2,866	2,866	2,866	2,866	2,866	2,866
サイレージ生産費 (円/kg)	40.5	24.5	19.2	16.6	15.0	13.9	13.2	12.6	12.2	11.8
TDN生産費 <sup>3</sup> (円/kg)	219.9	133.4	104.5	90.1	81.5	75.7	71.6	68.5	66.1	64.1

<sup>1</sup>種子, 肥料, 農薬, 燃料および消耗品費の合計

<sup>2</sup>機械の減価償却費および修繕費

<sup>3</sup>サイレージ中のTDN含有量は18.4%とした

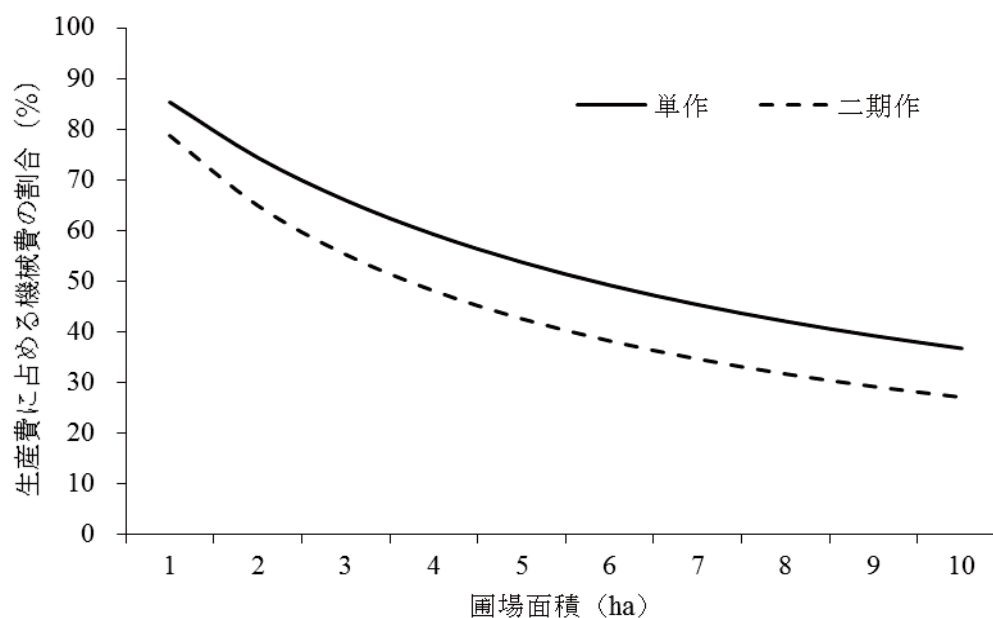


図1 トウモロコシサイレージ生産費に占める機械費の割合

表6 飼料給与設計<sup>1</sup>および生産費の損益分岐点

種 類	単価 (円/kg)	給与量 (kg)		
トウモロコシサイレージ	-	10	20	
配合飼料 (18-74)	70	13	11	10
チモシー乾草	57	7	7	3
スーダングラス乾草	42	4	2	2
アルファルファ乾草	50	1	2	3
ビートパルプ	47	1	1	1
粗濃比		46 : 54	54 : 46	56 : 44
乾物給与量 (kg)		22.4	22.5	22.4
CP充足率 (%)		111	109	108
TDN充足率 (%)		105	105	103
購入飼料費	円/頭・日	1,574	1,400	1,152
トウモロコシサイレージ生産費の損益分岐点 (円/kg)			17.4	21.1

<sup>1</sup>体重600kg, 日産乳量30kgの条件で設計

表7 サイレージ給与量による経営圃場面積の損益分岐点

サイレージ給与量 <sup>1</sup>	圃場面積 (ha)	
	単作	二期作
20kg	4.1	2.6
10kg	5.8	3.7

<sup>1</sup>1日1頭あたりの給与量

## 考 察

酪農経営における、搾乳牛1頭あたりに占める飼料費の割合は、全国平均では47.9%であるが、北海道では45.1%、都府県では55.2%、土地生産基盤の少ない都府県では、北海道と比較して経営に占める飼料費の割合が高くなっている（農林水産省大臣官房統計部2016）。

井上ら（2001）は、神奈川県におけるトウモロコシサイレージの生産費と収益性について調査し、生産した自給飼料は購入飼料より安価であったと評価している。引地ら（2009）は、細断型ロールベアラ導入モデルでは、生産費に対する機械償却費の割合を減少させるため、共同作業による初期費用の抑制や作付面積の拡大について検討している。

トウモロコシサイレージ生産に必要な機械の減価償却費および修繕費等の機械費は、生産費の中で大きな割合を占めるが、作付面積の拡大や単収の向上による生産量の増加により、その割合を縮小することができる。本研究における試算では、作付面積の拡大および二期作で単収が向上するこ

とにより、生産費に占める機械費の割合を縮小し、併せてトウモロコシサイレージの給与量を増やすことにより、生産費の損益分岐点が高くなる可能性についても示した。

神奈川県畜産課が2014年に実施したアンケートでは、回答のあった酪農家のうち、自給飼料の生産を行なっているのは55%で、うち自給飼料の生産をしている65%の酪農家でトウモロコシの作付けをしていた（未公表）。神奈川県における酪農経営では、圃場面積を増やして作付面積を拡大することは容易ではないが、トウモロコシ単作から二期作への変更については、新たに機械装備の導入を必要とせず、また稼働率も向上することから、比較的容易に実施できる作付面積の拡大方法であると考えられる。また、トウモロコシサイレージの生産量の増加も見込まれ、生産費の低下と給与量の増加による損益分岐点が高くなり、飼料費の節減の有効な手段であると考えられる。

