

島根畜技セ研報

第 42 号

Bull.Shimane

Live.Tech.C

No.42 2011

ISSN 1882 - 1030

Bulletin of the  
Shimane Prefectural Livestock Technology Center

**No. 42 March 2011**

**島根県畜産技術センター研究報告**

第 42 号

島根県畜産技術センター

出雲市古志町 3775

Shimane Prefectural Livestock Technology Center

Izumo, Shimane, Japan

Bulletin of the  
Shimane Prefectural Livestock Technology Center

42 2011

島根県畜産技術センター研究報告 第42号 (2011)

# 島根県畜産技術センター研究報告 第42号

## 目 次

### カスタム3K SNPチップを用いた黒毛和種父方半きょうだい家系のQTL解析

中村亮一 長谷川清寿 坂本洋一 遠藤 治 岡崎尚之 ..... 1

### 経膣採卵と過剰排卵処理の併用による和牛胚の生産効率化に関する検討（第1報）

長谷川清寿 澤 香代子 坂本洋一 岡崎尚之 ..... 7

### 竹林伐採跡地における整備方法・草地化技術および放牧の検討

飯島久実 安田康明 来間正展 ..... 13

### 稲ワラロールラップサイレージの発酵品質改善と給与による生乳生産性への影響

布野秀忠 岩成文子 安田康明 ..... 17

## カスタム3K SNPチップを用いた 黒毛和種父方半きょうだい家系のQTL解析

中村亮一 長谷川清寿 坂本洋一 遠藤 治 岡崎尚之

要約 我々はこれまでに、マイクロサテライトマーカーによる枝肉形質に関するQTLマッピングを行ってきたが、ジェノタイピングに多くの時間と労力を要してきた。そのため、QTL解析の効率を改善することが課題であった。そこで今回、短時間に大量のジェノタイピングが可能なSNPチップを用いて、黒毛和種父方半きょうだい家系の枝肉形質に関するQTL解析を試みた。

対象家系は、県有種雄牛「糸安茂」号およびその肥育産子252頭（去勢201頭、雌51頭）とした。SNPタイピングは、黒毛和種の家系解析用に作成されたカスタム3K SNPチップにより、常染色体上の2,800マーカーについて行った。それらのSNPデータのうち、種雄牛でヘテロ型かつCall rateが0.95以上のマーカーを選抜してQTL解析に用いた。対象形質は枝肉重量、ロース芯面積、ばら厚、皮下脂肪厚、歩留基準値および脂肪交雑基準値（BMS）とした。各形質の表現型値は、アニマルBLUP法により算出された性、出荷年次、食肉処理場、肥育農場および出荷月齢に関する最良線形不偏推定量（BLUE）を用いて補正した。そして、各個体のSNPデータおよびBLUEにより補正した表現型値に基づいて、線形回帰によるインターバルマッピングの手法を用いてQTLの検出を行った。

SNPマーカー2,800個のうち、Call rateが0.95以上のマーカーは2,773個、このうち種雄牛がヘテロ型のマーカーは1,327個であり、その平均マーカー間隔は1.9Mb（最大26.4Mb、最小75b）であった。これらのInformation Contentは平均0.91（最大0.99、最小0.55）であった。QTL解析の結果、枝肉重量について6か所、ロース芯面積について3か所、ばら厚について3か所、皮下脂肪厚について3か所、BMSについて3か所、総計18か所に染色体ワイズ5%有意水準でQTLが検出された。18か所のQTLのFDRは0.07から0.27であった。18か所のQTLのうち、BTA8の枝肉重量に関するQTLとBTA18のばら厚に関するQTL領域はゲノムワイズ5%水準で検出された。それぞれのハプロタイプ置換効果は24.09kgと0.38cmであり、BLUE補正值の全分散に対する寄与率は6.7%と5.6%であった。

キーワード：ウシ 枝肉形質 QTL解析 SNPマーカー

これまで、「しまね和牛」の枝肉形質に関わるDNA情報について育種改良へ応用することを目的として、県基幹黒毛和種種雄牛の量的形質遺伝子座（Quantitative Trait Loci; QTL）解析に取り組み、その結果として、「茂重桜」号、「第7福桜」号および「平系勝」号が有する枝肉形質に関するQTL領域を推定した<sup>1-4)</sup>。

特定の種雄牛を父とする半きょうだい家系を対象とした枝肉形質に関するQTL解析では、父牛から産子への遺伝子伝達を追跡するためのマーカーとして、マイクロサテライトマーカーを用いることが一般的である。マイクロサテライト（MS）は、2から4塩基の配列を1単位として十数回から最大100回まで反復しているDNA配列で、反復回数の変異が多いため1座位あたりから得られる情報量が大いこと、PCR法により容易に分析できることなど、DNAマーカーとして多くの利点を持っている<sup>5)</sup>。し

かしながら、全ゲノムを対象とした1次スクリーニングにおいては、ゲノム上に配置した200から300種類のMSマーカーを個別にPCRを行う必要があるため、遺伝子型判定（ジェノタイピング）に多くの時間と労力を要する。

QTL解析に利用できるDNAマーカーとして、MSマーカーの他に、1塩基多型（SNP）マーカーがある。SNPとは、ゲノム配列中のある1塩基が他の塩基に置換しているDNA多型で、ゲノムに存在する変異の中でも最も多く、1ゲノムあたり300万から1,000万個が存在していると考えられている<sup>6)</sup>。SNPをマーカーとして用いる場合、対立遺伝子が2種類のみであるために1座位あたりの情報量は小さいが、DNAチップ法が開発されたことによって、ごく少量のDNAサンプルから数千から数百万種類のSNPを一度にタイピングすることが可能である<sup>5)</sup>。最近では、ウシにおいても、全ゲノム配列が解読<sup>7)</sup>された

ことに伴って、約5万種類のSNPをジェノタイプングできるSNPチップが開発<sup>8)</sup>され、これを用いた乳量や産肉性に関する解析<sup>9-11)</sup>が試みられるようになった。しかしながら、SNPチップによるQTL探索においては、ランダムな集団を対象とするゲノムワイド関連解析の手法がよく用いられており、父方半きょうだい家系を対象とするインターバルマッピング手法による連鎖解析を行った例<sup>12, 13)</sup>は少ない。

黒毛和種の父方半きょうだい家系を用いたQTL解析においても、SNPマーカーによるジェノタイプング手法を適用することが可能ならば、ゲノム全体に配置した多数のマーカーを短時間でタイプングでき、解析にかかる時間と労力を軽減することができる。すなわち、それは解析により得られたQTL情報を早期に育種改良へ応用することにつながる。そこで今回、黒毛和種家系解析用に作成されたカスタム3K SNPチップを用いて解析対象個体のジェノタイプングを行った後、インターバルマッピングの手法を用いて、枝肉形質に関するQTL解析を試みた。

#### 材料および方法

##### 解析対象家系

解析対象個体は、「糸安茂」号を父とする肥育産子252頭(去勢201頭、雌51頭)とした。枝肉成績は、(社)日本食肉格付協会の格付結果を用いた。なお、解析対象とした集団の枝肉成績の基本統計量は表1に示すとおりである。

##### DNA調製

各個体のゲノムDNAは、飼養管理中に採材した血液または食肉処理後に採材した腎臓周囲脂肪から、Easy-DNA Kit (Invitrogen) またはDNA自動分離装置 (NA-1000/48S、クラボウ株) を用いて分離した。分離したゲノムDNAは濃度を100ng/μlに調製した後、400ngのゲノムDNAをSNPチップによる分析に供した。

##### SNPタイプング

各個体のSNPは、2,800種のSNPが判定可能なカスタム3K SNPチップ<sup>14)</sup> (24x1 InfiniumHD iSelect Custom BeadChip, illumina) を用いて、InfiniumHD アッセイ<sup>15)</sup> (illumina) により検出した。反応後のSNPチップは、高密度マイクロアレイスキャナー (iScan, illumina) によりスキャンし、スキャンデータは、解析ソフトウェア (GenomeStudio, illumina) により解析し、SNPタイプングを行った。

##### QTL解析

各個体のSNPデータをもとに、種雄牛でヘテロ型かつマーカー毎のCall rateが0.95以上のマーカーを選抜してQTL解析に用いた。解析対象染色体は全ての常染色体 (BTA1~29) とし、対象形質は枝肉重量、ロース芯面積、ばら厚、皮下脂肪厚および脂肪交雑基準値 (BMS) とした。各形質の表現型値については、43,918件の枝肉記録からアニマルモデルBLUP法により算出された最良線形不偏推定量 (BLUE) のうち、性、出荷年次、食肉処理場、肥育農場および出荷月齢に関するBLUEを用いて補正し

表1 解析対象集団の枝肉形質表現型値の基本的統計量

区分	例数	平均値	標準偏差	標準誤差	変動係数	最小値	最大値	
枝肉重量	去勢	201	467.78	42.90	3.03	0.09	347.8	589.0
	雌	51	403.25	49.93	6.99	0.12	305.1	510.4
	全体	252	454.72	51.36	3.24	0.11	305.1	589.0
ロース芯面積	去勢	201	56.52	7.09	0.50	0.13	40	78
	雌	51	54.55	6.16	0.86	0.11	41	69
	全体	252	56.12	6.94	0.44	0.12	40	78
ばら厚	去勢	201	7.05	0.77	0.05	0.11	4.5	9.4
	雌	51	6.39	0.88	0.12	0.14	4.5	8.2
	全体	252	6.92	0.84	0.05	0.12	4.5	9.4
皮下脂肪厚	去勢	201	2.23	0.77	0.05	0.34	0.8	5.5
	雌	51	2.37	0.73	0.10	0.31	1.2	4.3
	全体	252	2.26	0.76	0.05	0.34	0.8	5.5
脂肪交雑 (BMS No.)	去勢	201	5.50	2.30	0.16	0.42	2	12
	雌	51	4.31	2.02	0.28	0.47	2	9
	全体	252	5.26	2.29	0.14	0.44	2	12

た。各個体のSNPデータおよびBLUEにより補正した表現型値に基づいて、線形回帰によるインターバルマッピングの手法を用いてQTLの検出を行った。このとき、ウシゲノム配列UMD3.0<sup>16)</sup>に基づき作成されたSNP地図を用いるとともに、尤度によるハプロタイプの推定を行った。また、QTLの有無を検定するための統計量にはF値を用い、検定の有意水準は、インターバルを2Mbとして10,000回のパーミュテーションテストにより求めた。なお、複数形質についての多重検定による偽陽性QTLの検出を想定して、偽陽性混入率 (False Discovery Rate; FDR)<sup>17)</sup> を算出した。

結 果

Call rateおよびInformation Content

2,800個のSNPマーカー中、ジェノタイピングの成功率 (Call rate) が0.95以上のマーカーは2,773個、このうち種雄牛がヘテロ型のマーカー (ヘテロマーカー) は1,327個であり、平均マーカー間隔は1.9Mb (最大26.4Mb、最小75b) であった。ゲノム上の各点におけるInformation Content (IC) は平均0.91 (最大0.99、最小0.56) であった (表2)。

QTL解析

QTL解析の結果を表3に示した。染色体ワイズ5%水準で有意な領域が検出された染色体は、枝肉重量ではBTA8、BTA15、BTA17、BTA18、BTA25およびBTA29、ロース芯面積ではBTA4、BTA5お

