

新潟県農業総合研究所 **研究報告**

JOURNAL OF THE NIIGATA AGRICULTURAL RESEARCH INSTITUTE



No. **20**

MARCH.2023

新潟県農業総合研究所研究報告 第20号

目次

[報文]

1. 基肥の全量を高窒素鶏糞で代替する水稻の減化学肥料栽培
古川勇一郎・今井康貴・土田徹・服部誠・佐藤徹…………… 1
2. ニンジンの根部肥大に対する地温の影響の検討
岸孝二・田崎義孝…………… 9
3. スーダン型ソルガム「涼風」の刈取り時期の違いが収量，飼料成分等に及ぼす影響および家畜を通じた品質評価
清水翔太・小柳渉・平尾賢一・小橋有里…………… 17
4. ウンガラス化卵子由来胚における体外受精後の卵割状況が胚盤胞への発生及び胚移植後の受胎性に及ぼす影響
山家崇・市川雄紀・福留信司・中川浩…………… 23

[ノート]

5. 水稻有機栽培における出穂期後の条間除草による雑草発生量削減効果
大峽広智…………… 31
6. 酢酸ナトリウム抽出とカリウムイオンメーターによる土壤交換性カリの簡易測定法
小柳渉・清水翔太…………… 35
7. おけさ柿及び加工柿の β -クリプトキサンチン含量
太養寺真弓・小林妙子・佐藤和人・佐藤嘉一・中島正晴…………… 38
8. かぐらなんばんに含まれる有用成分の簡易測定法
中島正晴・松岡竜邦・太養寺真弓・中尾令子・相原浩太郎…………… 42
9. 新水稻系統「新潟129号」の玄米粉とこれを用いた麺類の特徴
野呂渉・本間紀之・佐々木朋子・松木順子・宍戸功一…………… 47
10. 村上茶のカテキン類及び遊離アミノ酸含量の調査
相原浩太郎・太養寺真弓・中島正晴・小林妙子・滝澤結友・大源正明・
西脇俊和…………… 52

[報文]

基肥の全量を高窒素鶏糞で代替する水稻の減化学肥料栽培

古川勇一郎・今井康貴・土田徹¹⁾・服部誠・佐藤徹

新潟県農業総合研究所作物研究センター

1) 現在，新潟県農林水産部経営普及課

Rice cultivation in reducing chemical fertilizer alternating all of basal fertilizer with high-nitrogen chicken manure

Yuichiro FURUKAWA, Yasutaka IMAI, Toru TSUCHIDA, Makoto HATTORI and Toru SATO

Niigata Agricultural Research Institute Crop Research Center

要約 基肥の全量を高窒素鶏糞(窒素全量4%以上の発酵鶏糞)で代替し、穂肥には化学肥料を使用する減化学肥料栽培技術について検討した。水稻品種には耐倒伏性が高く、減化学肥料栽培に対する付加価値も期待できる「新之助」を供試し、慣行栽培(化学肥料のみを使用)及び50%減化学肥料栽培(有機質50%入肥料のみを使用)と比較した。その結果、高窒素鶏糞(基肥)+化学肥料(穂肥)の組合せで栽培した場合、慣行栽培と比べて化学窒素成分削減率は60%となり、初期生育の緩速傾向と稈長の伸長傾向があるものの、収量、品質、肥料経費は同等であった。また、50%減化学肥料栽培と比べて、生育、収量、品質、食味は同等以上、肥料経費は半額以下であった。

緒言

有機農業のみならず、有機質資源の循環利用は持続的な営農活動にとって必要不可欠な取組である。みどりの食料システム戦略⁽¹⁾においても、輸入資源や化石燃料を原料とした化学肥料への依存を段階的に引き下げ、有機物の循環利用を促進することの重要性が指摘されている。

有機質資源には多くの種類があるが、農業者に広く利用されるためには、化学肥料と同等の肥料効果を有するだけでなく、肥料経費や入手の容易性も適当でなければならない。その為、普及性の観点から有機質資源による肥料代替を考えた場合、再生有機質資源(有機性廃棄物の再利用)が現実的な選択肢となる。

化学肥料のリンやカリの代替については、各種の堆肥を活用できることが知られており、代替法や代替率等についてはWebサイトでも確認できる⁽²⁾⁽³⁾。一方、化学肥料の窒素成分の代替については課題が多い。主な課題として、一般に有機質資源の窒素含量が少ないこと、含まれている窒素成分も有機態の割合が高く有効化率が低いこと、有効化するまでに時間がかかること、等がある。

再生有機質資源のうち、高窒素鶏糞⁽⁴⁾⁽⁵⁾やバイオガスプラントの嫌気発酵液⁽⁶⁾⁽⁷⁾⁽⁸⁾等は、比較的窒素含量や有効化率が高く、肥効が速効的である。本試験では、入手の容易性や作業性を踏まえ、高窒素鶏糞に注目した(注:高窒素鶏糞は「肥料の品質の確保等に関する法律に基づく表示」における窒素全量が4%以上(現物あたり)の発酵鶏糞の仮称であり、定義された名称ではない)。

養鶏場で排出された鶏糞は、開放攪拌発酵あるいは積上げ切返しによって堆肥化されてきたが、近年では堆肥化の効率化や悪臭の集中管理を主な目的として、縦型密閉発酵装置で堆肥化されるようになってきた。従来法では堆肥化過程で有効態窒素の多くが揮散するため、堆肥化産物である発酵鶏糞の窒素全量は2%程度のもが多かったが、縦型密閉発酵では1週間程度の短期間に定温条件で堆肥化されるため、堆肥化工程前後の水管理等が適当であれば、発酵鶏糞の窒素全量が4%以上となる⁽⁴⁾⁽⁵⁾。さらに、窒素成分の有効化率が高く、肥効も化学肥料ほどではないが速効的であることが確認されている⁽⁴⁾⁽⁹⁾。また、この成分特性を利用して化学肥料の窒素・リン・

カリの代替が試みられ、コシヒカリの有機栽培⁽⁹⁾や無化学肥料栽培⁽⁴⁾において良好な成績が得られている。

ただし、これらの事例⁽⁴⁾⁽⁹⁾では普通肥料（成分含量保証）の高窒素鶏糞が用いられた。肥料経費や入手の容易性を考慮すると特殊肥料（許容誤差は表示成分含量±20%）の高窒素鶏糞を用いることが現実的であるが、その場合、実際の施用窒素成分量に幅があることを前提とした栽培管理が必要になる。また、現物施肥量が多くなるため、基肥施肥はトラクターに装着した肥料散布機等により軽労化できるとしても、穂肥施肥は労力的負担の大きい背負式動力散布機等に頼らざるを得ない、等の課題もある（表1）。