自給飼料の生産費について、井上ら（2001）は、神奈川県内の酪農家における、トウモロコシサイレージの生産費と収益性について検討し、トウモ



ロコシサイレージの生産費を購入乾草価格から評価額を比較し、乾草を購入するより自給飼料を生産した方が有利であるとしている。また、引地ら(2009)は、細断型ロールペーラ導入モデルでは、生産量から試算した TDN 生産費を購入飼料価格と比較して、導入モデルを示している。

本研究では、サイレージの評価について、搾乳牛に給与した場合の飼料費の価格差から評価した。トウモロコシサイレージを搾乳牛1頭あたり20kg および10kg 給与した場合、トウモロコシサイレージ1kg の損益分岐点の生産費は21.1円および17.4円であり、この場合のTDN1kgあたりの生産費は114.1円および94.6円であった。本研究で比較した、トウモロコシサイレージを給与しない場合の飼料のTDN1kgあたりの価格は98.6円であった。TDN生産費を比較すると、トウモロコシサイレージを20kg 給与した場合の損益分岐点では、TDN生産費は購入飼料より高くなるが、給与する飼料費は低くなる。自給飼料の評価においては、TDN生産費に限らず、家畜に給与することを念頭に評価することも重要であると考えられた。

トウモロコシサイレージ等の自給飼料の栄養価は、草種、収穫期、気象条件、収穫・調製方法等により変動する。本研究では、トウモロコシサイレージの給与量を増加することで、飼料費を低減できることを示した。しかし、給与量の増加することは、自給飼料の変動する栄養価の影響をより大きく受けるため、栄養価を把握して飼料給与設計をすることが重要である。自給飼料を高度に活用するためには、粗飼料分析サービス(フォーレージテスト)を活用して飼料給与設計を行うことが重要である。

#### 引用文献

引地宏二、先崎史人、折原健太郎、平井久美子、齋藤直美、倉田直亮、益田富男、江川壽夫. 2009. 県内の実態に即した細断型ロールペーラ導入モデルの検討. 神奈川県畜産技術センター研究報告2, 24-29.

井上 登, 江川壽夫, 根本勝男. 2001. 県内自給粗飼料生産の経済性試験. 神奈川県畜産研究所研究報告88, 53-56.

農林水産省大臣官房統計部. 2016. 農業経営統計調査平成27年度牛乳生産費.

[http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/noukei/seisanhi\\_tikusan/attach/pdf/index-2.pdf](http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/noukei/seisanhi_tikusan/attach/pdf/index-2.pdf) [2017年2月1日参照]

農林水産省関東農政局統計部企画課. 2016. 平成26~27年神奈川県農林水産統計年報.

[http://www.maff.go.jp/kanto/to\\_jyo/2016data/kanagawa\\_h26-27.html#05](http://www.maff.go.jp/kanto/to_jyo/2016data/kanagawa_h26-27.html#05) [2017年2月1日参照]

折原健太郎. 2010. 関東南部におけるトウモロコシ二期作の可能性. DAIRYMAN 60, 36-37.

折原健太郎, 秋山清, 水宅清二, 野村研. 2012. 関東南部におけるトウモロコシ二期作に適した品種の組み合わせ. 神奈川県畜産技術センター, <http://www.pref.kanagawa.jp/uploaded/attachment/550010.pdf> [2017年2月1日参照]

折原健太郎, 秋山清, 水宅清二. 2012a. 関東南部におけるトウモロコシ二期作の土地生産性. 神奈川県畜産技術センター, <http://www.pref.kanagawa.jp/uploaded/attachment/550012.pdf> [2017年2月1日参照]

折原健太郎, 秋山清, 水宅清二. 2012b. 関東南部におけるトウモロコシ二期作の生産費. 神奈川県畜産技術センター, <http://www.pref.kanagawa.jp/uploaded/attachment/550013.pdf> [2017年2月1日参照]

折原健太郎, 秋山清, 水宅清二. 2012c. 関東南部におけるトウモロコシ二期作の施肥方法. 神奈川県畜産技術センター, <http://www.pref.kanagawa.jp/uploaded/attachment/550029.pdf> [2017年2月1日参照]

折原健太郎, 秋山清, 水宅清二. 2012d. 関東南部におけるトウモロコシ二期作の雑草防除方法. 神奈川県畜産技術センター, <http://www.pref.kanagawa.jp/uploaded/attachment/550030.pdf> [2017年2月1日参照]

折原健太郎. 2014. トウモロコシ不耕起栽培のメリットを生かす. 3 開発機を使った栽培事例—DAIRYMAN 64, 42-43.

折原健太郎. 2017. 関東南部におけるサイレージ用トウモロコシ (*Zea mays* L.) 二期作の品種の組み合わせ. 日本草地学会誌. 181-188.

【学位論文要旨】

## リン結晶化法による豚舎汚水からのリン回収システムの開発

著者名 川村 英輔  
学位授与大学 東北大学  
取得学位 博士（工学）  
学位授与年月日 平成 25 年 3 月 27 日

### 学位論文内容の要旨

リンは、リン酸含有率 30% ( $P_2O_5$  P 換算約 13%) 以上の優良なリン鉱床は国内にはなく、我が国はリン原料の全量を輸入に頼っている状況にある。また、優良なリン鉱石については、可採埋蔵量が限られており採掘可能年数は 130 年程度とされ世界的に見ても枯渇資源である。一方で世界的な人口の増加や食生活の変化により、穀物等の需要が増大したことからリンを含むその他の肥料原料の需要は年々増大する傾向にある。また、バイオ燃料向けの穀物増産などの要因も重なり、リン肥料の原料となるリン鉱石は市場で高騰を続けている。一方、国内の生物系廃棄物は 2 億 8 千万 t 発生し、リンが 62 万 t 含まれている。中でも最も多量に発生しているのは、家畜排せつ物で全体の 43% を占めており、その中には 27.4 万 t のリンが含まれている。家畜別に見ると豚が最も多く全体の 3 割を占めている。豚のふんは 13.3g/日、尿は 1.4kg/日のリンを含有しており、ふん中にリンが多く含有していることが分かる。豚を飼養する場合、上記のふん尿の重量比から尿量に起因して、また畜舎の衛生管理を図るため豚舎洗浄水が必要となり多量の汚水が発生するため污水处理施設が必要となる。豚舎汚水は、高濃度のリンを含んでいることが知られており、閉鎖性水域の富栄養化の原因物質であるリン排出量の削減は水質汚濁防止の観点からも特に重要となる。