表2 各染色体のヘテロマーカー数、マーカー間隔およびInformation Content

染色体	ヘテロマーカー数	マーカー間隔 (Mb)			Information Content		
		平均値	最大値	最小値	平均値	最大値	最小値
1	67	2.33	16.38	0.14	0.88	0.98	0.71
2	86	1.57	5.63	0.00	0.92	0.98	0.83
3	68	1.72	6.43	0.19	0.94	0.98	0.81
4	69	1.72	9.67	0.04	0.92	0.98	0.84
5	74	1.61	5.50	0.22	0.94	0.98	0.84
6	65	1.83	7.34	0.04	0.92	0.97	0.80
7	60	1.88	16.98	0.10	0.93	0.98	0.77
8	66	1.76	5.01	0.11	0.93	0.97	0.84
9	62	1.70	5.77	0.47	0.94	0.97	0.82
10	53	1.86	6.29	0.12	0.90	0.96	0.80
11	63	1.68	7.53	0.03	0.92	0.98	0.81
12	36	2.34	11.62	0.52	0.89	0.97	0.56
13	44	1.88	6.79	0.09	0.90	0.97	0.83
14	25	3.54	26.41	0.09	0.81	0.98	0.57
15	49	1.67	6.18	0.09	0.93	0.98	0.76
16	42	1.85	6.20	0.35	0.93	0.99	0.81
17	36	2.07	9.46	0.24	0.92	0.97	0.74
18	36	1.76	7.86	0.15	0.92	0.97	0.75
19	34	1.79	7.30	0.13	0.91	0.97	0.80
20	45	1.51	4.43	0.08	0.92	0.96	0.82
21	45	1.51	5.41	0.13	0.93	0.98	0.83
22	34	1.84	5.81	0.14	0.93	0.99	0.82
23	24	2.18	7.69	0.36	0.90	0.97	0.78
24	31	2.03	9.88	0.43	0.92	0.96	0.83
25	18	2.31	8.19	0.16	0.88	0.96	0.79
26	26	1.85	4.22	0.43	0.91	0.97	0.76
27	20	2.10	8.10	0.46	0.87	0.94	0.76
28	26	1.84	6.64	0.04	0.90	0.96	0.83
29	23	2.24	8.04	0.50	0.91	0.95	0.84
合計 1327		平均 1.93			平均 0.91		

よびBTA14、ばら厚ではBTA5、BTA12およびBTA18、皮下脂肪厚ではBTA1、BTA2およびBTA16、BMSではBTA3、BTA13およびBTA18であり、総計18か所にQTLが検出された。18か所のQTLのFDRは0.07から0.27であった。18か所のQTLのうち、BTA8の枝肉重量に関するQTLとBTA18のばら厚に関するQTL領域はゲノムワイズ5%水準で検出された(図1、2)。それぞれのハプロタイプ置換効果は24.09kgと0.38cmであり、BLUE補正値の全分散に対する寄与率は6.7%と5.6%であった。

考 察

我々はこれまでに、MSマーカーによる枝肉形質QTLのマッピングを行ってきたが、ジェノタイプングのために多くの時間と労力を要してきた。最近、ウシや他の畜種においても、ゲノム全体に分布している多数のSNPをジェノタイプングするための高スループットシステムが開発され、これらを用いた乳量や産肉性に関するゲノムワイド関連解析<sup>9-11)</sup>や遺伝性疾患の原因遺伝子の探索<sup>18)</sup>などが試みられている。SNPマーカーは、1座位あたりから得られる情報量が少ないが、あらかじめSNPマーカーを密に配置しておけば、MSマーカー以上の情報量(IC)が得られるため、QTLの検出力が高くなることが期待

表3 QTL解析の結果

形質	染色体	位置 (Mb)	F値	IC	ハプロタイプ置換効果	寄与率 <sup>a</sup> (%)	染色体ワイズ有意水準 <sup>b</sup>	ゲノムワイズ有意水準 <sup>b</sup>	FDR
枝肉重量	8	82	19.0	0.95	24.09	6.7	***	**	0.12
枝肉重量	15	68	9.8	0.91	17.97	3.4	*		0.18
枝肉重量	17	74	7.6	0.80	16.86	2.5	*		0.27
枝肉重量	18	58	8.2	0.96	16.07	2.8	*		0.25
枝肉重量	25	30	7.9	0.87	16.50	2.7	*		0.26
枝肉重量	29	52	8.3	0.87	16.90	2.8	*		0.25
コース芯面積	4	28	9.2	0.93	2.63	3.2	*		0.21
コース芯面積	5	30	11.1	0.95	2.85	3.9	*		0.14
コース芯面積	14	22	10.3	0.85	2.89	3.6	**		0.18
ばら厚	5	100	11.7	0.94	0.33	4.1	**		0.13
ばら厚	12	8	12.7	0.89	0.35	4.5	**		0.12
ばら厚	18	58	15.8	0.96	0.38	5.6	***	*	0.07
皮下脂肪厚	1	156	13.9	0.93	0.36	4.9	**		0.09
皮下脂肪厚	2	0	8.4	0.88	0.29	2.9	*		0.25
皮下脂肪厚	16	28	10.9	0.92	0.32	3.8	**		0.15
BMS	3	102	8.8	0.92	0.30	3.0	*		0.23
BMS	13	84	13.3	0.85	0.38	4.7	**		0.11
BMS	18	48	12.3	0.92	0.35	4.3	**		0.13

a) 解析対象の全分散に対する寄与率

b) \* : P<0.05、\*\* : P<0.01、\*\*\* : P<0.001

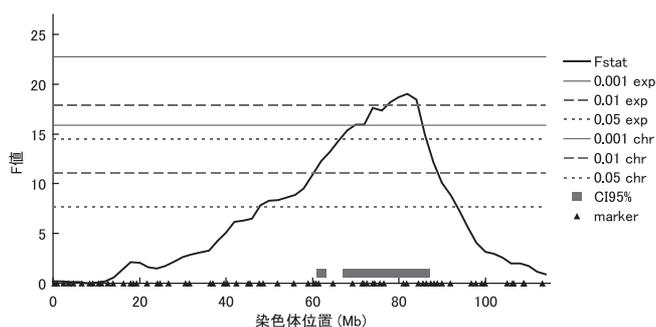


図1 BTA8におけるF値の分布 (枝肉重量)

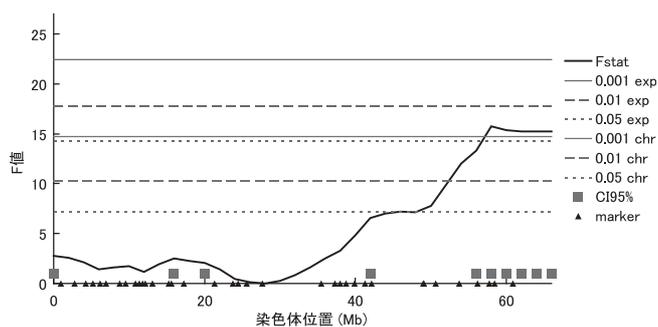


図2 BTA18におけるF値の分布 (ばら厚)

される。さらに、SNPは対立遺伝子数が2つであるため、解析に用いたマーカーセットが同一ならば、他家系での解析結果との比較や複数の家系を統合した解析<sup>19)</sup>が容易であるという利点もある。そのため、全ゲノムを対象とする1次スクリーニングにSNPタイピング技術を適用することができれば、解析にかかる労力・時間が大幅に削減でき、解析効率を改善することが期待できる。

そこで今回、解析効率の改善を目的として、2,800種のSNPを判定可能なカスタム3K SNPチップを用いた黒毛和種父方半きょうだい家系（「糸安茂」およびその肥育産子）の枝肉形質に関するQTL解析を行ったところ、2,800マーカーのうち、1,327マーカーが「糸安茂」でヘテロ型を示し（ヘテロ率47.4%）、全ての常染色体が解析可能であった。インターバルマッピング法によるQTL解析では、ヘテロマーカーを用いて、染色体上の任意の点における父牛からのアリル伝達確率を推定する。したがって、ヘテロマーカーをどのくらいの密度で配置できるかは、QTL解析の重要なポイントである。今回使用したカスタム3K SNPチップは、ウシ50K SNPチップによるジェノタイプデータを基に黒毛和種集団内で多型性の良い（ヘテロ率の高い）SNPマーカーを選定して作成されている<sup>14)</sup>。そのため、MSマーカーを用いた場合と同等のヘテロ率が得られたと推察される。

また、SNPチップを用いたQTL解析が成功するための重要な要素として、Call rateとマーカーから得られるICが挙げられる。Call rateは、各個体の遺伝子型を判定できた割合であり、この値が低い場合にはジェノタイプデータに誤りがある危険性があるため、任意にしきい値を設定してその値を下回るマーカーのデータを解析から除外することが一般的である。カスタム3K SNPチップによるジェノタイプピングの結果、Call rateが0.95以上のマーカーは2,773個であり、99%のマーカーのジェノタイプピングに成功した。また、算出されたICについては、一部の領域（BTA12およびBTA14のテロメア側）ではICが低かったが、ゲノム全体にわたっての平均のICは0.91と十分に高い値が得られた。ICとは、解析した各個体からどの程度の遺伝的情報量が得られたかを示す指標である。これまでのMSマーカーによる1次解析で得られるICは0.7前後<sup>14)</sup>であることから、SNPチップを用いることによりMSマーカー以上の情報量が得られることが示唆された。

さらに、性や出荷年次、食肉処理場などの環境的

効果による表現型値への影響を排除するため、アニマルBLUP法で算出されるBLUEにより補正した表現型値を用いてQTL解析を行ったところ、総計18か所にQTLを検出することができた。特に、BTA8およびBTA18においては、ゲノムワイズ5%水準で有意な領域が検出された。BTA8の枝肉重量QTLについては、これまでに6つの父方半きょうだい家系の解析において、同じ領域にQTLが検出されており<sup>20)</sup>、解析された6頭の種雄牛が有する優良型ハプロタイプは共通の祖先である「第7系桜」号に由来していることが分かっている<sup>20)</sup>。そこで、「糸安茂」も「第7系桜」を祖父に持つことから、BTA8の枝肉重量QTLのハプロタイプの由来についてMSマーカーを用いて調査したところ、「糸安茂」の優良型ハプロタイプは「第7系桜」に由来するものであり、6種雄牛の優良型ハプロタイプと同一祖先由来（identical by descent; IBD）であることが確認された。これらのことから、カスタム3K SNPチップを用いた黒毛和種父方半きょうだい家系のQTL解析においても、実際に枝肉形質に関するQTLを検出できると考えられる。

一方、BTA18については、ばら厚に関してゲノムワイズ5%水準で有意な領域が検出されるとともに、この領域は枝肉重量およびBMSについても染色体ワイズ5%水準で有意であったことから、BTA18には複数の形質に影響を及ぼすQTLが存在することが推察される。また、このBTA18のQTL領域については、Yokouchiら<sup>21)</sup>と中藤ら<sup>22)</sup>が、BMSに関するQTLを検出していることから、今後、それら2家系とのハプロタイプ比較を行い、共通ハプロタイプが存在するかどうか検討していく必要がある。また、今回検出された18か所のQTL領域の中には、マーカー密度が不十分と思われる箇所も存在するため、マーカーおよび解析個体数を追加した解析を行い、さらに詳細な検討を加えていきたい。