そこで本試験では、作業性を改善して普及性を高めるため、基肥のみを高窒素鶏糞で全量代替し、穂肥には化学肥料を使用する減化学肥料栽培技術について検討した。また、供試品種には、耐倒伏性が高く、減化学肥料栽培に対する付加価値を期待できる「新之助」⁽¹⁰⁾を用いた。

材料及び方法

1. 水稻の栽培概要

新潟県農業総合研究所内の試験水田2筆（斑鉄型グライ低地土、可給態窒素量0.27gN kg⁻¹乾土）において、「新之助」を2017、2019、2022年の3作栽培した。2017、2019年は、表1に記した栽培体系のうち有機質50%区と化学肥料区を対照として高窒素鶏糞区を栽培試験した。2019、2022年は有機質50%区と化学肥料区を対照として高窒素鶏糞（基肥）+化学肥料（穂肥）の組合せ（以下、鶏糞+化肥区）を栽培試験した。2017、2019年は乱塊法で1区25m²の2反復、2022年は乱塊法で1区30m²の4反復の

試験区設計とした。使用した肥料（表1）は地元の農協から入手し、基肥、穂肥とも手散布した。なお、高窒素鶏糞は、F社のペレット成形品（特殊肥料）を用いた。

耕種概要は表2に示した。

2. 生育及び収量調査

移植後翌日までに、各調査区内の連続10株を定点調査株として設定し、植込み本数を株当たり3-4本に手直した。各調査株は草丈と茎数を測定し、処理区毎の平均値を求めた。また、葉緑素計（コニカミノルタ株式会社製：SPAD502plus）を用いて、穂揃期までは第二完全展開葉を、穂揃期以降は止葉を測定対象としてSPAD値を測定し、処理区毎の平均値を求めた。

成熟期調査には、出穂後積算気温1100℃を目安に坪刈試料と中庸4株の抜取標本を用いた。坪刈試料については、穂数計数後に稲架掛乾燥し、脱穀・籾摺後に段別篩により粒厚分布を求め、縦目篩で1.90mm以上の玄米を精玄米重（水分15%換算）とした。また、同精玄米の20g当たりの粒数から千粒重を算出した。さらに、同精玄米の外観品質（農産物検査値ではない）を穀粒判別器（株式会社サタケ製：RGQI 20A（非認定検量線））で、タンパク質含有率（水分15%換算）を食味分析計（静岡製機株式会社製：TM-3500）で分析した。

食味官能試験には搗精歩合91%の精米を用い、炊飯後、試験実施機関職員約20名を被験者として実施した。

標本株については、最長茎の稈長と穂長を計測後、穂数、全粒数を計数し、一穂粒数を算出した。また、全粒を籾摺後、縦目篩で1.90mm以上の玄米を登熟粒として計数し、登熟歩合を算出した。

表1 施肥体系と肥料種類及び施肥量

施肥体系 [†]	肥料種類		表示成分含量 (N:P:K) [‡]		現物施肥量 (kg/10a)		化学窒素成分削減率 (%)
	基肥	穂肥	基肥	穂肥	基肥	穂肥	
高窒素鶏糞	高窒素鶏糞	同左	4:3:2	同左	100	66	100
鶏糞+化肥	高窒素鶏糞	硫安	4:3:2	21:0:0	100	10	60
有機質50%	有機質50%入肥料	同左	10:13:10	12:2:8	30	17	50
化学肥料	塩加磷安	硫安	14:14:14	21:0:0	21	10	0

[†]10a当たりの施肥窒素量は、基肥3kg、穂肥1kg×2回。高窒素鶏糞の窒素有効化率は75%として施肥設計。[‡]現物あたり。

表2 耕種概要

栽培年次	施肥	耕起	荒代	植代	移植 [†]	中干し	落水	穂肥(1)	穂肥(2)	幼形期	出穂期	成熟期	除草剤 [‡]
2017	4/20	4/21	なし	5/04	5/15	6/16-7/03	9/01	7/24	8/02	7/19	8/14	9/28	5/5, 5/24, 6/5
2019	4/28	4/29	なし	5/13	5/16	6/19-7/23	8/30	7/24	7/29	7/18	8/05	9/18	5/20
2022	4/19	4/19	4/27	5/05	5/09	6/10-6/29	9/20	7/22	8/02	7/17	8/10	9/22	5/13, 6/7

[†]稚苗の機械移植で坪50株セット、株当たり3-4本植。[‡]2017: プレチラロール・ベンゾフェナップ水和剤, タイムロン・フェントラサミド・プロモフチド・ヘンズルフロンメチル粒剤, ビリミスルファン粒剤, 2019: イブフェンカルバザン・プロモフチド・ヘンズルフロンメチル粒剤, 2022年: プレチラロール粒剤, ビリフリット・メソリオン・メタジスルフロン粒剤（使用の順に記名）

結果及び考察

1. 生育状況

施肥体系と2019年の「新之助」の生育状況を図1, 2, 3に示した。

稲葉の葉緑素含量 (SPAD 値) は、いずれの処理区においても移植後2週間以降に急上昇し、化学肥料区では6月下旬に、その他3区では7月上旬に最高値を記録した(図1)。水稻の窒素栄養状態 (稲体窒素濃度) は、稲葉の葉緑素含量と相関があることから⁽¹¹⁾⁽¹²⁾⁽¹³⁾、その他3区の窒素吸収の最盛期が化学肥料区よりも遅れたと示唆され、その要因は3区に施肥された有機態窒素の後効きによるものと推定された。ただし、後効きの影響は、肉眼による群落観察で葉色差として認識できる程度ではなかった。

基肥の肥効が切れたと想定される7月上中旬には、いずれの処理区においても SPAD 値が急落し、化学肥料区では32となった(図1)。7月下旬の2回の穂肥に伴って SPAD 値は再び上昇に転じ、その傾きは4処理区で同等であった。ただし、化学肥料区と同様に硫酸を施肥した鶏糞+化肥区で SPAD 値の再上昇が遅れた理由は不明であった。