そこで本研究は、豚舎汚水からのリン回収を目的としてシステム開発を行ったものであり、全編 7 章よりなる。

第 1 章「総論」では、本研究の背景、意義、目的について述べた。

第 2 章「リン結晶化反応を用いたリン回収技術に関する現状と課題」では、汚水からのリン回収装置が実用化している下水道分野のリン回収技術について整理し、リン結晶化反応の原理や反応条件に関し既往の研究をまとめた。次に諸外国で行われている畜舎汚水の液肥化処理及びメタン発酵後の消化液中の窒素・リンの低減、リン回収技術として利用されている MAP 法の既往研究を整理す



るとともに、豚舎汚水からのリン回収で検討されている付着部材を利用した付着回収法を実用化するにあたり、解決すべき課題について明らかにした。

過去の研究の不十分な点を考慮し、ふん尿分離豚舎汚水へ適用可能な MAP 回収装置を開発し、豚舎汚水へのリン結晶化技術の導入に向けて検討すべき課題を以下に整理した。

- (1) 家畜用浄化槽の処理対象であるふん尿分離豚舎汚水の性状に関する季節変化を考慮した情報が必要である。
- (2) 反応槽のみを持つ簡易な構造の塩ビ管型 MAP 回収装置の開発のために、付着回収法によるリン除去率や回収量等を検討するとともに、曝気強度を大きくすることで処理量の増加を検討することが必要である。
- (3) 沈殿構造を持つ飼料タンク型 MAP 回収装置を開発するために、付着部材での付着回収や槽下部に沈殿した沈殿 MAP を回収する沈殿回収法を検討し、付着回収 MAP 量の向上を図ることが必要である。
- (4) (3) の検討の際、SS や重金属を低減した脱水ろ液を用いることでリン除去率の向上と沈殿 MAP への重金属混入軽減を検討することが必要である。
- (5) 開発した塩ビ管型と飼料タンク型 MAP 回収装置の導入・運転・回収 MAP の肥料的対価等を算出し、リン結晶化法以外の手法とのコストを比較して評価を行う必要がある。

第 3 章「豚舎汚水中の結晶化成分の季節的変動の研究」では、家畜用浄化槽の設置条件であるふん尿分離型豚舎の豚舎汚水性状や汚水量等を調査し、消化脱離液とふん尿分離豚舎汚水との比較からリン回収の可能性を検討するとともに、第 4 章で試作する反応槽のみを持つ簡易な構造の塩ビ管型 MAP 回収装置の設計に際して必要なデータを収集した。ふん尿分離型豚舎汚水中の結晶成分の季節変動について以下のことが明らかとなった。

ふん尿分離型豚舎汚水の水溶性  $\text{PO}_4\text{-P}$  は、下水処理場の脱水ろ液や豚ふん尿のスラリーなどと比べ低濃度であるが、pH、水溶性  $\text{PO}_4\text{-P}$ 、 $\text{NH}_4\text{-N}$  及び Mg 濃度から算出した溶解度積は、津野らの提唱した MAP 溶解度積  $7.8 \times 10^{-15} \text{ (mol/l)}^4$  を上回ることから、リン結晶化法の適用により結晶状のリンが生成可能であることが明らかとなった。また、新たにふん尿分離豚舎汚水の MAP 溶解度積を算出したところ、 $2.97 \times 10^{-14} \text{ (mol/l)}^4$  であることが明らかとなった。

ふん尿分離型豚舎汚水中の水溶性  $\text{PO}_4\text{-P}$  濃度、水溶性 Mg 濃度や水溶性  $\text{Mg/PO}_4\text{-P}$  比が季節変動することが明らかとなり、豚舎内での尿量及びこぼし水の量が増加し汚水へのふんの混入率が高まる夏季は、水溶性  $\text{Mg/PO}_4\text{-P}$  比が 1 以下となり、豚舎内での尿量やこぼし水の量が減少しふんの混入率が少なくなる冬季は、水溶性  $\text{Mg/PO}_4\text{-P}$  比が 1 以上となることが明らかとなった。

水温が低い冬季には、汚水へのふんの混入率が低いため、pH は尿に依存してアルカリ性を呈す。アルカリ性の下では、汚水中のアンモニアは遊離するが、水温が低いため、液相から気相への移行は少なく、pH が高く保持される。一方夏季は、豚舎内での水使用量が増加することによる希釈と水温の上昇に伴い遊離アンモニアが液相から気相へと揮散することにより、汚水中の遊離アンモニア濃度が低下し、pH の低下が進行することが明らかとなった。

第4章「塩ビ管型 MAP 回収装置による豚舎汚水中のリン回収技術の研究」では、水溶性リン酸態リン濃度が 50mg/l 程度と低濃度なふん尿分離豚舎汚水を対象に、豚舎汚水からのリン回収を試みるとともに、曝気による pH 調整が可能で養豚農家が簡便に扱える塩ビ管で簡易な構造の塩ビ管型 MAP 回収装置を試作し、リンの結晶化や MAP の回収方法を合わせて検討した。また神奈川県内の養豚場の回分式活性汚泥浄化施設に適用し、ふん尿分離豚舎汚水中の水溶性リン酸態リンを結晶状 MAP に誘導して MAP の回収を試みた。塩ビ管型 MAP 回収装置による豚舎汚水からのリン回収試験において以下のような結論を得た。