以上のことから、SNPチップを用いた黒毛和種父方半きょうだい家系のQTL解析により、実際に枝肉形質に関するQTLを検出することが確認できた。したがって、今後、特定種雄牛に由来する父方半きょうだい家系を対象とした1次スクリーニングを行う際には、SNPチップを用いて各個体のジェノタイプピングを行うことが、QTL解析の効率を改善するために有効な手段と考えられた。

## 参 考 文 献

- 1) 安部亜津子ら．島根県立畜産試験場研究報告，

- 38: 9-13, 2005.
- 2) 安部亜津子ら. 島根県立畜産技術センター研究報告, 39: 7-11, 2006.
- 3) 中村亮一ら. 島根県畜産技術センター研究報告, 41: 11-16, 2010.
- 4) 中村亮一ら. 平成21年度島根県畜産関係機関業績発表会集録, 67-71, 2010.
- 5) 動物遺伝育種シンポジウム組織委員会. 動物遺伝育種学事典. 畜産技術協会. 東京. 2001.
- 6) Wang D.G., et al. *Science*, 280(5366): 1077-1082, 1998.
- 7) Bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium. *Science*, 324(5926): 522-528, 2009.
- 8) Matukumalli L.K., et al. *PLoS One*, 4(4): e5350, 2009.
- 9) Jiang L., et al. *PLoS One*, 5(10): e13661, 2010.
- 10) Mai M.D., et al. *Journal of Animal Science*, 88(11): 3522-3528, 2010.
- 11) Snelling W.M., et al. *Journal of Animal Science*, 88(3): 837-848, 2009.
- 12) Stoop W.M., et al. *Journal of Dairy Science*, 92(9): 4664-4675, 2009.
- 13) Schennink A., et al. *Journal of Dairy Science*, 92(9): 4676-4682, 2009.
- 14) 西村翔太ら. 日本動物遺伝育種学会第11回大会講演要旨, I-05, 2010.
- 15) Steemers F.J., et al. *Nature Methods*, 3(1): 31-33, 2006.
- 16) Bovine Genome Assembly, UMD Bos taurus 3.0. [http://www.cbcb.umd.edu/research/bos\\_taurus\\_assembly](http://www.cbcb.umd.edu/research/bos_taurus_assembly), University of Maryland, USA.
- 17) Weller J.I., et al. *Genetics*, 150: 1699-1706, 1998.
- 18) Charlier C., et al. *Nature Genetics*, 40(4): 449-454, 2008.
- 19) 渡邊敏夫ら. 日本動物遺伝育種学会第11回大会講演要旨, I-08, 2010.
- 20) 高野 淳ら. 日本動物遺伝育種学会第10回記念大会講演要旨, I-05, 2009.
- 21) Yokouchi K., et al. *Animal Genetics*, 40(6): 945-951, 2009.
- 22) 中藤由紀ら. 岡山県総合畜産センター研究報告, 19: 1-4, 2009.

## 経膈採卵と過剰排卵処理の併用による 和牛胚の生産効率化に関する検討 (第1報)

長谷川清寿 澤 香代子<sup>1)</sup> 坂本洋一 岡崎尚之

要約 黒毛和種における効率的な胚生産とドナー牛の年1産の同時実現を到達目標として、経膈採卵 (OPU) による体外胚生産ならびに過剰排卵処理 (SOV) による体内胚生産の2つの技術の併用について検討した。まず、OPU時からOPU後6日目までの卵胞動態を観察した結果 (実験1)、総卵胞数および小・中卵胞の総数はOPU後1日目から3日目にかけて有意 ( $P < 0.01$ ) に増加し、その後6日目までほぼ同数で推移した。また、OPU後4日目以降、平均8 mm以上の主席卵胞と推定される大卵胞が出現した。次に、SOV開始3日前のOPUの有無による体内胚生産成績の比較 (実験2) を行ったところ (OPU-SOV群 vs SOV群)、採取卵数 ( $7.7 \pm 1.6$  vs  $7.7 \pm 2.1$ )、移植可能胚数 ( $6.0 \pm 1.6$  vs  $4.9 \pm 2.6$ ) 等の調査項目に有意差は認められなかった。そして、実験2のOPU-SOV手法を分娩後30日目および60日目から適用する試験群 (D30OPU-SOV群およびD60OPU-SOV群) に、比較対照として分娩後60日以内にSOVのみを適用する群 (D60SOV群) を加えて比較した (実験3)。OPUによる体外胚生産成績 (D30OPU-SOV群 vs D60OPU-SOV群) は、採取した卵丘細胞 - 卵子複合体 (COC) 数 ( $31.9 \pm 7.8$  vs  $38.7 \pm 8.1$ )、移植可能胚数 ( $2.3 \pm 0.9$  vs  $1.9 \pm 0.6$ ) 等の調査項目に有意差は認められなかった。SOVによる体内胚生産成績 (D30OPU-SOV群 vs D60OPU-SOV群 vs D60SOV群) では、採取卵数 ( $13.3 \pm 3.0$  vs  $14.6 \pm 5.2$  vs  $22.1 \pm 3.5$ )、移植可能胚数 ( $7.1 \pm 2.8$  vs  $11.4 \pm 4.1$  vs  $14.4 \pm 3.3$ ) については有意差が認められなかったが、移植可能胚率はD60OPU-SOV群 ( $81.3 \pm 6.9\%$ ) がD30OPU-SOV群 ( $50.1 \pm 11.5\%$ ) と比べて有意 ( $P < 0.05$ ) に高率であった。そして、OPUとSOVで生産した移植可能胚の総数 ( $9.3 \pm 3.0$  vs  $13.2 \pm 3.7$  vs  $14.4 \pm 3.3$ ) は、3群間に有意差は認められなかった。以上のことから、OPU後の第1卵胞波を利用したSOVをOPU3日後から開始した場合、体内胚生産成績にOPUの負の効果は認められず、新たに導出された卵胞波がSOVの反応性を有することが確認された。また、生産される移植可能胚の総数において、分娩後早期にOPU-SOVを適用するプログラム (D30OPU-SOVおよびD60OPU-SOV) は分娩後60日以内にSOVのみの適用する場合 (D60SOV) と明瞭な差は生じない可能性が推察された。

キーワード：牛 黒毛和種 経膈採卵 過剰排卵処理 年1産

ウシ胚移植は、技術開発と普及定着化が全国的に進められた結果、現在ではルーチンな繁殖技術として位置づけられている。特に、胚移植による和牛生産は、近年、主に乳用種をレシピエントとすることによって広汎に普及し、島根県内においても移植数の増加とともにフィールド技術として定着してきている。このような状況の中、特定のドナー牛から移植希望数を満たす和牛胚を確保するため、ドナー当たりの移植可能胚の増数、つまり胚生産の効率化が課題となっている<sup>1)</sup>。加えて、ドナー牛を飼養する和牛繁殖農場の立場からは胚生産と年1産の同時実現が強く望まれ、胚生産にかかる期間の短縮化はドナー牛借用の飼養者理解を得る観点から、もう一つの実現すべき課題として指摘されている。

そこで我々は、胚生産の効率化を目的として、体

内胚生産のための過剰排卵処理 (SOV) を適用するドナー牛に対して、経膈採卵 (OPU) と体外受精 (IVF) による体外胚生産の追加的適用を検討し、さらにはドナー牛の年1産の実現が可能かどうか併せて検討することとした。OPUの適用は、SOV処理後の場合では形成黄体の除去に日数を要することが想定されることから、ドナー牛からの胚生産期間の短縮を図る観点からは、SOV処理前での設定が必要となる。しかしながら、SOV後の胚採取成績について卵胞波のホルモン剤による制御<sup>2, 3)</sup> や大型卵胞の吸引除去<sup>4-10)</sup> の有効性に関する知見は得られているものの、ほとんどの卵胞を吸引対象としたOPUの後で新たに生じる卵胞波を利用したSOVについては卵胞数の減少の観点から否定的な意見<sup>11, 12)</sup> が主流である。したがって、SOV前のOPUについては

現所属：<sup>1)</sup> 西部農林振興センター江津家畜衛生部

基礎的に検討して、その適用方法を詳細化しなければならない。

一方、ドナー牛の年1産を目指すためには、分娩後早期、少なくとも分娩後70日前後までに胚生産を終了させて、次産分娩に向けた繁殖を開始する必要がある。分娩後早期の胚生産について、SOVによる体内胚の採取成績は分娩後3から5か月が最も良好で、2か月未満では不良<sup>13, 14)</sup>とされていたが、最近になって分娩後30日を起点としたERも試みられるようになった<sup>15, 16)</sup>。さらに、OPUによる体外胚生産についても、分娩後10から30日のドナーに対して適用可能であることが報告されている<sup>17, 18)</sup>。これらの知見は、それぞれの手法における分娩後早期の胚生産の可能性を強く示唆しているが、OPUとSOVの併用による影響や効果は明らかではない。

そこで、当センター内に繋養する黒毛和種経産牛を用いて、OPU後の卵胞動態の観察からSOV開始時期の設定(実験1)を試みるとともに、SOV前のOPUの胚生産に及ぼす影響について調べた(実験2)。さらに、分娩からの経過期間別にOPUとSOVを併用して胚生産成績を比較した(実験3)。

#### 材料および方法

実験1：OPU後のSOV開始時期の検討

供試牛は、黒毛和種経産牛8頭(年齢：7-12)とした。すべての供試牛に腔内留置型プロジェステロン製剤(CIDR：イージーブリード；(社)家畜改良事業団)を挿入、同時に安息香酸エストラジオール製剤(EB：ギナンドール；三共製薬)を投与(2mg/頭)、その4日後にOPUを行った。OPUは、当センターの常法<sup>1)</sup>に準じて長径2mm以上の卵胞を対象として行い、約1か月間隔で各供試牛に3回ずつ適用した。卵胞動態の観察は、CIDRを挿入したままOPU時からOPU後6日目まで毎日定時に、超音波画像で卵胞数を長径サイズ別(大卵胞：8mm以上、中卵胞：5mm以上8mm未満、小卵胞：3mm以上5mm未満)に計数することで行った。また、OPU後の第1卵胞波において最大長径を示した卵胞は、主席卵胞(DF)とした。なお、OPUおよび卵胞動態の観察には、7.5MHzプローブを装着した超音波画像診断装置(prosound 6；アロカ)を用いた。

実験2：胚生産に及ぼすSOV前のOPUの影響調査

供試牛は分娩後70日以上経過かつ過去2か月以内にSOV歴の無い黒毛和種経産牛14頭(年齢：2-13)とし、OPU-SOV群(n=7)とSOV群(n=7)の

2群に区分した。OPU-SOV群では、発情後6から11日目の期間中にOPUを行い、その3日後にSOVを開始した。SOV群では、OPUを行わず、発情後9から14日目の期間中にSOVを開始した。体外胚の生産は、当センターの常法<sup>1)</sup>に基づき、OPUで採取した卵丘細胞-卵子複合体(COC)から明らかに変性したCOCを除いて媒精処理した後、5%CO<sub>2</sub>、5%O<sub>2</sub>、90%N<sub>2</sub>の気相条件下の改変TCM199培地(IVD101；機能性ペプチド研究所)(Abe)内で7日間体外培養することで行った。体内胚の生産は、ブタ由来卵胞刺激ホルモン(pFSH)製剤(アントリンR；共立製薬)の3日間漸減投与(総量20AU/頭)およびpFSH最終投与時のプロスタグランディンF2アナログ製剤(エストラメイト；シェリング・プラウアニマルヘルス)投与(0.75mg/頭)によるSOV後に人工授精し、その7日後に子宮灌流による胚採取を行った。採取した卵子は、顕微鏡下で品質判定(品質コード1から4)を行った。調査項目は、体外胚生産ではOPUによるCOC採取数およびIVFによる胚発生成績とし、体内胚生産では胚採取時の形成黄体数、採取卵数移植可能胚(品質コード：1-3)数および良質胚(品質コード：1-2)数とした<sup>19)</sup>。