茎数は、いずれの処理区においても移植後2週間以降に急増し、6月下旬には最高分けつ期を迎え、以降、出穂期まで漸減した(図2)。高窒素鶏糞区と鶏糞+化肥区の茎数増加は、有機質50%区よりも迅速であったが、化学肥料区よりは緩速であった。高窒素鶏糞区と鶏糞+化肥区の茎数は、最高分けつ期頃に差異が見られたが、穂肥1回目の7月24日までは同一の管理であるため(表1)、誤差の範囲と解釈された。こうした調査結果の変動幅を考慮しても、高窒素鶏糞区、鶏糞+化肥区、有機質50%区の3区の最高分けつ期は、化学肥料区よりも遅れたと考えられた。その要因は3区に施肥された有機態窒素の後効きによるものと推定され、葉緑素含量の推移(図1)と一致した。幼穂形成期以降の茎数は、穂肥に硫酸を施肥した化学肥料区と鶏糞+化肥区では漸減に留まった一方、高窒素鶏糞区と有機質50%区では急減した。

以上のことから、本試験で用いた高窒素鶏糞は、化学肥料ほど速効的ではないものの、有機質50%入肥料と同等かそれ以上の肥効を期待できること、穂肥には化学肥料を用いた方が生育を維持・調節しやすいことが確認された。なお、草丈については施肥体系の影響と考えられる差異は認められなかった(図3)。

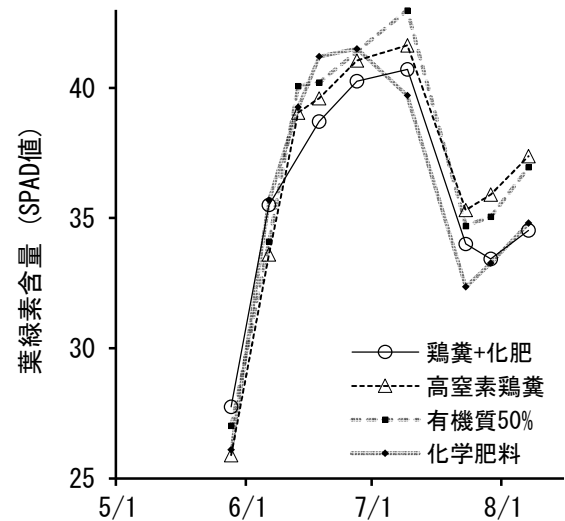


図1 施肥体系が「新之助」の葉緑素含量に及ぼす影響 (n=2, 2019年)

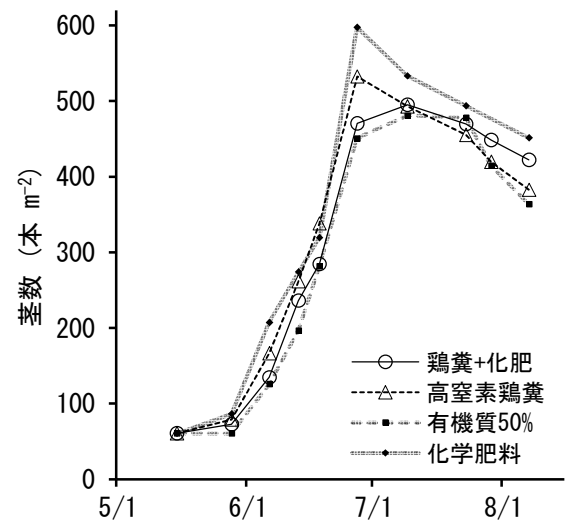


図2 施肥体系が「新之助」の茎数に及ぼす影響 (n=2, 2019年)

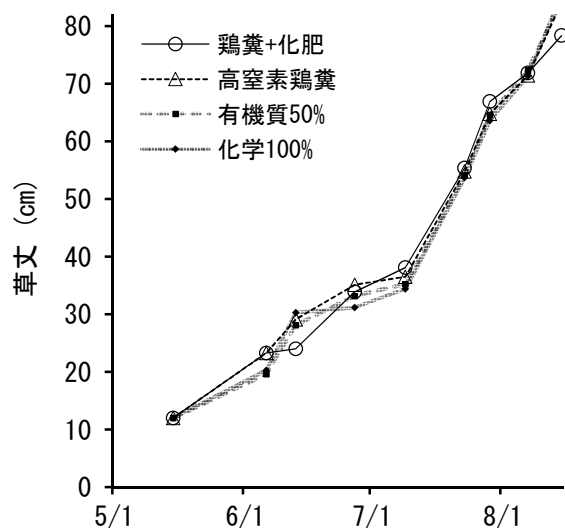


図3 施肥体系が「新之助」の草丈に及ぼす影響 (n=2, 2019年)

2. 収量構成要素と玄米外観品質への影響

基肥と穂肥の全量を高窒素鶏糞で代替した無化学肥料栽培体系が「新之助」の収量構成要素や玄米外観品質の各項目に及ぼす影響を表3,4に示した。

収量構成要素については施肥体系の3処理区間に有意差は検出されず、年次間に、稈長、穂数、千粒重、粒厚で有意差が検出された(表3)。処理間では実質同等の結果であったが、傾向としては次のような特徴を確認できた。「新之助」の品種特性から倒伏は皆無であったが、稈長は化学肥料区よりも高窒素鶏糞区と有機質50%区で伸長する傾向にあった。生育状況(図1,2)においても示唆されたが、高窒素鶏糞区と有機質50%区では窒素の後効きの影響があったと考えられた。穂数は化学肥料区よりも高窒素鶏糞区と有機質50%区で減少する傾向にあり、生育期間の茎数推移(図2)と一致した。したがって、高窒素鶏糞は化学肥料よりも後効き傾向を示すが、収量構成要素に及ぼす影響は小さいと評価され、坪刈収量にも有意差は検出されなかった(表3)。

有機質50%区はやや低収の傾向にあったが、その要因は含有する有機態窒素の有効化率が100%に設定されているためであり、実際の有効化率が100%を下回ればその分だけ減収リスクになると推察された。一方、高窒素鶏糞を使用する場合、農業者自身が施肥設計の段階で窒素有効化率を設定できるため(本試験では窒素成分の有

効化率を75%と設定)、上記の減収リスクを回避できると期待された。同様に、有機質50%入肥料を使用して特別栽培に取組む場合、含有する化学窒素成分が施肥窒素成分の総量制約の対象となるため、例えば対象とする水田が低地力だとしても増肥することはできない。一方、高窒素鶏糞は化学窒素成分を含まないため、有機栽培や特別栽培に取組む場合にも施肥量の制約はなく、増肥も可能である。こうした施肥設計の自由度の高さは、高窒素鶏糞を使用する際の有利点といえる。