本研究で開発した塩ビ管型 MAP 回収装置は、これまでのリン回収装置と比べ、容積あたりの処理能力を 4 倍とすることが可能であった。これは、汚水投入量に対する必要送風量 (30.7l 空気/m<sup>3</sup> 汚水) を明らかにしたことで、反応槽毎の条件の決定が可能であり、装置運転条件の最適化による処理量の増大が図られたためである。

塩ビ管型 MAP 回収装置によって汚水量 1 m<sup>3</sup> から 41.0g/m<sup>3</sup> の MAP 回収可能であり、反応前汚水の水溶性 PO<sub>4</sub>-P 濃度が高いほど汚水量 1 m<sup>3</sup> あたりの回収 MAP 量が増加する傾向が明らかとなった。

第5章「飼料タンク型 MAP 回収装置による豚舎汚水中のリン回収技術の研究」では、第4章で用いた簡易型 MAP 回収装置の問題点を抽出し、その改善を図るとともに新たな MAP 回収方法として沈殿 MAP 回収法を検討することとした。豚舎汚水を脱水処理した脱水ろ液を処理対象とし、沈殿 MAP を沈殿回収可能な構造を持つ飼料タンク型 MAP 回収装置を試作し、本装置の MAP 回収能力等の処理能力を把握した。飼料タンク型 MAP 回収装置による豚舎汚水からのリン回収試験から以下のような結論を得た。

豚舎汚水の凝集・脱水処理は、凝集剤添加による pH 上昇により、MAP 溶解度積を上回ることから、水溶性 PO<sub>4</sub>-P 濃度の約 15% が結晶化した。一方、洗浄水を用いる汚水脱水機は、凝集剤による結晶化と洗浄水による希釈により、水溶性 PO<sub>4</sub>-P 濃度が約 60% 減少した。これにより、MAP 回収のための SS 及び銅・亜鉛除去には、洗浄水を用いない汚水脱水機が適していることが明らかとなった。

豚舎汚水の凝集・脱水処理が、結晶化に与える効果については、付着部材への SS 付着量の減少、付着部材表面積での結晶成長した MAP の SS による剥離・槽外流出及び SS 表面での結晶成長・槽外流出を抑制することが推論された。

豚舎汚水の凝集・脱水処理による溶解度積の上昇や HRT を長くすること pH 上昇ポイントが高まり、リン結晶化率が向上した。また、塩ビ管型及び飼料タンク型 MAP 回収装置に浸漬した付着部材へのリン負荷量が  $2\text{kg}/\text{m}^2$  と同一の時、単位面積当たりの MAP 回収量は、 $0.9\text{kg}/\text{m}^2$  及び  $3.0\text{kg}/\text{m}^2$  となり、脱水ろ液を用いた飼料タンク型で回収効率が約 3 倍に向上した。

今回新たに検討した沈殿法により回収された沈殿 MAP は、リンを含む化成肥料と同様に金属含有量が少なく、そのままの形態で農業利用できることが明らかとなった。また、付着回収と沈殿回収を組み合わせた飼料タンク型 MAP 回収装置では、リン純度 95~98% の沈殿 MAP が回収可能であり、付着回収 MAP と同品質の MAP が回収可能であった。

飼料タンク型 MAP 回収装置は、付着部材面積を従来に比べ 2.2 倍に拡大したことで、回収 MAP 量が従来法に比べ向上し、結晶化した水溶性  $\text{PO}_4\text{-P}$  量あたりの回収リン量（リン回収効率）は、12% から 33% へと大幅に向上した。これは、MAP が結晶成長する核となる付着部材の表面積が拡大することで、これまで部材表面で結晶成長出来なかった MAP の量が少なくなることや部材表面で結晶成長できない微細 MAP 量が減少し、回収ロスが減少したことが推察された。

第 6 章「豚舎汚水からのリン回収技術のコスト評価」では、第 4 章及び第 5 章で用いた簡易型 MAP 回収装置及び飼料タンク型 MAP 回収装置の導入及び運転コストを算出し、豚舎汚水から生産した MAP の生産コストと化成肥料の価格を比較検討し、化成肥料の代替えとして MAP 生産するためのコスト評価を行った。処理水  $1\text{m}^3$  あたりの処理費用は、吸着式リン除去回収装置、塩ビ管型及び飼料タンク型の順となり、 $45\text{円}/\text{m}^3$ 、 $67\text{円}/\text{m}^3$  及び  $144\text{円}/\text{m}^3$  となったが、処理対象リン  $1\text{kg}$  あたりの処理費用は、塩ビ管型が最も安く  $1,100\text{円}/\text{kgP}$  となった。このことから、リン除去の観点からすると、吸着式リン除去回収装置に対し塩ビ管型 MAP 回収装置の方が、処理経費が抑えられることが明らかとなった。化成肥料成分値（パリティ方式）により、 $20\text{kg}$  当たりの化成肥料原価（ $\text{円}/\text{kg}$ ）及び製造諸経費を加算した回収 MAP の販売価格を算出したところ、回収 MAP の原料価は、 $2,051\text{円}/20\text{kg}$  となり、製造諸経費（機能）を加えた想定市場価格は、 $2,718\text{円}/20\text{kg}$  となった。塩ビ管型及び飼料タンク型 MAP 回収装置の MAP  $1\text{kg}$  あたりの回収コストを  $135\text{円}/\text{kg}$  を目標に削減するには、曝気効率や Mg 添加率の最適化による使用電力量及び使用 Mg 量の削減を図るとともに回収 MAP 量の向上を図る必要がある。

第 7 章「総括と展望」では、本研究を通して得られた成果を総括した。

本研究成果は、今後多くの養豚場へのリン回収装置導入促進に寄与し、持続可能な農業の構築および豚舎汚水から生産した国内産リンの供給により持続可能な資源循環型社会を築く礎となるものである。