実験3：OPU-SOVによる胚生産に及ぼす分娩後日数の影響調査

供試牛は、黒毛和種経産牛27頭(年齢：2-13)を用いた。OPUとSOVの併用(OPU-SOV)を適用する試験群は分娩後経過日数から2群に区分した。すなわち、OPUを分娩後30日に行うD30OPU-SOV群(n=8)および分娩後60日に行うD60OPU-SOV群(n=7)とした。さらに、対照群として、OPUを行わず分娩後60日以内にSOVを開始するD60SOV群(n=12)を設定した。D30OPU-SOV群およびD60OPU-SOV群では、実験2と同様な方法でOPUおよびSOVを適用して体外胚および体内胚生産を行った。ただし、OPUは発情周期に関係なく行い、OPU直後からSOV開始後3日目まで6日間CIDRを腔内に留置した。一方、D60SOV群では、分娩後の発情(自然あるいは誘起)および9から14日齢の機能性黄体を確認後、SOVによる胚採取を行った。なお、調査項目は実験2と同様とした。

統計解析

統計解析は解析ソフト(エクセル統計2008 for Windows、社会情報サービス)を用い、実験1における卵胞数の変動経過はOPU後1日目から6日目までの卵胞数について、多重比較検定(Bonferroni

法)を行った。また、実験2および3では、試験区分間の各数値について分散分析を行い、多重比較検定(Scheffe法)を適用した。

結 果

実験1：OPU後のSOV開始時期の検討

OPU後の卵胞動態およびDFサイズの推移は、図1に示した。総卵胞数および小・中卵胞総数は、OPU後1日目から3日目にかけて有意( $P < 0.01$ )に増加し、その後6日目までほぼ同数で推移した。さらに、OPU後1日目からDF長径を継続的に調べた結果、OPU後3日目までは平均値が8mm未満であったが、OPU後4日目では平均8.6mmとなり、6日目では平均10.7mmであった。また、延べ24頭の観察で大卵胞形成を認めた個体はOPU後2日目以降にみられ、その個体数(頭数割合)は2日目で

2頭(8.3%)、3日目で8頭(33.3%)、4日目で18頭(75.0%)、5日目で21頭(87.5%)、6日目で23頭(95.8%)であった。

実験2：胚生産に及ぼすSOV前のOPUの影響調査

SOV前のOPUの有無による胚生産成績の比較については、表1に示した。OPU-SOV群における体外胚生産成績のうち、平均移植可能胚数(発生率)は1.1個(11.5%)であった。体内胚生産成績について、OPU-SOV群とSOV群を比較したところ、形成黄体数、採取卵数、移植可能胚数(採取卵数に対する占有率)および良質胚数(採取卵数に対する占有率)に有意差は認められなかった。これらの体内胚生産成績のうち、平均移植可能胚数はOPU-SOV群が6.0個、SOV群が4.9個であった。そして、生産した移植可能胚の総数については、OPU-SOV群では体外胚と体内胚の合算による平均値が7.1個で

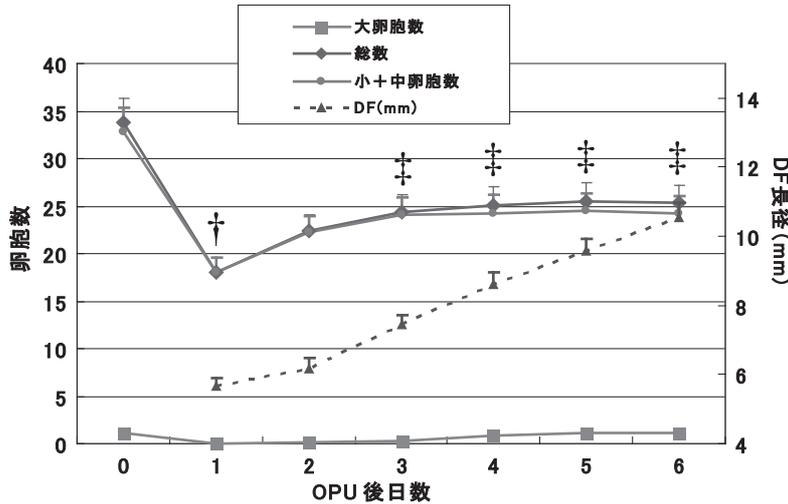


図1 OPU後の卵胞動態およびDFサイズの推移

‡ OPU後2日目以降の卵胞数について、OPU後1日目(+)との比較で有意差あり( $P < 0.01$ )。

注1) 図中の表示値は平均値±標準誤差を示す。

注2) 卵胞サイズ区分：長径により、小卵胞(2mm以上5mm未満)、中卵胞(5mm以上8mm未満)および大卵胞(8mm以上)に分類。

注3) DF：OPU後の第1卵胞波で最大長径を示した卵胞(主席卵胞)。

表1 SOV前のOPUの有無による胚生産成績の比較

(平均値±標準誤差)

区分	OPUによる体外胚生産				SOVによる体内胚生産				移植可能胚の総生産数
	採取COC数	IVF供試COC数	卵割数	移植可能胚数 <sup>1)</sup>	形成黄体数	採取卵数	移植可能胚数 <sup>2)</sup>	良質胚数 <sup>2)</sup>	
OPU-SOV群 (n=7, 平均年齢=8.4)	21.9±5.7	15.0±4.2	3.9±1.2 (24.4±5.9) <sup>3)</sup>	1.1±0.3 (11.5±6.6) <sup>3)</sup>	10.4±1.4	7.7±1.6	6.0±1.6 (69.0±14.2) <sup>4)</sup>	5.3±1.6 (58.6±14.2) <sup>4)</sup>	7.1±1.5
SOV群 (n=7, 平均年齢=7.5)	-	-	-	-	15.6±2.8	7.7±2.1	4.9±2.6 (44.4±17.8) <sup>4)</sup>	3.4±1.9 (30.4±11.6) <sup>4)</sup>	4.9±2.6

1) IVF後7日目時点の発生胚盤胞数。

2) 移植可能胚は国際胚移植学会(IETS)による「品質コード1-3」と判定した胚で、良質胚は移植可能胚のうち低ランク胚を除く「品質コード1-2」と判定した胚。

3) IVF供試COC数に対する割合(%)。

4) 採取卵数に対する割合(%)。

表2 分娩後日数区別のOPU-SOVでの胚生産成績の比較

(平均値±標準誤差)

区分	OPUによる体外胚生産				SOVによる体内胚生産				移植可能胚の総生産数
	採取COC数	IVF供試COC数	卵割数	移植可能胚数 <sup>1)</sup>	形成黄体数	採取卵数	移植可能胚数 <sup>2)</sup>	良質胚数 <sup>2)</sup>	
D30OPU-SOV群 (n=8, 平均年齢=7.2)	31.9±7.8	18.4±3.5	6.0±1.9 (34.1±7.8) <sup>3)</sup>	2.3±0.9 (12.8±5.2) <sup>3)</sup>	17.6±3.8	13.3±3.0	7.1±2.8 (50.1±11.5) <sup>a4)</sup>	4.3±1.7 (34.8±11.2) <sup>4)</sup>	9.3±3.0
D60OPU-SOV群 (n=7, 平均年齢=5.5)	38.7±8.1	13.0±2.6	4.1±1.1 (38.7±8.1) <sup>3)</sup>	1.9±0.6 (19.4±8.8) <sup>3)</sup>	17.0±5.0	14.6±5.2	11.4±4.1 (81.3±6.9) <sup>b4)</sup>	8.0±2.8 (42.8±13.3) <sup>4)</sup>	13.2±3.7
D60SOV群 <sup>5)</sup> (n=12, 平均年齢=6.0)	-	-	-	-	25.0±3.2	22.1±3.5	14.4±3.3 (58.1±9.7) <sup>4)</sup>	11.0±2.7 (41.9±7.7) <sup>4)</sup>	14.4±3.3

異符号間に有意差あり (a,b :  $P < 0.05$ )。

1) IVF後7日目時点の発生胚盤胞数。

2) 移植可能胚は国際胚移植学会 (IETS) による「品質コード1-3」と判定した胚で、良質胚は移植可能胚のうち低ランク胚を除く「品質コード1-2」と判定した胚。

3) IVF供試COC数に対する割合 (%)。

4) 採取卵数に対する割合 (%)。

5) 分娩後60日以内でSOVを開始した群で、起点分娩からSOV処理までの日数は平均50日 (範囲: 43-58)。

あり、SOV群との平均値の差は2.2個であった。ただし、両群間に統計的な有意差は認められなかった。実験3: OPU-SOVによる胚生産に及ぼす分娩後日数の影響調査

分娩後日数区別のOPU-SOVでの胚生産成績の比較については、表2に示した。OPUによる体外胚生産成績における採取COC数、IVF供試COC数、卵割数(率)および移植可能胚数(率)について、D30OPU-SOV群とD60OPU-SOV群との差は認められなかった。一方、SOVによる体内胚生産成績のうち、形成黄体数、採取卵数、移植可能胚数および良質胚数については3群間の数値に差は認められなかったが、採取卵数に対する移植可能胚数の割合(移植可能胚率)はD60OPU-SOV群(平均81.3%)がD30OPU-SOV群(平均50.1%)と比べて有意( $P < 0.05$ )に高率であった。採取卵数に対する良質胚の割合(良質胚率)は、各群間の数値に有意差は認められなかった。そして、生産した移植可能胚の総数については、D30OPU-SOV群が平均9.3個、D60OPU-SOV群が平均13.2個、D60SOV群が平均14.4個であったが、3群間に有意差は認められなかった。

### 考 察

我々は、効率的な胚生産とドナー牛の年1産の同時実現を到達目標として、OPUによる体外胚生産ならびにSOVによる体内胚生産の2つの技術の併用がこの目標に寄与し得るかどうかを検討することとした。

まず、最初の段階として、OPU後のSOV開始時

期を設定することが必要であった。そして、実験1においてOPU後の卵胞動態を観察した結果、小および中卵胞の合計数がOPU後3日目に最大となること、さらにまた、OPU後4日目にDFと同定できる大型サイズ(長径8mm以上)の卵胞が出現することを確認した。Toheiら<sup>20)</sup>が調べたOPU後の血中ホルモン動態によれば、OPUにより血中エストロジオールおよびインヒピン濃度が急激に低下し、その結果卵胞刺激ホルモン(FSH)濃度がOPU後1から1.5日目をピークに増加した後、徐々に低下して5日目に基底レベルに戻る。また、Adamsら<sup>21)</sup>は、FSHのピーク後1日目に卵胞波の出現を確認し、DFが選抜される時期にFSH濃度が減少し始めることを報告している。本実験においても、血中ホルモン濃度は測定しなかったものの、卵巣中の卵胞動態はToheiら<sup>20)</sup>とAdamsら<sup>21)</sup>が報告した卵胞および血中ホルモン動態を強く反映する結果であると考えられ、OPU後4日目で出現した大型卵胞は明らかにDFであることが示唆された。DFの特性として、内包する顆粒層細胞からはインヒピンが分泌され、そのインヒピンによって下垂体からのFSH分泌が抑制され、DF以外の卵胞を退行させること<sup>22)</sup>が詳らかにされている。そして実際に、SOV開始時における機能的なDFの存在は卵胞発育の抑制によってSOV後の卵巣反応に悪影響を及ぼすことが報告されている<sup>23, 24)</sup>。さらに、その裏付けとして、卵胞波出現に合わせたSOVでは、卵胞波を制御しないケースと比べて、卵巣反応が良好であることも示されている<sup>2)</sup>。これらの知見に今回の成績を加味すると、OPU後の第1卵胞波を利用したSOVの場合、SOV