玄米外観品質については、施肥体系の3処理区間では整粒と乳白粒に有意差が検出され、年次間でも6項目に有意差が検出された(表4)。年次間差の要因は、2019年の登熟期間が記録的高温気象だったために胴割粒や未熟粒が多発した⁽¹⁴⁾⁽¹⁵⁾ことによる。高窒素鶏糞区と化学肥料区では、乳白粒に有意差が検出されたが、玄米外観品質としては同等と推定された。有機質50%区における整粒歩合の有意な低下は、胴割粒の多発に起因する考えられたが、胴割粒の発生と施肥体系の関係性については、試験区の反復間でも変動幅が大きかったこともあり、考察には至らなかった。

タンパク質含有率については、化学肥料区で有意に高かった(表4)。穂肥に用いた硫酸の肥効が、高窒素鶏糞や有機質50%入肥料よりも高かった可能性が考えられるが、詳細な検証が必要である。

表3 高窒素鶏糞が収量構成要素等に及ぼす影響(2017, 2019年)

施肥体系	倒伏程度 (0-5)	株数 (株 m ⁻²)	稈長 (cm)	穂長 (cm)	穂数 (本 m ⁻²)	一穂 粒数 (粒)	総粒数 (千粒 m ⁻²)	精玄米 千粒重 (g (W15%))	登熟 歩合 (%)	粒厚 >1.90mm (%)	精玄米重 >1.90mm (g m ⁻² (W15%))
高窒素鶏糞	0.0	17.1	75	17.6	410	66	26.9	23.5	85.7	93.2	567
有機質50%	0.0	17.0	74	17.5	399	66	26.3	23.5	87.3	93.2	536
化学肥料	0.0	17.4	73	18.0	415	68	28.2	23.3	86.3	92.2	568
分散 施肥体系	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
分析 [†] 年次	n	n	*	n	*	n	n	*	n	*	n
交互作用	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n

[†] 統計解析ソフトJMP11における「モデル効果の構成」: block&変量効果, 施肥体系, 年次, 施肥体系×年次。分散分析の「***」「**」「*」「n」は、有意水準「0.1%」「1%」「5%」「5%未満」を示す。比率データは逆正弦変換後に検定。異なる英文字はTukey-HSD検定による有意差を示す。

表4 高窒素鶏糞が玄米外観品質とタンパク質含有率に及ぼす影響(2017, 2019年)

施肥体系	整粒 (%)	未熟粒 (%)					被害粒 (%)	死米 (%)	着色粒 (%)	胴割粒 (%)	タンパク質 (%)
		乳白	基部	腹白	青	その他					
高窒素鶏糞	68.8 a	1.6 b	1.5	0.9	0.9	19.4	0.8	0.1	0.0	6.0	5.5 b
有機質50%	63.8 b	2.2 a	2.4	0.9	0.7	19.9	1.0	0.1	0.0	9.1	5.5 b
化学肥料	67.8 a	2.1 a	1.2	1.0	1.1	20.4	0.7	0.1	0.0	5.6	5.7 a
分散 施肥体系	*	*	n	n	n	n	n	n	n	n	*
分析 [†] 年次	**	*	**	**	n	**	n	*	n	**	n
交互作用	n	*	n	n	n	n	n	n	n	n	n

[†] 表3に同じ。

基肥の全量を高窒素鶏糞で代替し、穂肥には化学肥料を使用する減化学肥料栽培体系が「新之助」の収量構成要素や玄米外観品質の各項目に及ぼす影響を表5, 6に示した。

収量構成要素については、施肥体系の3処理区間に有意差は検出されず、年次間では6項目に有意差が検出された(表5)。年次間差の要因は、2019年が記録的な高温気象のために登熟不良傾向だった一方、2022年は登熟に問題がなかったことによる。処理間では実質同等の結果であったが、表3と同様に稈長は化学肥料区よりも鶏糞+化肥区と有機質50%区で伸長する傾向、穂数は化学肥料区よりも鶏糞+化肥区と有機質50%区で減少する傾向、有機質50%区の収量がやや下がる傾向が認められた。いずれも想定される要因は、前記と同様である。玄米外観品質については、施肥体系の3処理区間では整粒に、年次間では8項目に有意差が検出された(表6)。年次間差の要因は、前記と同様で2019年の記録的高温に伴う胴割粒や未熟粒の多発によるものと考えられた。

食味官能試験では、施肥体系の3処理区間に有意差は検出されず、傾向も見いだせなかった。

以上のことから、化学肥料を高窒素鶏糞に全量代替した場合、初期生育の緩速傾向と稈長の伸長傾向があるものの、収量、品質は同等であること、有機質50%入肥料を高窒素鶏糞(基肥)+化学肥料(穂肥)の組合せで代替した場合、生育、収量、品質、食味のいずれもが同等以上であることが確認された。

3. 施肥の軽労化

化学肥料を高窒素鶏糞に全量代替しても収量、品質は同等であることが確認されたが(表3, 4)、一方で施肥量増加に伴う負担が発生する。基肥の10a当たり有効態窒素施肥量を3kgとするためには高窒素鶏糞の現物量で100kgが必要であり、化学肥料の5倍量、有機質50%入肥料の3倍量に相当する(表1)。この施肥労力を軽減するためには乗用機械の利用が有効であり、トラクターに装着できる肥料散布機等の使用が推奨される。一方、穂肥では化学肥料の7倍量、有機質50%入肥料の3倍量の施肥量となるが(表1)、背負式動力散布機以外に有効な施肥方法がないのが現状であり、労力負担増を回避できない。労力に見合う付加価値(有機栽培米等)を見込める場合にはその限りではないが、それでも対応できる栽培面積には限界がある。高窒素鶏糞による全量代替を一般化するためには、省力的に大量の穂肥を施肥できる機械技術開発が不可欠と考えられる。

一方、基肥のみを高窒素鶏糞で代替し、穂肥には化学肥料を使用する減化学肥料栽培体系では、穂肥労力は慣行と同一である。また、有機質50%入肥料による特別栽培と比べると、穂肥施肥量は1/3で済むため、特別栽培における穂肥施肥の軽労化としての意義も大きい。

4. 化学肥料の追肥による柔軟な生育調節

項目2で記したように、有機質50%入肥料を用いた特別栽培では、含有する化学窒素成分が施肥窒素成分の総

表5 高窒素鶏糞による基肥代替が収量構成要素等に及ぼす影響(2019, 2022年)