## 生殖工学技術を利用した子ウシの性別制御に関する研究

### Studies on Producing Calves of Desired Sex Using Reproduction Engineering Technologies

著者名 秋山 清  
学位授与大学 麻布大学  
取得学位 博士（学術）  
学位授与年月日 平成 28 年 1 月 25 日

#### 学位論文内容の要旨

性判別胚を用いて計画的な子ウシ生産を農家段階で実用化するためには、性判別胚を超低温保存し、受胎牛の移植適期に合わせて融解し移植できる技術体系の確立が不可欠である。しかし、性判別胚はバイオプシーにより胚の一部の細胞が切除されるとともに透明帯も除去されるため、緩慢凍結により保存された性判別胚において新鮮胚と同等の受胎性を確認した報告がある一方で、インタクト（非バイオプシー）胚と比べて耐凍性や受胎性が低下することも報告されている。しかし、性判別胚をガラス化保存した場合には新鮮胚に近い受胎率の得られることが報告されている。

ガラス化保存法は、細胞外液に氷晶を形成させないため、緩慢凍結法に比べて高濃度の耐凍剤を含む溶液が用いられており、加温後は早期に耐凍剤を希釈することが、耐凍剤の化学的毒性を抑制するために必要とされている。このためガラス化保存胚をダイレクトトランスファー法やワンステップストロー法のように加温後直ちに受胎牛に移植した報告は少ない。

一方、X精子またはY精子を90%以上の確率で含むウシ性選別精液が市販されているが、この性選別精液はストロー1本あたりの充填精子数が通常精液に比べて少ないことなどから、人工授精後の受胎率や多排卵処理後に採取した胚の移植可能な胚の生産率の改善が望まれている。また、ウシにおける生体内卵吸引法（以下、OPU）由来卵子の体外受精技術は、超音波画像診断装置を用いて生体内卵巣から採取した卵を体外受精して胚を生産する技術であり、これまでの胚生産の中心であった子宮灌流による体内受精由来胚の採取に代わる、あるいはこれを補完する胚生産技術として開発されてきた。この体内成熟卵は、体外受精後の発生能が体外成熟卵に比べて高いが、体内成熟卵と性選別精液を利用した性判別胚の生産に関する報告や生産した性判別胚の受胎性に関する報告は少なく、普及性や実用性に関する報告はほとんどない。

本論文では、ウシバイオプシー胚および性判別胚の超低温保存後の生存性と受胎性を明らかにし、農場における子ウシの雌雄産み分け技術の確立を目的として、ウシ胚の緩慢凍結およびガラス化保存の方法や融解・加温法の影響について調べた。また、OPUにより採取した体内成熟卵と性選別精液の体外受精による性判別胚の生産について、胚の生産効率と性判別胚を用いた子ウシ生産システムを検討した。

第2章では、ウシバイオプシー胚の緩慢凍結方法が胚の生存性と受胎性に及ぼす影響を調べた。過剰排卵処理を施した供胚牛から人工授精後7～8日目に採取した胚はマイクロブレードでバイオプシーした後に緩慢凍結保存した。緩慢凍結方法は10%グリセリンおよび20%子ウシ血清（以下、CS）添加修正PBSを凍結溶液として融解後に段階的に耐凍剤を希釈除去し胚の生存性を判定した後に受胎牛に移植した10G-SW、融解後にストロー内で12.5%シュークロースおよび20%CS添加修正PBSと混合して一段階で耐凍剤を希釈除去し胚の生存性を判定した後に受胎牛に移植した10G-ISD、10%エチレングリコールおよび20%CS添加修正PBSを凍結溶液として融解後に耐凍剤の除去操作を行わず直ちに受胎牛に移植した10E-DR、10%エチレングリコール0.1mol/Lシュークロースおよび20%CS添加修正PBSを凍結溶液として融解後に耐凍剤の除去操作を行わず直ちに受胎牛に移植した10E1S-DR、10%グリセリン0.25mol/Lシュークロースおよび20%CS添加修正PBSを凍結溶液として融解後に耐凍剤の除去操作を行わず直ちに受胎牛に移植した10G25S-DR、5%グリセリン0.1mol/Lシュークロースおよび20%CS添加修正PBSを凍結溶液として融解後に耐凍剤の除去操作を行わず直ちに受胎牛に移植した5G1S-DRの6手法を用いてインタクト胚とバイオプシー胚の保存後の生存性と受胎性を調べた。その結果、インタクト胚の受胎率は凍結法との間には有意差は認められなかったが、バイオプシー胚の受胎率は10E1S-DRが新鮮胚、10G-SWおよび10G25Sに比べて有意に受胎率が低かった。また、いずれの方法においてもバイオプシー胚の受胎率はインタクト胚に比べて低い成績となっており、バイオプシー胚に適した緩慢凍結法について更なる検討が必要と推察された。また、緩慢凍結したインタクト胚を移植により双子分娩が確認された事例から、ウシにおける自然発生的な一卵性双子の発生様式を記載して考察した。

第3章では、ガラス化保存したウシ胚をストロー内希釈後に直接移植する方法を農家段階で実用化するために、加温温度、加温後の経過時間、希釈液の組成が加温後の胚の生存性に及ぼす影響を検討した。媒精後7～8日目に発生した胚盤胞をガラス化溶液(VSED: 25% EG + 25% DMSO)で平衡した後にストロー内でガラス化保存し、加温後に胚の生存性と発育性を調べた。加温温度は20℃区と30℃区において加温後の胚の生存率および透明帯脱出率に有意な差は認められなかった。また、加温後の保持時間0分に対して5分以降は、ガラス化保存胚の生存率が有意に低下し、0分および