におけるpFSH投与の開始をOPU後3日目に設定するのが最も妥当と判断された。ただし、pFSHに対する反応が卵胞におけるFSHレセプター遺伝子の発現<sup>25)</sup>に影響される可能性があり、OPU前後での変動を追補的な調査として加える必要がある。

次に、SOV処理前のOPUが体内胚生産にどのような影響を及ぼすかを調べるのが課題となる。Mertonら<sup>12)</sup>はSOV前のOPUはSOVに反応する卵胞数を減少させる可能性を示唆し、Kawamata<sup>26)</sup>はSOV開始時の小卵胞数がER時の黄体数と相関を示すことを報告している。しかし、今回の実験（実験2）において、OPUの有無で体内胚生産成績を比較した結果、OPUの明らかな影響は認められなかった。また、1頭あたりの平均移植可能胚数はOPUを行った試験群（OPU-SOV群）がOPUを行わない群（SOV群）をむしろ上回った。これらの結果から、少なくともOPUのマイナス効果は少ないことが推察され、新たに導出された卵胞波がSOVの反応性を有することが確認された。そして、SOV前のOPUによってDFも同時吸引されることで、SOVの障害となる卵胞の発育抑制<sup>22-24)</sup>を低減できる可能性も示唆された。さらに、SOVに反応する卵胞には発育過程にある卵胞と閉鎖過程にある卵胞が含まれていると考えられるが、OPU後のSOVでは発育過程にある卵胞のみが反応するため、結果的に変性卵や未受精卵が少なくなった<sup>12)</sup>とも推察された。Hillら<sup>11)</sup>もSOVの1から2日前のOPUによって回収卵数および正常胚数が向上したことを報告している。したがって、SOV前のOPUは、SOVによる胚生産に対してマイナスの効果よりプラスの効果を与える可能性がある。

一方、分娩後のOPUについて、Sasamotoら<sup>27)</sup>は乳用種ドナーにおいて分娩後経過日数（30日前後 vs 100日前後）および初回排卵や発情回帰の有無は、OPUによる採取COC数や卵子の受精能との関連性が認められないことを示している。今回の実験（実験3）においても、分娩後30および60日目に設定したOPUと採取COCを用いたIVFに関するすべての調査項目において両群（D30OPU-SOV群 vs D60OPU-SOV群）間に明らかな差は認められず、Sasamotoら<sup>27)</sup>の報告を示唆する結果と考えられた。つまり、分娩後の経過日数を要因として考慮する場合には、30から60日の範疇であればOPU-IVF成績に大きな差は出ない可能性が示唆された。そして特に、IVF後の胚発生成績については、作田ら<sup>28)</sup>は分娩後10日目からの7日間隔の連続OPUによって、

分娩後23日以降37日目までの3回の胚発生率は約30%（平均発生個数は3.3個）であることを報告している。今回の成績では両群ともに作田らの報告<sup>28)</sup>と比べて移植可能胚への発生率がやや低率（平均10から20%、平均発生個数は両群とも約2個）で、改善の余地が残されていることから、今後は、ドナーの分娩後の栄養管理や産子の哺乳の影響<sup>17, 18, 29)</sup>についても併せて検討する必要がある。

本実験において、移植可能胚の生産総数（体外胚と体内胚の合計数）は、胚生産の効率化の観点から極めて重要な評価ポイントの一つである。技術体系の実用化を想定すれば、ドナーの年1産には分娩後70日前後までに胚生産を終えることが必要であり、分娩後30日あるいは60日でOPUを行い、その後SOVを開始するプログラム（D30OPU-SOVおよびD60OPU-SOV）を設定して比較した。実験3における移植可能胚の総数は、比較対照とした分娩後60日以内にSOVのみの適用（D60SOV）群との統計的な有意差はなく、OPUによる明らかな胚生産数の増数効果は確認できなかった。そして我々は、分娩後60日までの比較の日数が経過していない時期においては産後の生殖器機能の回復に個体差が生じて、OPU-SOVの適用によるプラス効果は必ずしも明確とならないため、最終的な移植可能胚の生産総数の増数に対する有効性としては確認されなかったものと考えた。特に、D30OPU-SOVでは、D60SOVと比べて体内胚の平均移植可能胚数が7個少なく、結果的に移植可能胚の総数が平均値で5個程度少ないという結果が得られ、分娩後の卵巣機能の回復が不十分であった可能性が推察された。その一方で、D60OPU-SOV群では平均移植可能胚率が80%以上とD30OPU-SOV群に比べて明らかに高率であり、分娩後からある程度の日数が経過したドナーにおいてSOV前のOPUの適用効果、すなわち移植可能胚率の向上については十分期待できると考えられた。今回の調査ではドナーの個体差は考慮せず、任意に供試牛を選定して群分けを行ったが、今後は同一供試牛について次産以降にそれぞれのプログラムを交互に適用して再解析を行う方向である。そしてさらに、胚生産後の繁殖成績の比較検討を加えて、技術体系を総合的に評価していきたい。

以上のことから、OPU後の第1卵胞波を利用したSOVの場合、SOV開始をOPU後3日目に設定するのが最も妥当と判断された。また、OPUの有無で体内胚生産成績を比較した結果、OPU実施によるマイナス効果は認められず、新たに導出された卵

胞波がSOVの反応性を有することが確認された。さらに、多角的な検討を追加しなければならないが、生産される移植可能胚の総数において、分娩後早期にOPU-SOVを適用するプログラム (D30OPU-SOV およびD60OPU-SOV) は分娩後60日以内にSOVのみを適用する場合 (D60SOV) と明瞭な差は生じない可能性が推察された。

#### 参 考 文 献

- 1) 長谷川清寿ら. 島根県畜産技術センター研究報告, 40: 1-5, 2008.
- 2) Nasser L.F., et al. *Theriogenology*, 40: 713-724. 1993.
- 3) Bo G.A., et al. *Theriogenology*, 65: 89-101. 2006.
- 4) Lindsey B.R., et al. *Theriogenology*, 41: 238 (Abstr.). 1994.
- 5) Hill B.R., et al. *Theriogenology*, 45: 324. 1996.
- 6) 吉羽宣明・高田新一郎. 埼玉県畜産センター研究報告, 3: 1-6, 1999.
- 7) 佐伯拓三ら. 愛媛県畜産試験場研究報告, 17: 49-51, 1999.
- 8) Baracaldo M.I., et al. *Theriogenology*, 53: 1239-1250. 2000.
- 9) 高仁敏光ら. 島根県立畜産試験場研究報告, 33: 13-16, 2000.
- 10) 紀川将之ら. 徳島県立農林水産総合技術センター畜産研究所研究報告, 6: 10-12, 2006.
- 11) 赤塚裕人ら. 宮崎県畜産試験場試験研究報告, 12: 20-26, 1999.
- 12) Merton J.S., et al. *Theriogenology*, 59: 651-674. 2003.
- 13) 小西一之ら. 畜産の研究, 42: 1261-1265. 1988.
- 14) Sahara H., et al. *Japanese Journal of Animal Reproduction*, 37: 33-36. 1991.
- 15) 河合隆一郎・笹木教隆. 第15回東日本家畜胚移植技術研究会大会要旨集, 28-29. 2000.
- 16) 有安亮代ら. 岡山県総合畜産センター研究報告, 14: 35-40. 2003.
- 17) Hirata T., et al. *Journal of Reproduction and Development*, 53: 171-177. 2007.
- 18) Hirata T., et al. *Journal of Reproduction and Development*, 54: 346-351. 2008.
- 19) 社団法人畜産技術協会. 胚の衛生的取り扱いマニュアル (IETSマニュアル第3版), 164-167. 東京. 2001.
- 20) Tohei A., et al. *Journal of Veterinary Medical Science*, 63: 45-50. 2001.
- 21) Adams G.P., et al. *Journal of Reproduction and Fertility*, 94: 177-188. 1992.
- 22) Kaneko H., et al. *Journal of Reproduction and Development*, 41: 311-320. 1995.
- 23) Bungartz L., et al. *Journal of Reproduction and Fertility*, 101: 583-591. 1994.
- 24) Lima W.M., et al. *Animal Reproduction Science*, 100: 364-370. 2007.
- 25) Argov N., *Theriogenology*, 61: 947-962. 2004.
- 26) Kawamata M. *Journal of Veterinary Medical Science*, 56: 965-967. 1994.
- 27) Sasamoto Y., et al. *Japanese Journal of Veterinary Research*, 51: 151-159. 2004.
- 28) 作田直之ら. 第22回東日本家畜胚移植技術研究会大会要旨集, 24-25. 2006.
- 29) 居在家義昭ら. 中国農業試験場報告, B29: 9-16. 1986.

## 竹林伐採跡地における整備方法・草地化技術および放牧の検討

飯島久実<sup>1)</sup> 安田康明 来間正展<sup>1)</sup>

要約 放牧による竹林拡大防止と放牧可能地面積の拡大を目的とし、肉用繁殖雌牛を竹林に放牧するための整備方法・草地化技術の確立および竹林拡大防止効果の解明に取り組んだ。

土壌表層の処理の違いによる化学性調査の結果、土壌のpHは、焼却区が6.9と最も高くなり、他の区は4.6~4.9と酸性を示した。また、交換性塩類についても焼却区が極めて高い値であった。

センチピードグラスの播種後1年目の被度は、焼却区において10月が62%と最大になり、同期の焼却区39.3%と比較して高いことが認められた。さらに、12月の調査では、土壌表層を焼却した区において35.0%と無焼却区17.0%と比較して高いことが継続して認められた。

放牧牛の飼料と見込まれるタケノコおよび竹葉を飼料分析した結果、タケノコの粗蛋白質は18%~22%、竹葉は14%~15%であった。

伐採後に放牧を実施した場合、再生竹の発生は認められなかった。

以上のことから竹林伐採後はリター焼却処理後のセンチピード播種が草地化に有効であり、再生竹の抑制には放牧が有効であると推察された。

キーワード：放牧 竹林 センチピードグラス

近年、管理放棄された竹林が里山の林地や耕作地に侵入・拡大し農業生産に支障をもたらしており、竹林の拡大防止対策と有効活用が喫緊の課題となっている<sup>1)</sup>。竹林は伐採した後も根に蓄えられた養分を利用して再生するため、数年間にわたる継続的な伐採が必要であり、対策が苦慮されている。