施肥体系	倒伏程度 (0-5)	株数 (株 m ⁻²)	稈長 (cm)	穂長 (cm)	穂数 (本 m ⁻²)	一穂 粒数 (粒)	総粒数 (千粒 m ⁻²)	精玄米 千粒重 (g (W15%))	登熟 歩合 (%)	粒厚 >1.90mm (%)	精玄米重 >1.90mm (g m ⁻² (W15%))
有機質50%	0.0	16.6	75	17.2	397	65	25.6	23.0	89.8	95.9	529
化学肥料	0.0	16.7	72	17.7	418	65	27.1	23.1	89.1	96.0	560
分散施肥体系	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
分析 [†] 年次	n	**	**	**	n	**	n	n	***	***	*
交互作用	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n

[†] 表3に同じ。

表6 高窒素鶏糞による基肥代替が玄米外観品質とタンパク質含有率に及ぼす影響(2019, 2022年)

施肥体系	整粒 (%)	未熟粒 (%)					被害粒 (%)	死米 (%)	着色粒 (%)	胴割粒 (%)	タンパク質 (%)
		乳白	基部	腹白	青	その他					
鶏糞+化肥	68.9 a	1.8	2.0	1.1	0.8	17.1	0.5	0.1	0.0	7.7	5.7
有機50%	64.6 b	1.6	2.9	1.0	0.5	18.1	0.8	0.1	0.0	10.4	5.6
化学肥料	69.5 a	2.0	1.9	1.1	0.6	17.2	0.6	0.1	0.0	7.1	5.7
分散施肥体系	*	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
分析 [†] 年次	***	***	***	**	n	***	***	***	n	***	*
交互作用	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n

[†] 表3に同じ。

量制約の対象となるため、栽培上の必要性があっても施肥量の増加や追加は認められない。化学窒素成分の使用量が地域慣行の1/2(制約の上限量)となるように基肥と穂肥を施肥した場合(表1)、水稻の生育調節のための追加穂肥⁽¹⁴⁾には、有機質100%肥料が必要になる。この場合、施肥労力の負担が大きいだけでなく、肥料経費も高額であり支障が大きい。一方、基肥の全量を高窒素鶏糞で代替し、穂肥に化学肥料を使用する減化学肥料栽培体系では、穂肥完了時における化学窒素成分削減率が60%であり、化学窒素成分で10a当たり1kgの余裕がある(表1)。したがって、水稻の生育調節が必要になった際には、化学肥料による軽労で有効な対応が可能となる。

5. 安価な肥料経費

本試験の施肥体系(表1)に必要な肥料経費を2022年時の市場価格で試算すると、10a当たり経費で、鶏糞+化肥区:4千円、有機質50%区:9千円、化学肥料区:4千円(注:試算には表1の塩加燐安ではなく、最も安価に入手できる化成肥料を用いた)、程度であった。高窒素鶏糞(基肥)+化学肥料(穂肥)の組合せで特別栽培に取組んだ場合、有機質50%区に対しては肥料経費の半減、化学肥料区に対しては特別栽培としての付加価値増加の効果が期待された。なお、本試験で使用した高窒素鶏糞は、メーカー品であることから割高であった。県内の養鶏業者から同類品を直接入手した場合、鶏糞+化肥区は3千円と試算され、化学肥料区より25%安価となる。さらに、高窒素鶏糞に含まれる石灰や苦土、硫黄等を貨幣換算すると、鶏糞+化肥区の有利性はさらに高くなる。今後の肥料価格の動向を見通すことは容易ではないが、高窒素鶏糞による基肥代替技術は、費用対効果に優ると考え

られた。

6. 高窒素鶏糞の特性と品種適性

高窒素鶏糞(窒素全量4%以上の発酵鶏糞)は、従来の発酵鶏糞(窒素全量2%程度)より窒素有効化率が高く肥効は速効的であるが⁽⁵⁾、化学肥料に比べれば緩速であり、稈長も伸びやすい傾向にあった(表3,5)。また、使用する高窒素鶏糞の規格が特殊肥料⁽¹⁶⁾の場合、表示値±20%が許容範囲として認められているため、窒素全量4%と表示される発酵鶏糞は窒素全量3.2-4.8%までが許容範囲である。さらに、本試験では窒素有効化率を75%と仮定しているが、製品によって、あるいはロットによって実際の窒素有効化率は異なると思われる。窒素全量4%の発酵鶏糞を75%の有効化率で施肥設計したとしても、実際に供給される有効態窒素量は2-4kg程度の幅があると想定しなければならない。この前提では、過剰施肥となっても倒伏しにくい品種、施肥不足となっても追肥で生育調節しやすい品種を選定することが推奨される。コシヒカリ等の倒伏し易い品種を作付けする場合は、表示成分含量が保証されている普通肥料(加工家禽糞肥料)の高窒素鶏糞を使用するか⁽⁵⁾⁽¹⁷⁾、ロット毎の肥料分析により成分含量を確認すること⁽¹⁷⁾が望ましい(図4)。

7. 高窒素鶏糞の施肥時の注意点

前項において、施肥設計の段階で想定しておかなければならない窒素供給量の変動幅について考察したが、施肥後の窒素成分の流亡についても注意が必要である。一般に窒素肥料は、施肥後湛水前に時間が空くほど有効態窒素の硝化が進み、硝酸としてそのまま溶脱したり、湛水後に脱窒により揮散する。一定の実験条件下での成績として、高窒素鶏糞の施肥後湛水までに2週間空いた場