5 分に対して 40 分でガラス化保存胚の透明帯脱出率が有意に低下した。さらに、希釈液組成により加温後の胚の生存率および透明帯脱出率に差は認められなかった。

これらのことから、ガラス化保存したウシ胚において、加温温度の違いや希釈液の組成により生存性の低下は認められなかったが、加温から移植終了までの時間が延長した場合、加温胚の生存性が低下することが示された。

第 4 章では、ガラス化保存したウシバイオプシー胚を、農場内で加温し直ちに受胚牛に移植するために、耐凍剤の希釈方法が受胎性に及ぼす影響を調べた。人工授精後 7 日目の供胚牛から採取し、性別判定のためにバイオプシーを施した胚を VSED 液で平衡した後、ストロー内でガラス化保存した。加温後、耐凍剤をストロー内で希釈しストローから取り出し胚の生存性を確認して移植した ISD 区の受胎率は 57.9%、耐凍剤をストロー内で希釈後に胚をストローから取り出すことなく直ちに受胚牛に移植した DIR 区の受胎率は 62.5%であり、いずれもガラス化保存していない NV 区 (56.3%) と有意な差のない受胎率が得られた。ストロー内希釈後のストロー内のエチレングリコール濃度は 6.9~7.7%、DMSO 濃度は 2.8~3.3%であった。これらのことから、ガラス化保存したウシバイオプシー胚は、農場内での加温操作を行い直ちに受胚牛に移植することが可能であり、実用的な受胎率の得られることが示唆された。

第 5 章では、ガラス化保存したウシ性判別胚を加温後直ちに受胚牛に移植するために、耐凍剤のストロー内希釈が移植後の受胎性と子ウシ生産性に及ぼす影響を調べた。過剰排卵処理を施した供胚牛から人工授精後 7~8 日目に採取した胚をマイクロブレードでバイオプシーして雄特異的 DNA 増幅の有無により性別を判定した。性判別胚は VSED 液で平衡し、希釈液と空気層を隔てて 0.25-mL ストロー内に充填し、液体窒素中に投入した。加温後、ストロー内でガラス化液と希釈液を混合し 3 分間保持した。評価区はストロー内希釈した胚の生存性を判定した後に受胚牛に移植し、非評価区ではストロー内希釈後の胚をストローから取り出すことなく直ちに受胚牛に移植した。評価区および非評価区の移植後の受胎率は 38.7%および 34.8%であり、両区の間有意差は認められなかった。しかし、評価区においてガラス化保存前の品質の劣る胚の生存性は品質の高い胚に比べて有意ではないが低い傾向であった ( $P=0.087$ )。受胎した受胚牛の流産率は両区の間有意な差は認められなかった (13.9%、12.5%)。

これらのことから、耐凍剤のストロー内希釈はガラス化保存したウシ性判別胚を加温後直ちに受胚牛に移植するために有効な方法であることが確認された。

第 6 章では、ホルスタイン種泌乳牛の卵巢より OPU により採取した卵と性選別精液を用いて体外受精し、性判別胚の生産効率と性判別胚の移植による子ウシ生産状況を調べた。供試牛に多排卵処理 (SOV 区) または卵胞発育同調処理 (FGT 区) を施した後、直径 5 mm 以上の卵胞から卵を採取

し、ホルスタイン種雄牛の性選別精液を用いて媒精し、胚盤胞期胚以降への発生能を調べた。また、媒精後 7 および 8 日目の胚盤胞期胚および脱出中胚盤胞期胚を受胎牛に移植した。SOV 区および FGT 区における採取卵数に有意な差は認められなかった。SOV 区では採取卵のうち 62.1%が成熟卵であったが、FGT 区の採取卵は全て未成熟卵であった。媒精後 7~9 日の胚盤胞期胚率は試験区間に有意な差は認められなかったが、供卵牛 1 頭当たりの胚盤胞期胚数は SOV 区が FGT 区に比べて有意に多かった ( $P < 0.05$ )。また、SOV 区および FGT 区で生産した性判別胚の移植後の受胎率、在胎日数および産子の生時体重に有意な差は認められなかった。このことから、ホルスタイン種泌乳牛から SOV 処理後に OPU により採取した卵と性選別精液を体外受精して性判別胚を生産する方法は、後継牛の計画的な生産に利用可能であることが示された。

本研究の結果より、ウシバイオプシー胚および性判別胚の超低温保存としては緩慢凍結法に比べてガラス化保存法が優れており、ウシ性判別ガラス化保存胚は、新鮮胚移植と同等の実用的な受胎率が得られることが明らかとなった。また、ガラス化保存胚のストロー内希釈は超低温保存した性判別胚を農場で加温し、一般的な胚移植と同様の簡単な操作により受胎牛への移植が可能であることを示した。さらに、ストロー内希釈後の胚の生存性および受胎性に影響を及ぼす要因となる胚の品質や加温後から移植までの時間を確認したことにより、本技術の野外普及を進めるにあたっての注意点や技術普及のための課題を提示した。また、SOV 処理後に OPU により採取した体内成熟卵と性選別精液との体外受精による新しい性判別胚の生産システムが後継牛生産に有効な手法であることを示した。

このように本研究で実施したウシバイオプシー胚および性判別胚の超低温保存方法および OPU 由来の成熟卵と性選別精液を利用した性判別胚の体外生産に関する研究成果は、酪農経営ならびに肉牛生産における計画的な後継牛生産の実現と今後の家畜繁殖技術の発展に寄与するものと考えられる。