一方、畜産においては、従来から肉用繁殖牛による小規模放牧や耕作放棄地を活用した島根型放牧が推進されており、放牧面積、頭数ともに増加傾向にある。また、新たな取り組みとして、中山間地域等直接支払協定集落や集落営農組織等の地域組織が主体となり、農地の保全部と経営に放牧を取り入れた資源活用型農業を目指すことを目的として、耕作放棄された水田・林地、転作田等の地域資源を活用した島根型放牧も展開されている。

そこで、牛の放牧に着目し、放牧による竹林拡大防止と放牧可能地面積の拡大を目的とし、肉用繁殖雌牛を竹林に放牧するための整備方法・草地化技術の確立および竹林拡大防止効果の解明に取り組んだ。

### 材料および方法

試験1 土壌表層の処理が被土に与える影響およびセンチピードグラスの発育に与える効果

試験地は大田市と浜田市の2か所とした(表1)。

試験地の気象条件および竹林の状況について表2および表3に示した。大田市では竹林伐採後に土壌表層を焼却処理した区(焼却区)と無焼却区を、浜田市ではリターかく乱区(かく乱区)と無かく乱区において、2007年5月および7月にセンチピードグラス1kg/10aを播種した。なお、施肥は試験期間を通じ行わなかった。播種後1年目調査は、大田市では2007年8、10、12月の計3回、浜田市では2007年9、11月の計2回実施した。

試験2 竹葉およびタケノコの飼料分析

竹葉および発生したタケノコの飼料成分の分析を常法<sup>4)</sup>により行った。分析項目は、粗蛋白質、酸性デタージェント繊維(ADF)、中性デタージェント繊維(NDF)とした。

試験3 伐採後の植生調査と放牧による竹林伐採跡地の再生抑制確認

植生の調査は1ヶ月ごとに1m<sup>2</sup>の固定コドラートを用いて行った。伐採時期を冬季(大田市2006年1~2月)または夏季(浜田市2007年6月)とし、片野田ら<sup>2)</sup>にならい、竹およびササ様の形態を示す小型の再生竹(ササ様再生竹)の発生状況を調査した。

大田市および浜田市の試験地2箇所において肉用繁殖牛を放牧した。放牧期間中の入退牧は、草高お

よび牛の状態を目視することで判断した。大田市では放牧期間は2007年4月7日～2008年12月31日まで、浜田市では2007年6月29日～9月27日、10月20日～11月28日、2008年4月23日～7月18日、9月3日～12月4日までとした。放牧頭数は2頭としたが、浜田市では11月18日～12月4日までは3頭となった(表1)。放牧牛の状態確認の目的で2008年4月、7月、10月に胸囲測定と血液生化学検査を行った。伐採後のモウソウチク林を放牧区と無放牧区に区分し竹の再生本数について2007年11月～12月および2008年11月～12月に調査し、放牧が竹の再生に及ぼす影響を調査した。

結 果

試験 1

土壌のpHは焼却区が6.9と最も高くなり他の区は4.6～4.9と酸性を示した。また、交換性塩類についても焼却区が極めて高い値を示した。リターかく乱区においては交換性塩類が高く、特に交換性石灰で約2倍の高い値となった(表4)。

センチピードグラスの播種後1年目の被度は、焼却区において10月が62%と最大となり、同期の無焼却区39.3%と比較して高く、草丈も、同様に焼却区の10月が36.2cmと最大となり、無焼却区29.6cmに比較して高かった(表5)。さらに、12月の調査における被度は、土壌表層を焼却した区において、35.0%と無焼却区17.0%と比較して高いことが継続して認められた。一方、リターかく乱区は播種後1

表1 試験地の概要

試験地	面積(a)		前歴	放牧期間		放牧頭数 (頭)	延べ放牧頭数 (頭)	放牧強度 (頭数*日/10a)
	全体	うち竹林伐採跡		開始日	終了日			
大田市 (小山放牧地区)	186.4	2.5(2007)	杉林	2007/4/7	2007/12/31	264	2	67.6
		5.0(2008)		2008/1/1	2009/1/1	366	2	
浜田市 (弥栄町)	52.1	9.3(2007)	畑	2007/6/29	2007/9/27	90	2	49.5
				2007/10/20	2007/11/28	39	2	
				2008/4/23	2008/7/18	86	2	71.4
				2008/9/3	2008/11/18	76	2	
	13.3(2008)		2008/11/18	2008/12/4	16	3	372	

表2 試験地の気象条件

試験地	降水量 (mm)	平均気温 ( )	最高気温 ( )	最低気温 ( )	年間日照量 (時間)	最深積雪* (cm)
大田市	1671	15.9	36.2	-1	1721.8	-
浜田市弥栄町	1931	13.1	34.1	-6.2	1538.9	19

\*: 大田市は観測なし

表3 試験地の竹林の状況

試験地	斜度 ( )	稈長 (m)	胸高直径 (cm)	本数 (100m <sup>2</sup> )	リター量 (乾物g/m <sup>2</sup> )	リター厚 (cm)
大田市	28.0	1.54	10.6	86	785.0	3.7
浜田市弥栄町	6.0	1.27	9.8	128	695.5	3.4

表4 試験地土壌の化学性

試験地	試験区	pH (H <sub>2</sub> O)	全窒素 (%)	全炭素 (%)	C/N	有効態リン酸 (mg/100g乾土)	交換性カリ (mg/100g乾土)	交換性苦土 (mg/100g乾土)	交換性石灰 (mg/100g乾土)
大田市	焼却区	6.9	0.5	5.3	11.6	81.0	339.6	174.4	230.2
	無焼却区	4.9	0.2	5.6	24.0	4.5	31.6	53.5	142.4
浜田市	かく乱区	4.6	0.6	7.7	13.1	6.8	87.4	31.0	112.8
	無かく乱区	4.8	0.6	6.7	12.0	4.6	53.8	21.4	65.8

表5 土壌表層の処理が被度に及ぼす影響 (焼却処理)

試験区	調査時期 (2008年)	センチピードグラス		裸地
		被度(%)	草丈(cm)	被度(%)
焼却区	8月	17.0	24.1	32.0
	10月	62.0	36.2	22.5
	12月	35.0	-	25.0
無焼却区	8月	11.5	15.9	14.0
	10月	39.3	29.6	15.0
	12月	17.0	24.0	11.0

試験地：大田市、播種日：2007年5月、播種量：2 kg/10a

表6 土壌表層の処理が被度に及ぼす影響 (リターかく乱)

試験区	調査時期 (2008年)	センチピードグラス		裸地
		被度(%)	草丈(cm)	被度(%)
かく乱区	9月	7.5	8.7	70.0
	11月	12.0	18.7	15.0
無かく乱区	9月	7.0	8.8	75.0
	11月	16.5	17.9	17.5

試験地：浜田市、播種日：2007年7月、播種量：2 kg/10a

表7 竹葉、再生竹およびタケノコの飼料成分 (乾物中%)

	粗蛋白質	NDF	ADF	カロテン
竹	14.0	67.3	31.5	249.5
再生竹	15.2	67.1	31.7	116.2
タケノコ	20.8	60.1	29.5	ND

カロテン：乾物中 mg/kg

年目の被度および草丈とともに無かく乱区と比較するといずれも低く、かく乱による効果は確認できなかった(表6)。

#### 試験2

竹葉の飼料成分は粗蛋白質は14%、NDFは67.3%、ADFは31.5%、カロテンは249.5mg/kgとなり、再生竹葉も粗蛋白質は15.2%、NDFは67.1%、ADFは31.7%、カロテンは116.2となった。タケノコは粗蛋白質20.8%と竹葉より高く、NDFは60.1%、ADFは29.7%とそれぞれ竹葉より低い値であった(表7)。

#### 試験3

放牧強度は、浜田市の2007年が最も低く47.5、次いで大田市が67.6、最も高かったのが2008年の浜田市で71.4となった(表1)。

2007年11月～12月の調査では、ササ様再生竹の本数は冬季伐採した大田市の放牧区において42本/25m<sup>2</sup>、6月に伐採した浜田市の放牧区では91.7本/25m<sup>2</sup>確認された。また、その草高は、それぞれ39.7cm、72.6cmであった。2008年11月～12月の調査においても、両区ともほぼ同様の調査結果であったが、浜田市の放牧区の草高は14.3cmと低い値であった。成竹の発生本数は大田市の無放牧区では11本/25m<sup>2</sup>、放牧区では成竹の発生は認められなかった。同様に、浜田市の無放牧区では9.7本/25m<sup>2</sup>、一方、放牧区では成竹の発生は認められなかった(表8)。放牧牛4頭の検査結果、7月の検査において牛 大田市

表8 伐採後の竹の植生と放牧が竹の再生に及ぼす影響

試験地	伐採時期	調査年月日	試験区	成竹	ササ様再生竹	
				(本/25m <sup>2</sup> )	(本/25m <sup>2</sup> )	草高(cm)
大田市	2007年 1～2月	2007年	放牧区	0	42	37.9
		11～12月	無放牧区	11	0	-
		2008年	放牧区	0	42.3	34.0
		11～12月	無放牧区	11.0	0	-
浜田市	2007年 6月	2007年	放牧区	0	91.7	72.6
		11～12月	無放牧区	0	-	-
		2008年	放牧区	0	87.2	14.3
		11～12月	無放牧区	9.7	0	-

表9 放牧牛の検査成績 (2008年)

項目	胸囲(cm)			Tcho(mg/dl)			Alb(g/dl)			Ht(%)			GOT(IU/l)		
	4月	7月	10月	4月	7月	10月	4月	7月	10月	4月	7月	10月	4月	7月	10月
牛															
大田市1	186	185	181	86	67	102	3.6	3.2	3.6	41	30	40	77	62	74
大田市2	180	175	175	104	68	145	3.4	3.3	3.3	38	33	32	104	67	56
浜田市1	176	190	195	92	95	101	3.3	3.2	3.6	31	35	42	60	96	69
浜田市2	167	184	191	75	78	111	3.4	3.4	3.6	34	41	41	60	60	62

2の胸囲、Tchoが低下し牛 大田市1および2のHtの低下が認められたが、浜田市の2頭は胸囲、Tcho、Alb、Ht、GOTはほぼ変化無く推移した(表9)。

## 考 察

落葉広葉樹林の林床においても、リターの焼却によりシバの生育が促進されることが報告<sup>3)</sup>されている。竹林においても、落葉・落枝の焼却に伴う土壌pHの改善と養分の還元効果により、センチピードグラスの発芽および生育が促進されたものと考えられたことから、竹林伐採後の草地造成において、リターの焼却処理が有効であると思われた。今回の試験ではリターかく乱の効果は認められなかった。また、両無処理区においてもセンチピードグラスの被度割合、草丈とも浜田市が低い値であったが、浜田市におけるセンチピードの播種が大田市に比較して2か月遅かったことが影響していたと考えられた。土壌成分の比較においても焼却処理が有効であることは明らかであり、焼却処理は、伐採後のセンチピードグラスによる草地化に有効と思われた。

飼料分析の結果、タケノコは粗蛋白質率が20%程度、また竹葉も14%程度と高く、タケノコはイタリアンライグラス再生草出穂前と、竹葉はイタリアンライグラス1番草出穂前とほぼ同等であり、粗飼料として有用と考えられた<sup>7)</sup>。ただし、タケノコはNDFが低めであることから飼料設計には注意が必要であろう。今回、竹葉量の調査は実施していないが、伐採後の竹葉の飼料としての利用は有効と思われた。さらに、大田市の再生竹葉の分析結果から竹葉は冬季でも粗蛋白質およびカロテンが高いことから、周年放牧において冬季の飼料として活用が可能であると思われた。