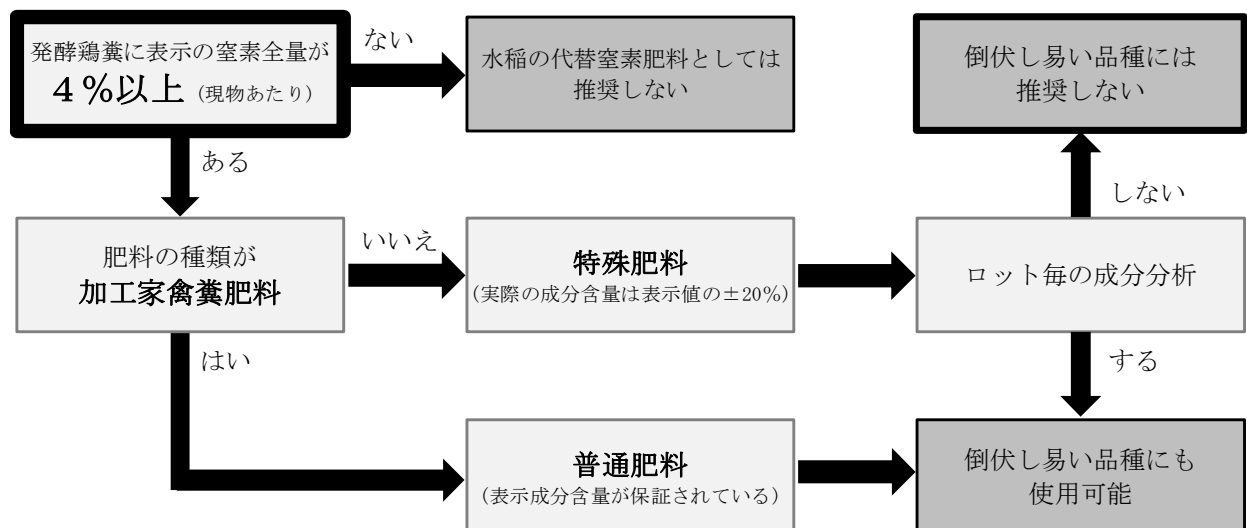


図4 水稻の代替窒素肥料として推奨できる発酵鶏糞の選択基準

合、ほとんどの窒素成分が無効化して水稲に利用されなかった⁽¹⁸⁾と指摘されている。したがって、窒素成分の流出を最小限にするためには、施肥同時耕起後速やかに湛水することが理想である。それができなくても可能な限り施肥から湛水までを最短化することが求められる。

その他、施肥時にぬかるみの残るような排水不良田ではワキの原因となる可能性があること、近隣に住宅地がある環境では臭気が問題となる可能性があること、長期連用した際の影響は未検討であること、等に注意する必要がある。

8. 総括

高窒素鶏糞（窒素全量 4%以上の発酵鶏糞）の特徴を総括すると、以下の通りである。

- ・ 窒素含量が従来鶏糞の2倍
- ・ 従来鶏糞よりも速効的な肥効
- ・ 現物 100kg で有効態窒素 3kg に相当
- ・ 成分バランスが良好 N:P:K=4:3:2

基肥の全量を高窒素鶏糞で代替し、穂肥に化学肥料を使用する減化学肥料栽培技術の特徴を総括すると、以下の通りである。

- ・ 低コストな 50%以上減化学肥料栽培
- ・ 収量、品質、食味は慣行栽培と同等
- ・ 有機質 100%のため基肥量の制約なし
- ・ 基肥はトラクターに装着した肥料散布機等を用いて軽労化
- ・ 穂肥は化学肥料で軽労化と安全確実な生育調節

謝辞

本試験は、新潟県の県単政策研究（地域ニーズ・21世紀型）「新之助の食味・品質の確保に向けた安定生産技術の確立」及び県単経常研究「持続的な水田農業推進のための生産技術の確立」で実施した。実施に当たって、中村信之氏、諸橋歩武氏、室橋浩一氏には試験水田の栽培管理に尽力いただいた。稲川純子氏、小林恵子氏、外山貴子氏には水田管理に協力いただいた。井口由貴氏、土田香代子氏、丸山弘恵氏、水澤祐子氏には調査補助業務に協力いただいた。その他にも多くの関係者から助言・協力いただいた。この場を借りて感謝申し上げる。

引用文献

- (1) 農林水産省 みどりの食料システム戦略 (2022)
- (2) 農研機構 有機物資材の肥効見える化アプリ (<https://soil-inventory.rad.naro.go.jp/>)
- (3) 農研機構 有機質資材の施用効果データベース

(https://www.naro.affrc.go.jp/org/narc/crop_diagnosis/org_db/index.html)

- (4) 村上圭一 高窒素鶏糞肥料の開発—尿酸の分解を起こさずに堆肥化—密閉縦型発酵装置で処理、鶏の研究 83 : 87-89 (2008)
- (5) 農研機構 循環型農業のための家畜糞堆肥を原料とした有機資材製造とその利用の手引き (2014)
- (6) Yuichiro Furukawa・Hiroshi Hasegawa Response of Spinach and Komatsuna to Biogas Effluent Made from Source-Separated Kitchen Garbage, J. Environ. Qual. 35 : 1939-1947 (2006)
- (7) 古川勇一郎・長谷川浩 バイオガスプラントによる生ごみリサイクルの経済性評価, 有機農業研究年報 6 : 153-166 (2006)
- (8) 古川勇一郎・長谷川浩 生ごみおよび家畜糞尿嫌気発酵液の肥料特性とアンモニア揮散量の定量, 日本土壤肥料学会講演要旨集 51 : 150 (2005)
- (9) 古川勇一郎 雑草共存環境におけるコシヒカリ有機栽培と肥培管理技術の勘どころ, 土づくりとエコ農業 46 : 12-17 (2014)
- (10) 重山博信・橋本憲明・神戸崇・石橋俊明・石崎和彦・小林和幸・金田智・松井崇晃・名畑越夫・奈良悦子 水稲新品種「新之助」, 新潟農総研報 15 : 1-10 (2017)
- (11) 稲田勝美 作物生葉の緑色程度ならびに葉緑素含量の測定法とその応用に関する研究 : 1. 生葉の緑色程度ならびに葉緑素含量の測定原理について, 日本作物學會紀事 32 : 157-162 (1963)
- (12) 稲田勝美 作物生葉の緑色程度ならびに葉緑素含量の測定法とその応用に関する研 : 2. 葉緑素計の特性ならびに示度と葉緑素含量との関係, 日本作物學會紀事 33 : 301-308 (1965)
- (13) 中鉢富夫 葉緑素計による水稲(ササニシキ)の窒素栄養診断, 日本土壤肥料学雑誌 57 : 190-193 (1986)
- (14) 古川勇一郎・土田徹・中村正明・東聡志・服部誠・今井康貴 高温登熟条件における「新之助」の品質低下要因と品質低下を抑止するための追加穂肥, 新潟農総研報 19 : 1-8 (2022)
- (15) 今井康貴・服部誠・東聡志・土田徹・古川勇一郎・南雲芳文 新潟県における 2019 年産コシヒカリの品質低下要因解析, 日本作物學會紀事 91 : 230-238 (2022)
- (16) 農林水産省 特殊肥料の品質表示基準を定める件, 農林水産省告示第 1163 : (2021)
- (17) 林賢太郎・南雲芳文・小柳渉 本県で流通している窒素含量が比較的高い鶏糞ペレット堆肥の水稲肥料と

古川・今井・土田・服部・佐藤：基肥全量を高窒素鶏糞で代替する水稻の減化学肥料栽培

しての効果と省力的な施肥法の検証, 新潟農総研報
18 : 33-37 (2021)

(18) 竹内雅己・原正之 高窒素鶏糞堆肥の水稻基肥としての施用時期, 関東東海北陸農業研究成果情報: (2004)

[報文]