## 電気化学的呼吸量測定による豚胚の客観的評価と 胚移植による種豚生産システムの開発に関する研究

著者名 坂上 信忠  
学位授与大学 岡山大学  
取得学位 博士（農学）  
学位授与年月日 平成 28 年 9 月 30 日

### 学位論文内容の要旨

現在、肉豚の生産農場では、優れた能力の種豚を外部から生体で導入し、種雄豚と種雌豚を交配し生まれた子豚を肥育することで豚肉生産を行っている。しかし、生体での種豚の導入は疾病伝搬や馴致失敗などのリスクを伴うことから、胚移植による種豚導入が可能になれば、そのリスクを軽減することが可能と考えられる。一方で、豚は子宮角が長く胚採取は外科的な手法が必要であるため、外科手術が可能な限定された施設でしか胚採取を行うことができず、生産現場で豚胚移植を行うためには、採取した胚を農場に輸送して受胚豚に移植するか、一度超低温保存した後に加温して移植する必要がある。

そこでこれらの課題を解決するために、胚の品質を客観的に評価する方法の検討を行い、さらに、疾病伝搬リスクの低い Micro Volume Air Cooling (MVAC) 法によるガラス化保存法を用いて超低温保存胚の移植手法を確立する一方で、生産現場へ胚を輸送するための輸送方法を検討し、これらをもとに種豚を効率的に生産するシステムを検討した。

はじめに、豚体内発育胚の呼吸量測定による客観的評価について検討した。人工授精後 6 日目の胚 (D6BL) の呼吸量 ( $\times 10^{-14} \text{ mol s}^{-1}$ ) を測定後、培養し透明帯からの脱出を確認したところ、脱出胚の培養前の呼吸量  $1.05 \pm 0.09$  (平均値  $\pm$  標準誤差) は、非脱出胚の  $0.77 \pm 0.05$  と比較して有意に高かった。次に、血清等の動物由来成分を含まないガラス化保存液と、液体窒素に直接接しない手法で超低温保存する MVAC 法を用いて保存した胚の、電気化学的呼吸量測定による評価について検討を行った。D6BL を MVAC 法でガラス化保存した。加温後の胚の呼吸量を測定し、培養後の発育性を調査したところ、生存率は 85%、透明帯脱出率は 45%であった。48 時間培養後に脱出した胚の加温直後の呼吸量は  $0.88 \pm 0.06$  で、非脱出胚の  $0.53 \pm 0.04$  より有意に高かった。

さらに、化学的合成培地と試作した輸送器で輸送した場合の発育性を調査した。ストロー内に胚を密封した密封区と、炭酸ガス濃度 5%、温度 38℃を維持可能な試作輸送器で輸送したガス濃度調整区を、輸送せず低酸素培養器で培養した非輸送区と比較した。密封区とガス濃度調整区の胚は宅配便で約 22 時間輸送した。その結果、ガス濃度調整区では、非輸送区と同等の生存率（輸送区 100%、非輸送区 97.4%）、透明帯脱出率（輸送区 57.9%、非輸送区 47.5%）が確認された。

最後に、呼吸量を利用した種豚生産システムを検討した。D5 胚を、経産豚 11 頭に非外科的に移植したところ、平均呼吸量が 0.59 より低い胚を移植した 4 頭の受胚豚では受胎が確認されなかったが、呼吸量が 0.59 より高い胚を移植した 7 頭のうち 3 頭が受胎し 20 頭の子豚が得られた。次に MVAC 法でガラス化保存した胚の加温後の呼吸量を測定したところ、平均呼吸量は  $0.96 \pm 0.04$  でこれを 2 頭に外科的に移植したところ、2 頭とも受胎した。最後に、新鮮胚を輸送後に非外科的に移植したところ、受胎例は得られなかったが、ガラス化加温胚を輸送し 3 頭の受胚豚に移植したところ、平均呼吸量が高い胚を移植した受胚豚 1 頭で受胎が確認された。以上の結果から、電気化学的呼吸量測定による胚の品質評価法と、ガラス化保存技術や輸送技術を組み合わせたシステムで受胎例が得られ、有効に活用できる種豚生産システムを確立した。

【場外掲載論文】

Sakagami N, Nishino O, Adachi S, Umeki H, Uchiyama H, Ichikawa K, Takeshita K, Kaneko E, Akiyama K, Kobayashi S and Tamada H, 2014. Improvement of preimplantation development of in vitro-fertilized bovine zygotes by glucose supplementation to a chemically defined medium *J. Vet. Med. Sci.* 76, 1403-1405

Sakagami N, Nishida K, Misumi K, Hirayama Y, Yamashita Y, Hoshi H, Misawa H, Akiyama K, Suzuki C and Yoshioka K, 2014. The Relationships between oxygen consumption rate, viability and subsequent development of in vivo-derived pig embryos. *Theriogenology* 83, 14-20

Sakagami N, Nishida K, Misumi K, Hirayama Y, Hoshi T, Fujita A, Nakano S, Akiyama K, Suzuki C and Yoshioka K, 2015. Transportation of preimplantation porcine embryos without cryopreservation using a novel embryo carrier, *J. Mamm. Ova Res.* 32, 121-127

折原健太郎, 本谷 直, 横澤将美, 菅野 勉, 2015. ソルガム類を活用したコントラクター等に適した省力的多収飼料生産技術, 日草誌 61, 194-201

菅野 勉, 森田聡一郎, 浅井貴之, 横澤将美, 平尾賢一, 本谷 直, 折原健太郎, 西村和志, 千田雅之, 2015. ソルガム類を活用した多収作物体系の関東甲信地域における導入適地, 日草誌 61, 202-207

川村英輔, 高田 陽, 高柳典弘, 2015. 2養豚場の「消費電力の可視化」と消費電力の負荷平準化, 日豚会誌 52, 50-63

Uetake K, Akiyama K, Sakagami N and Tanaka T, 2014. Plasma IgG and cortisol concentrations of newborn calves derived in pens with two different amounts of sawdust: A case comparison, *Animal Behavior and Management* 51, 1-4