竹林伐採後の放牧では再生竹が認められなかったことから、伐採後の竹林抑制に有効であることが示唆された。さらに、タケノコや竹葉および再生竹葉の飼料成分結果から牛の粗飼料として利用できることが明らかとなった。しかし、タケノコや竹葉を飼料として継続して利用するならば、伐採後に残った地下茎からササ様再生竹が発生し、放置すれば将来

は竹林再生につながることから、数年にわたる継続的な放牧が必要と思われる。大賀ら<sup>5)</sup>は豚を放牧した場合もタケノコの採食や踏圧により、放牧期間中は再生タケノコの発生が抑制されたが、放牧終了後および翌年の発筍期においてタケノコが発生するため毎年の放牧が必要であると報告している。今回の放牧では竹林以外の放牧面積が大きく、牛の状態は目視のみの確認としたが、特に問題は認められなかった。太田ら<sup>6)</sup>はタケノコの嗜好性は良好であるが、タケノコの発生量が季節によって異なるので、荒廃農地などを含めて採食量を確保する必要があり、竹林の牧養力は、放牧密度や皆伐前の竹林の叢生密度、皆伐後の経過年数、タケノコの種類等により変化し、加えて、放牧牛は事前にタケノコによる馴致飼育が必要であると報告している。従って、繁殖牛を竹林に放牧するための条件として、タケノコを飼料として馴致させることは必須であると思われた。

放牧牛の検査では、大田市試験区の放牧牛で7月に胸囲、Tcho、Htの値がやや低下した個体が認められたが、家畜共済における臨床病理検査要領<sup>8)</sup>の正常範囲と比較して概ね正常な値であり、竹の再生を抑制しながら適正な放牧が可能になったことが明らかとなった。

竹林伐採後リターを焼却草地化し、放牧により竹の再生を抑制することで、里山の再生と環境保全維持が可能であると考えられた。

## 参 考 文 献

- 1) 伊藤孝美ら；大阪府立食とみどりの総合技術センター研究報告, 41: 11-18, 2005
- 2) 片野田逸朗ら；九州農林研究, 58: 63-66, 2005
- 3) 大谷一郎ら；日草誌, 48(1): 17-21, 2002
- 4) 自給飼料品質評価研究会, 自給飼料の品質評価ガイドブック, 2001
- 5) 大賀友英ら；山口県畜産試験場報告, 22: 25-30, 2007
- 6) 太田典宏ら；京都畜技セ試研成績, 5: 39-47, 2009
- 7) 日本標準飼料成分表, 2001
- 8) 家畜共済における臨床病理検査要領, 2005

# 稲ワラロールベールサイレージの発酵品質改善と給与による生乳生産性への影響

布野秀忠 岩成文子 安田康明

要約 搾乳牛への稲ワラ給与を目的として、コンバインから排出された直後の稲ワラについてサイレージ調製試験と稲ワラサイレージの給与試験を行った。材料の稲ワラは、飼料作物用自走式ロールベラーを用いて乳酸菌添加（添加区）と無添加（無添加区）2種類のサイレージを調製して発酵品質を比較した。そして、通常給与している混合飼料（TMR）を対照区とし、対照区TMRのチモシー乾草の一部を調製した稲ワラサイレージに置換して乾物中に6%混合した飼料を試験区として給与試験を実施した。また、あわせて、コスト低減効果についても検討した。

発酵品質のpHは添加区が4.52、無添加区が5.24となり有意差（ $P < 0.05$ ）を認めた。また、乳酸含有率は、添加区が0.53%、無添加区が0.43%、酢酸含有率は、添加区が0.06%、無添加区が0.01%で、いずれも添加区が高い値を示した。

給与試験の結果は、産乳成績および血液性状に試験区間の有意な差が認められなかった。また、高泌乳牛への影響を検討するため、日乳量30kg以上の搾乳牛を抽出して試験成績を比較したが、すべての項目において試験区間の有意差は認められなかった。

今回調製した稲ワラサイレージの調製コストは、原物1kg当たり21円であった。この単価を用いたTMRの飼料費評価指数は、対照TMR100に比較して96となりコスト低減の可能性が示唆された。

キーワード：稲ワラサイレージ 乳酸菌 コスト低減

稲ワラは、島根県農畜産振興課の調査結果では年間約11万t発生すると推定されている。しかし、畜産利用は、その内約2万t程度に過ぎない。利用されていない稲ワラを飼料として給与できれば、飼料自給率の向上や生乳生産コストの低減効果が大きいと考えられる。

畜産利用は、稲ワラを主に肉用牛の飼料や敷料として活用している。しかし、稲ワラ調製作業が重労働であることやコンバインによる刈り取りが主流になったことから、稲ワラ調製を中止する稲作農家が増加し、年を追う毎に生産が減少している。

一方、近年の飼料作物生産ではロールベラー等による専用収穫機械体系が導入されている。この体系では、飼料調製作業が短期間で行えることから省力化が図れ、降雨による品質低下も防ぐことができる。収穫した作物は、サイレージ化することにより長期間給与が可能である。

牛への給与を目的とした稲ワラの調製方法として、サイレージ調製の報告が以前から数多く行われている。日本飼料成分表にもあるとおり、乾燥稲ワラと比較して生稲ワラは粗蛋白質や可消化養分総量がやや高く、サイレージ化することにより乳用牛の嗜好性が向上する報告<sup>1)</sup>もある。しかし、稲ワラをサイ

レージ化する場合には、含有する可溶性炭水化物（WSC）が低いことから良好な発酵が期待できず、保存性の問題が指摘されていた<sup>2,5)</sup>。この問題点に対して、最近、飼料稲ホールクロップサイレージの発酵改善を目的とした乳酸菌が開発され、WSCが低い作物でも乳酸発酵の促進が可能となった<sup>3)</sup>。これらの技術を活用すれば、食用米や飼料米の副産物である稲ワラをサイレージ化し、搾乳牛への給与が可能であると考えられる。

本試験では、搾乳牛への給与を目的として、コンバインから排出された切断生稲ワラを飼料作物用自走式ロールベラーにより収集し、稲ワラサイレージの保存性向上を図るため、乳酸菌添加による調製を検討した。そして、調製した稲ワラサイレージはTMRの原料として混合給与し、生乳生産性へ与える影響について調査した。また、稲ワラサイレージ調製コストを試算して給与と飼料のコスト低減効果を検討した。

## 材料および方法

### 1 稲ワラサイレージの調製

稲ワラサイレージは、平成21年に県内農家で栽培された食用稲（品種：きぬむすめ）をコンバインで

脱穀、細断された直後の稲ワラを、飼料作物用自走式ロールペーラ（平成2年式 立山製RB751型）により梱包し、ペールラッパーで6層にラップしてロールペールサイレージ（以下「稲ワラRBS」という。）とした。

発酵試験には、調製時に乳酸菌を噴霧した添加区と乳酸菌を噴霧しない無添加区を設定し、9月から10月の間に2種類の稲ワラRBSを調製した。乳酸菌は、「畜草1号」乳酸菌製剤（雪印種苗㈱、以下「乳酸菌」という。）をロールペーラに装着したスプレー添加装置により原物稲ワラ当たり0.0005%に設定して噴霧した。調製した稲ワラRBSは、調製後2ヶ月以上経過したものを開封し、化学分析および給与試験に供した。

## 2 化学分析

稲ワラRBSは、給与試験に用いるためTMR調製の前日に開封し、分析に供する必要量をサンプリングして発酵品質および飼料成分分析の試料とした。飼料成分分析は、60 18時間通風乾燥し、粉碎機で1 mmに粉碎して、一般成分を品質評価ガイドブック<sup>4)</sup>に基づき分析した。発酵品質は、品質評価ガイドブックに基づき抽出したる液のpHをガラス電極pHメーターで測定し、ガスクロマトグラフィー（GC-14A、島津製作所）により乳酸および酢酸、プロピオン酸、酪酸の揮発性脂肪酸（VFA）を測定した。

## 3 給与試験

供試牛は、繋養しているホルスタイン種搾乳牛15頭（表1）を用いた。試験期間は、平成21年11月16日から平成22年4月28日にかけて、馴致期間10日間、予備試験29日間、本試験3日間の計42日間を1期とし、クロスオーバー法により実施した。

試験区分は、通常給与している慣行TMRを対照区とし、試験区は、慣行TMRに混合しているチモシー乾草の一部を、乳酸菌添加稲ワラRBSに置換した。置換した稲ワラRBSは乾物当たり6%で栄養成分は表2に示した。また、各区のTMR配合割合および設定した栄養成分は表3に示すとおりである。

給与方法は、原則自由採食として1日に必要な給与量を3回に分け10時、13時、15時に給与した。

各区の乾物摂取量については、給与時にサンプリングした飼料の乾物率を求め、試験区ごとに本試験期間中毎日9時に飼料残量の全量を秤量し、乾物給与量から差し引いて求めた。

本試験期間中の3日間において、乳量は、毎朝夕の搾乳時に測定し、乳成分率（乳脂率、乳蛋白率、

表1 供試牛の概要

供試頭数 (頭)	初産 (頭)	2産以上 (頭)	平均分娩後日数 (日)
15	4	11	171

表2 供試した稲ワラRBSの飼料成分（乾物中%）

乾物率	粗蛋白質	粗脂肪	粗灰分	NDF
47.0	4.0	2.3	16.8	69.4

表3 供試TMRの飼養配合割合と養分含量（設定値）

	対照区	試験区
飼料配合割合（乾物中%）		
稲わらサイレージ	-	6.3
チモシー乾草	24.2	12.9
アルファルファ乾草	22.2	24.1
ビートパルプ	3.9	5.8
コーン	17.2	17.9
大麦	9.9	9.9
大豆粕	4.4	4.9
コーングルテンフィード	12.0	12.0
綿実	6.2	6.2
養分含量（乾物中%）		
粗蛋白質	16.0	14.1
粗脂肪	4.0	3.4
NDF	39.8	40.8
NFC	36.5	37.3

供試飼料は加水して水分含量約40%としてTMR給与

乳糖率）は、搾乳時に採取した乳汁サンプルを、島根県畜産振興協会生乳検査所に分析依頼した。なお、乳中尿素態窒素（MUN）は、生化学自動分析装置（DRI-CHEM3000 富士フィルム）で測定した。

採血は、試験区終了日の14時に行い、ヘマトクリット、総蛋白、アルブミン、GOT、GGT、総コレステロール、尿素窒素、カルシウム、リンについて生化学自動分析装置で測定した。

## 4 飼料コスト評価

稲ワラRBS調製にかかる経費は、必要な諸材料費の合計と調製用機械およびその減価償却費、労賃を勘案し1 kg当たりの単価を算出した。また、対照区TMR原物1 kgの調製にかかる経費を100として、試験区TMR原物1 kgかかる経費を算出し飼料費評価指数として比較した。

## 5 統計分析

発酵品質は分散分析を行い、給与試験は試験区を変動要因とした最小自乗分散分析を実施した。また、

表4 稲ワラサイレージの発酵品質

区分	個数 (個)	水分 (%)	pH	有機酸含量 (FM%)			
				乳酸	酢酸	酪酸	プロピオン酸
添加区	7	54.3	4.52 <sup>a</sup>	0.53	0.06	nd	nd
無添加区	4	52.5	5.24 <sup>b</sup>	0.43	0.01	nd	nd