ニンジンの根部肥大に対する地温の影響の検討

岸孝二・田崎義孝¹⁾

新潟県農業総合研究所園芸研究センター

1) 前新潟県農業総合研究所基盤研究部

Evaluation of effect of soil temperature on development of carrot (*Daucus carota* L. subsp. *sativus* (Hoffm.) Archang.) root

Koji KISHI, Yoshitaka TAZAKI

Niigata Agricultural Research Institute Horticultural Research Center

要約 ニンジンの生育適地温は 16~18℃とされているが、地球温暖化の進行に伴い、本県の砂丘畑作地帯のニンジン産地においては、この温度帯から外れる期間が長くなり、作型の再構築が必要となることが懸念される。そこで、本県砂丘地で栽培される主要な 2 品種を供試し、生育適地温の上限値と下限値を探索して、その 2 値間を推定有効地温帯として定義した。さらに、推定有効地温帯内の日平均地温を積算することにより根部肥大予測モデル式の構築を試みた。今回評価したモデル式の中において、‘ひとみ五寸’では、推定有効地温帯は 9℃以上 30℃未満、‘紅ひなた’では、同 7℃以上 31℃未満、もしくは 4℃以上 31℃未満の積算地温を説明変数に取ったモデル式が最も適合性が高かった。しかし、地温のみによる根部肥大予測モデル式の構築は困難であり、他の要因を含めた解析が必要であると思われる。

緒言

新潟県における令和 2 年度のニンジンの栽培面積は、243ha (全国 12 位)、出荷量は、4240 トン (同 13 位)⁽⁵⁾ であり、本県砂丘畑における野菜生産の基幹的品目の 1 つである。本県の作型は、夏まきが一般的であるが、播種後の高温・高地温や、台風害の影響を受けやすく、今後は地球温暖化の影響により、一層の生産の不安定化が懸念される。

気象庁は、気候変動に関する政府間パネル (IPCC) 第 5 次評価報告書 (AR5) で用いられた RCP2.6 シナリオおよび RCP8.5 シナリオに基づき、地球温暖化に伴い生じると考えられる気温上昇について、将来予測を実施している。RCP2.6 シナリオは、パリ協定での 2℃目標が達成された世界、すなわち 21 世紀末において、世界平均気温が工業化以前と比べ 2℃上昇にとどまった場合と仮定している。これに対し、RCP8.5 シナリオは、追加的な緩和策をとらなかった世界、すなわち 21 世紀末における世

界平均気温が工業化以前と比べ 4℃上昇した場合と仮定している。RCP2.6 シナリオでは、本県の年間平均気温は約 1.4℃、RCP8.5 シナリオでは、約 4.5℃の上昇が見込まれており、産業や生態系などの幅広い分野に影響を生じるとされている⁽³⁾。

温暖化の進行に伴い、農業分野においても穀物、野菜、果樹など様々な作物への影響が考えられている^(6, 8, 9)。また、温暖化の進行は作物生産にも影響を及ぼし、ニンジンにおいては、2081~2100 年には、高温の影響により晩秋から初冬にかけての市場入荷量が大きく減少する可能性が指摘されており⁽⁶⁾、気温上昇に伴う農作物への影響について、事前に考慮する必要がある。

地温がニンジンの肥大に及ぼす影響に関しては、本県では生育に適した地温が 16~18℃とされているが、その根拠は明確ではない⁽⁴⁾。今後地球温暖化が進行した場合、特に地温変動の大きい砂丘地においては、上記の生育適地温から外れる期間が長くなり、作型の再構築が必要に

なると考えられる。そこで、根部肥大を促進させる地温域の上限値と下限値を提示する。さらに、地温を説明変数とした根重の予測式を構築し、今後必要になる作型の再構築に向けた基礎的な知見の一部とすることを目的として、本研究を実施した。

材料および方法

1. 耕種概要および試験区の構成

本試験は、新潟県新発田市人橋地内にある、園芸研究センター砂丘地圃場で実施した。供試品種は、‘ひとみ五寸’と‘紅ひなた’の2品種とした。地温は、ボタン電池型温度データロガーサーモクロンG (KN ラボラトリーズ) で測定した。実施期間は‘ひとみ五寸’では2015年から2020年までの6年間、‘紅ひなた’では2016年から2020年までの5年間であるが、2017年は土中に設置したサーモクロンの故障により欠測、また、2018年は台風の通過に伴う塩害の発生により著しい生育不良となったため、両年は結果から除外した。

各年次の播種日および収穫日については、表2のとおりである。施肥は基肥、追肥合わせて N : P₂O₅ : K₂O = 25.0 : 28.0 : 26.0 (kg/10a) とした。栽植密度は、畦幅 1.5m, 条間 30cm, 播種間隔 10cm, 4条播種 (2660株/10a) とし、間引きは播種 70~75日後にそれぞれ実施した。収穫は、播種からおおよそ 90, 95, 100, 105, 110日後にそれぞれ 3 m²ずつ掘り取り、根重を測定した。地温の測定は、圃場内の2か所で、サーモクロンを土表面から 15cm 下に埋設し、平均値を日平均地温として用いた。

2. 統計解析

根部肥大に影響を及ぼす地温帯(日平均地温)を推定するため、地温帯の下限値を 4℃から 14℃の 11 通り、上限値を 24℃から 35℃の 12 通り、それらをかけ合わせた 132 通りの積算地温の組合せに、単純積算地温を合わせた合計 133 通りを説明変数、根重を目的変数とした単回帰による予測式の構築および最適な説明変数の探索を試みた。予測式の評価には、クロスバリデーションの 1 つである k 分割交差検証法(k=5)を使用し、MSE(平均平方誤差)および RMSE(平均平方二乗誤差)を算出した。これらの 2 つの指標の数値が小さい順に、相対的に優れたモデル式であると判断し、上限値と下限値の間を推定有効地温帯と定義して、栽培期間内における推定有効地温の積算値を示した。データセットへの適合性は、自由度調整済み決定係数により判断した。統計解析にはフリー統計ソフト R version 4.1.1⁷⁾および boot パッ

ケージを使用した。

結果

1. 栽培期間中の地温の変化

どの年次も、おおむね播種直後から地温が高い状態が継続し、12月に向けて漸次低下した。8月中旬から9月上旬の地温は年次によって大きくばらついた(図1)。2015, 2016年は8月中旬ごろを境に地温が低下し始め、その後 30℃を超えることはなかった。一方、2019年は測定開始から 30℃を超えることがなく、2020年は9/11まで継続して地温が 30℃を超えていた。また、地温は9月中旬以降急速に低下し、9月中下旬はおおよそ 10日ほど 1~2℃ほど、10月は1か月で 7~10℃ほどの低下がみられた。