Kawai K, Korematsu K, Akiyama K, Okita M, Yoshimura Y and Isobe N, 2015. Dynamic of lingual antimicrobial peptide, lactoferrin concentrations and lactoperoxidase activity in the milk of cows treated for clinical mastitis, *Anim. Sci. J.* 86, 153-158

Hiraizumi S, Nishinomiya H, Oikawa T, Sakagami N, Sano F, Nishino O, Kurahara T, Nishimoto N, Ishiyama O, Hasegawa Y and Hashiyada Y, 2014. Superovulatory response in Japanese Black cows receiving a single subcutaneous porcine follicle-stimulating hormone treatment or six intramuscular treatments over three days, *Theriogenology* 83, 466-473

Sakagami N, Tsuji H, Hashimura S, Akiyama K and Orihara K, 2016. Effects of providing fatty acid–calcium soap with high oleic acid content on fatty acid composition in Japanese Black steers, *Proceedings of the 17th AAAP Congress*, 1321-1324

秋山 清, 坂上信忠, 中川 浩, 瀬田剛史, 河合愛美, 長井 誠, 林みち子, 的場理子, 稲葉泰志, 松田秀雄, 今井敬, 下司雅也, 2016. 多排卵処理後に採取した卵胞内卵子と性選別精液の体外受精によるウシ性判別胚の生産, *日畜会報* 87, 107-113

川村英輔, 高田 陽, 小島陽一郎, 2016. 熱交換器による密閉型発酵装置の排気からの熱回収, *日豚会誌* 33, 129-136

Sakagami N, Nishida K, Misumi K, Hirayama Y, Yamashita S, Hoshi H, Misawa H, Akiyama K, Suzuki C and Yoshioka K, 2015. The relationship between oxygen consumption rate and viability of in vivo-derived pig embryos vitrified by the micro volume air cooling method, *Anim. Repro. Sci.* 164, 40-46

坂上信忠, 辻 浩之, 橋村慎二, 折原健太郎, 秋山清, 2017. オレイン酸含有量の高い脂肪酸カルシウム給与が黒毛和牛去勢牛の筋間脂肪酸組成に及ぼす効果, *肉牛研報*, 102, 15-20

(発表順 下線 当所職員)

【学会発表】

学会名	発表年月	発表者	演題名
第54回 日本哺乳動物卵子学会	2013年5月	坂上信忠	ヒト血清アルブミンを添加したPBMで輸送したブタ体外発育胚の生存性
第68回 関東畜産学会	2013年11月	秋山清	ウシ性選別精液を利用した過剰排卵処理方法の検討
第100回 日本養豚学会	2014年3月	引地宏二	食のライフスタイルで類型化した消費者の産地の異なる豚肉の購買行動
日本畜産学会 第118回大会	2014年3月	秋山清	性選別精液の体外受精により生産したウシ性判別胚の受胎性
第21回 日本胚移植研究会	2014年9月	秋山清	卵胞液のヒアルロニダーゼ処理がウシ体内成熟卵子の採取に及ぼす影響
2015年度 日本草地学会信州大会	2015年3月	折原健太郎	「ソルガム類を活用した今後の飼料増産の可能性」 コントラクター等に適した省力的飼料生産技術
2015年度 日本草地学会信州大会	2015年3月	折原健太郎	関東南部におけるソルガム新系統「峰風」を利用したトウモロコシ・ソルガム混播栽培
日本畜産学会 第120回大会	2015年9月	秋山清	分娩前後の乳牛におけるルーメン内pHの変化
第64回 北信越畜産学会	2015年11月	秋山清	泌乳中後期牛への活性酵母給与が第一胃内発酵に及ぼす影響
第64回 北信越畜産学会	2015年11月	秋山清	周産期乳牛における潜在性ルーメンアシドーシスに対する活性酵母の給与効果
第31回東日本家畜受精卵 移植技術研究会大会	2016年2月	坂上信忠	ホルスタイン種泌乳牛におけるeCGを用いたFGT-0PUの試み
平成27年度日本獣医師会 獣医学術学会年次大会	2016年2月	秋山清	コーヒー豆粕サイレージ給与が牛乳中体細胞数低減に及ぼす効果
2016年度 日本草地学会	2016年3月	折原健太郎	サイレージ発酵過程で発生するガスの検討 1. イタリアンライグラスサイレージの発酵品質
2016年度 日本草地学会	2016年3月	折原健太郎	サイレージ発酵過程で発生するガスの検討 2. GC-MAS法を用いた揮発性有機化合物の測定
第17回アジア・ 太平洋州畜産学会議	2016年8月	坂上信忠	Effect of providing fatty acid-calcium soap with high oleic acid content on fatty acid composition in Japanese Black steers
日本養豚学会 第105回大会	2016年11月	川村英輔	活性汚泥浄化槽の「適正な運転」と「窒素除去効率のよい運転」について
日本養豚学会 第105回大会	2016年11月	川村英輔	密閉縦型発酵装置の排気温度と発酵熱量との関係について
関東畜産学会 第71回大会	2016年11月	西田浩司	日最高及び日最低気温と日相対湿度における豚舎内と戸外の関連性

神奈川県畜産技術センター研究報告 第1号 (通巻 96号)

所長 竹本 佳正

編集委員会

編集委員	所 長	竹本 佳正
	副所長	矢島 裕久
	企画指導部長	田邊 眞
	企画研究課長	峰崎 洋通
	普及指導課長	相内 幹浩

事務局	企画調整グループ	関谷 敏彦
		橋村 慎二
		稲垣 靖子

神奈川県畜産技術センター  
研究報告 第1号 (通巻96号)

発行 平成29年12月

著作兼 神奈川県畜産技術センター  
発行者 神奈川県海老名市本郷3750

印刷者 (有) 湘南グッド  
藤沢市西富1-3-16



神奈川県

畜産技術センター

海老名市本郷3750

〒243-0417

電話 (046) 238-4056 FAX (046) 238-8634