分散分析を実施。

異符号間に有意差を認める (p < 0.05)

高泌乳牛への影響を確認するため、各区から日乳量30kg以上泌乳する供試牛の試験成績を抽出して、最小自乗分散分析を実施した。

### 結 果

#### 1 稲ワラRBS発酵品質

発酵品質の分析結果は表4に示した。pHは、添加区4.52に対し、無添加区5.24となり試験区間に有意差 (P < 0.05) を認めた。乳酸含有率は、添加区が0.53%、無添加区が0.43%、酢酸含有率は、添加区が0.06%、無添加区が0.01%で、いずれも添加区が高い値を示したが、試験区間に有意差は認められなかった。また、プロピオン酸および酪酸は各区とも検出されなかった。なお、稲ワラRBSの解体時に両試験区とも糸状菌の増殖が見られた。

#### 2 給与試験成績

給与試験の結果を表6に示した。乾物摂取量は、対照区が25.6kg/日、試験区が24.4kg/日で、乳量は、対照区が28.2kg/日、試験区が29.7kg/日で試験区間に有意な差は認められなかった。また、乳成分率、MUN、血液性状においても試験区間に有意な差は認められなかった(表5、6)。

日乳量30kg以上泌乳した供試牛は各区8頭であり、その産乳成績を表7に示した。乾物摂取量は、対照区が25.9kg/日、試験区が24.4kg/日、乳量は、対照区が35.5kg/日、試験区が37.6kg/日で試験区間に有意差は認められず、乳成分率についても試験区間に有意差は認められなかった。

#### 3 コスト評価

稲ワラRBS調製費用は表8に、飼料費評価指数は表9に示した。稲ワラRBSの原物1kg当たり調製費用が21円と算出され、この単価を用いて稲ワラRBSを混合した試験区TMRの飼料費評価指数は、対照区TMRの100に対し96となった。

### 考 察

稲ワラは、安定確保できる豊富な地域自給粗飼料であり、飼料自給率の向上を図る上からも積極的な

表5 乾物摂取量、乳量、乳成分組成

	対照区	試験区
供試牛(頭)	15	15
乾物摂取量(kg/日)	25.6	24.4
乳量(kg/日)	28.2	29.7
FCM(kg/日)	31.1	31.6
乳成分率(%)		
乳脂率	4.7	4.5
乳タンパク率	3.8	3.8
乳糖率	4.5	4.5
乳中尿素態窒素濃度(mg/dl)	12.5	12.9

値は最小自乗分散分析による平均値

表6 血液性状

	対照区	試験区
ヘマトクリット(%)	32.6	30.9
総タンパク質(g/dl)	7.8	7.4
アルブミン(g/dl)	3.7	3.7
GOT(IU/l)	108.7	112.7
GGT(IU/l)	34.4	36.3
t-cho	253.8	241.6
尿素窒素(mg/dl)	13.1	13.2
Ca(mg/dl)	10.3	10.4
IP(mg/dl)	4.8	5.3

値は最小自乗分散分析による平均値

表7 乳量30kg以上供試牛の乾物摂取量、乳量、乳成分成分

	対照区	試験区
供試牛(頭)	8	8
乾物摂取量(kg/日)	25.0	23.9
乳量(kg/日)	27.3	28.5
FCM(kg/日)	36.7	37.4
乳成分率(%)		
乳脂率	4.2	4.0
乳タンパク率	3.6	3.4
乳糖率	4.6	4.7
乳中尿素態窒素濃度(mg/dl)	12.5	12.7

値は最小自乗分散分析による平均値

表8 稲ワラサイレージ調製コスト

項 目	
1 ロール重量 (kg)	128.0
10a 当たりロール調製個数 (個)	4.2
10a 当たりロール調製生産費 <sup>1)</sup> (円)	11,244
生産単価 (円/kg)	21.0

1) 生産面積を10haと設定し、機械はグリッパー、ラッピングマシンを新規に導入するとして減価償却を試算した。労賃は800円/時間、運搬費は1,000円/10aとして設定した。

表9 飼料費評価指数

	対照区	試験区
指数 (飼料費 (円/kg))	100(29.5)	96(28.3)

注) 試験区に用いた稲ワラサイレージの価格は21円/kgとして試算。

利用を図る必要がある<sup>8)</sup>と考えられる。搾乳牛に稲ワラを給与する場合は、し好性と保存性を高めたサイレージが有効<sup>1)</sup>であるが、含有するWSCが少ないことからサイレージ調製しても乳酸発酵が抑制され、pHが高く良質な発酵品質が期待できない<sup>2,5)</sup>と指摘されていた。

近年、飼料作物から分離されたグラム陽性菌の乳酸菌で、グルコースからガスを生産せず、低pH領域で育成する飼料稲専用乳酸菌「畜草1号」が開発された<sup>3)</sup>。この乳酸菌は飼料稲サイレージの調製時に添加することにより、乳酸発酵を促進し、pHが低下することから貯蔵性が向上すると報告されている<sup>10)</sup>。また、稲ワラサイレージの調製でも「畜草1号」を添加することにより、糸状菌の増殖が見られない良質なサイレージの調製が可能であると報告もある<sup>11,12)</sup>。本試験では、飼料作物用自走式ロールベラーを用いて、コンバインから排出された切断稲ワラに、この「畜草1号」を添加したサイレージ調製を行った。その結果、既存の報告と同様に発酵品質は、pHが無添加に比較し有意に低く、乳酸含有の高い稲ワラRBSの調製が可能であることが明らかになった。

しかし、乳酸菌を添加した稲ワラRBSにも糸状菌の増殖が見られた。これは、ラップの巻き数が6層巻きの設定では少なく、屋外保管中に降雨が影響したことから、調製時の泥の混入もあったためと考えられた。今後、飼料作物用自走式ロールベラーで稲ワラRBSを調整する場合には、ラップの巻き数を増やすことや泥が混入しない梱包方法を検討する必要がある。

搾乳牛への給与については、山口らが泌乳中・後期の搾乳牛に対して稲ワラサイレージをTMR中に乾物当たり10%混合しても泌乳生産性や栄養代謝に悪影響を与えないと報告している<sup>6)</sup>。また、藤井らは、泌乳中期においてTMRに混合する稲ワラ量を乾物当たり16%にすると乳蛋白率の低下に影響を与えるが、乳量、乳脂肪率、無脂固形分率には影響が見られないと報告している<sup>7)</sup>。本試験では、調製した稲ワラRBSを給与飼料中に乾物当たり6%混合し、給与開始時の分娩後日数が50から517日の乳用牛15頭に給与して、生乳生産成績および血液性状を検討した。その結果、試験区間に有意な差は認められず、既存の報告と同様な結果であった。

また、柿原らは、日乳量30kg以上の搾乳牛に対し稲ワラを給与する場合、総繊維を40%までにとどめ、乾物当たりでは8%までであれば乳量低下は抑制されると報告している<sup>8)</sup>。そこで、日乳量30kgの供試牛の試験成績を抽出して最小自乗分散分析を行った結果、試験区は平均乾物摂取量が24.4kg、平均日乳量が37.8kgであり、乳成分率を含め有意差は認められず、生乳生産性への影響はないことが明らかとなった。しかし、稲ワラはリグニンとケイ酸含有量が高く、これらが第一胃内微生物の消化作用を抑制する障害物となる<sup>8)</sup>ことや、稲ワラなどの消化性の低い粗飼料は、採食量に大きく影響すること<sup>9)</sup>が知られている。このことから、稲ワラを給与する場合には混合割合や切断長を十分考慮する必要がある。

さらに、稲ワラRBSの経済性を評価するため、調製のコストを試算した結果、21円/kgと試算された。この単価を用いた稲ワラ混合TMRの飼料費評価指数は慣行TMRを100とした場合96と評価され、TMRに混合するチモシー乾草の一部を稲ワラRBSに置換することにより飼料コスト低減の可能性が示唆された。

以上のことから、飼料作物用自走式ロールベラーを用いた稲ワラサイレージの調製においては、乳酸菌添加することにより発酵品質を良好に維持し、保存性が向上すること。TMR方式で乾物中に6%の稲ワラRBSを混合し、泌乳最盛期後の日乳量30kgの泌乳牛へ給与しても生乳生産性に与えるマイナス影響はなく、飼料コストの低減も期待されることが明らかとなった。

県内の一般的な酪農経営の飼養管理形態は、輸入飼料に大きく依存しており、昨今の飼料価格の変動による生乳生産コストの急変が酪農経営に大きな影響を与えている。稲ワラは、安定的に確保できる地

域自給粗飼料であり、これらの技術を活用すれば、飼料価格の変動に起因する生産コスト上昇の抑制が可能であると考えられる。また、低利用資源である稲ワラを利用し、コントラクター等の飼料生産組織が飼料RBS調製を担い、酪農家からは堆肥を水田に還元すれば、耕種農家と酪農家を結ぶ耕畜連携の発展につながると思われる。

#### 参 考 文 献

- 1) 高橋英伍ら . 農作業研究, 17: 13-19, 1973.
- 2) 木部久衛. 日本草地学会誌, 19: 101-106, 1973.
- 3) 蔡 義民ら . 日本草地学会誌, 49(5): 477-485, 2003.
- 4) 日本草地畜産種子協会 . 粗飼料の品質評価ガイドブック, 東京 . 1994.
- 5) 萬田富治ら . 草地試験場研究報告, 12: 92-97, 1978.
- 6) 山口悦司ら . 兵庫県立農林水産技術総合センター研究報告, 46: 22-27, 2010.
- 7) 藤井俊治ら . 島根県立畜産試験場研究報告, 23: 18-24, 1988.
- 8) 柿原孝彦ら . 福岡県農業総合試験場研究報告, 18: 114-117, 1999.
- 9) 永西 修 . 日本草地学会誌, 48(4): 371-378, 2002.
- 10) 豊川好司ら . 日本草地学会誌, 21(1): 42-46, 1975.
- 11) 除 春城ら . 日本草地学会雑誌, 52(3): 166-169, 2006.
- 12) 蔡 義民 . 日本獣医学会報告, 80(3): 386-389, 2009.

## 発行責任者

所 長 多久和 正

## 編集委員

生産技術部長	宇谷道弘
育種改良部長	森脇秀俊
肉用牛グループ科長	土江博
酪農・環境グループ科長	安田康明
繁殖技術グループ科長	岡崎尚之
しまね和牛改良グループ科長	北村千寿

Director: Tadashi TAKUWA

Assistant Director: Michihiro UTANI

Assistant Director: Hidetoshi MORIWAKI

Division Chief of Beef Cattle Production: Hiroshi TSUCHIE

Division Chief of Dairy Cattle・Environment: Yasuaki YASUDA

Division Chief of Reproductive Technology: Takayuki OKAZAKI

Division Chief of Shimane-Wagyu Improvement: Chitoshi KITAMURA

## 島根県畜産技術センター研究報告 第42号

---

平成23年3月 発行

編集兼発行 島根県畜産技術センター  
郵便番号 693 - 0031  
島根県出雲市古志町3775  
電話 (0853) 21 - 2631  
ファックス (0853) 21 - 2632

印刷所 有限会社 ナガサコ印刷  
出雲市下横町350  
電話 (0853) 28 - 2408  
ファックス (0853) 28 - 2401

---