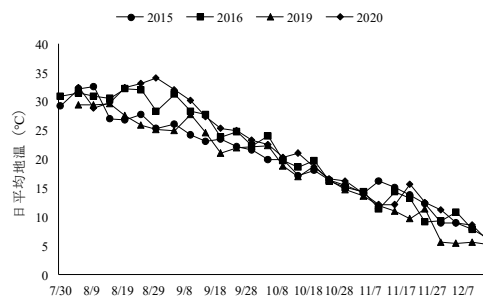


図1 試験期間中の地温推移

2. 地温が‘ひとみ五寸’の根重の変動に及ぼす影響

MSE および RMSE が小さい順に、上位 10 番目までの式を表 1, その時の収穫日別推定有効積算地温を表 2 に記す。最も小さいモデルは、目的変数(y)に根重, 説明変数(x)に地温 9℃以上 30℃未満の積算地温をとった式であり、 $y=0.15x-111.03$ と表された。このモデル式の RMSE は 43.2 であった。これは、モデルによって予測された推定量が、実際に観測された値から平均で 43.2g 変動していることを示している。また、自由度調整済み決定係数は、0.437 であった。

表 1 ‘ひとみ五寸’における推定有効地温帯の積算値の違いが予測精度に及ぼす影響

地温(℃)		MSE	RMSE	自由度 調整済み R2乗値
下限 (以上)	上限 (未満)			
9	30	1865.9	43.2	0.437
8	30	1890.3	43.5	0.430
7	31	1923.0	43.9	0.407
5	30	1938.0	44.0	0.404
4	31	1940.6	44.1	0.416
9	31	1980.1	44.5	0.398
11	30	1986.3	44.6	0.414
7	30	1995.7	44.7	0.401
13	30	2008.1	44.8	0.394
6	30	2010.1	44.8	0.402

表2 ‘ひとみ五寸’の年次別の根重と推定有効地温帯の積算値との関係（上位10番目までを記載）

年次	播種日	収穫日	根重 (g)	推定有効積算地温(°C) ^{a)}													
				下限	9	8	7	5	4	9	11	7	13	6			
				上限	30	30	31	30	31	31	30	30	30	30			
2015	7/20	10/23	167.1	1849.8	1849.8	2001.8	1849.8	2001.8	2001.8	1849.8	1849.8	1849.8	1849.8	1849.8	1849.8	1849.8	
		10/28	183.3	1931.5	1931.5	2083.5	1931.5	2083.5	2083.5	1931.5	1931.5	1931.5	1931.5	1931.5	1931.5	1931.5	
		11/2	216.8	2008.8	2008.8	2160.8	2008.8	2160.8	2160.8	2008.8	2008.8	2008.8	2008.8	2008.8	2008.8	2008.8	2008.8
		11/7	215.7	2079.4	2079.4	2231.4	2079.4	2231.4	2231.4	2079.4	2079.4	2079.4	2079.4	2079.4	2079.4	2079.4	2079.4
		11/8	207.8	1863.8	1863.8	1894.0	1863.8	1894.0	1894.0	1863.8	1863.8	1863.8	1863.8	1863.8	1863.8	1863.8	1863.8
	8/6	11/14	222.3	1954.0	1954.0	1984.2	1954.0	1984.2	1984.2	1954.0	1954.0	1954.0	1954.0	1954.0	1954.0	1954.0	1954.0
		11/19	240.0	2030.4	2030.4	2060.6	2030.4	2060.6	2060.6	2030.4	2030.4	2030.4	2030.4	2030.4	2030.4	2030.4	2030.4
		11/24	259.8	2098.6	2098.6	2128.8	2098.6	2128.8	2128.8	2098.6	2098.6	2098.6	2098.6	2098.6	2098.6	2098.6	2098.6
		11/16	146.9	1983.2	1983.2	2013.4	1983.2	2013.4	2013.4	1983.2	1983.2	1983.2	1983.2	1983.2	1983.2	1983.2	1983.2
		11/20	168.0	2045.3	2045.3	2075.5	2045.3	2075.5	2075.5	2045.3	2045.3	2045.3	2045.3	2045.3	2045.3	2045.3	2045.3
	8/12	11/24	152.4	2098.6	2098.6	2128.8	2098.6	2128.8	2128.8	2098.6	2098.6	2098.6	2098.6	2098.6	2098.6	2098.6	2098.6
		11/30	126.3	2166.2	2166.2	2196.4	2166.2	2196.4	2196.4	2136.5	2166.2	2099.7	2166.2	2166.2	2166.2	2166.2	2166.2
		11/24	147.3	1904.0	1904.0	1904.0	1904.0	1904.0	1904.0	1904.0	1904.0	1904.0	1904.0	1904.0	1904.0	1904.0	1904.0
		11/30	128.7	1971.6	1971.6	1971.6	1971.6	1971.6	1971.6	1941.9	1971.6	1905.1	1971.6	1905.1	1971.6	1905.1	1971.6
		12/12	169.0	2029.4	2073.6	2081.4	2081.4	2081.4	2029.4	1941.9	2081.4	1905.1	2081.4	1905.1	2081.4	1905.1	2081.4
2016	7/11	10/15	98.8	1601.7	1601.7	1997.8	1601.7	1997.8	1997.8	1601.7	1601.7	1601.7	1601.7	1601.7	1601.7	1601.7	
		10/19	100.8	1679.9	1679.9	2076.0	1679.9	2076.0	2076.0	1679.9	1679.9	1679.9	1679.9	1679.9	1679.9	1679.9	
		10/24	132.1	1772.5	1772.5	2168.6	1772.5	2168.6	2168.6	1772.5	1772.5	1772.5	1772.5	1772.5	1772.5	1772.5	
		10/30	141.0	1872.7	1872.7	2268.8	1872.7	2268.8	2268.8	1872.7	1872.7	1872.7	1872.7	1872.7	1872.7	1872.7	1872.7
		11/3	160.8	1930.5	1930.5	2326.6	1930.5	2326.6	2326.6	1930.5	1930.5	1930.5	1930.5	1930.5	1930.5	1930.5	1930.5
	7/20	10/23	121.6	1512.5	1512.5	1908.6	1512.5	1908.6	1908.6	1512.5	1512.5	1512.5	1512.5	1512.5	1512.5	1512.5	1512.5
		10/28	132.6	1598.0	1598.0	1994.1	1598.0	1994.1	1994.1	1598.0	1598.0	1598.0	1598.0	1598.0	1598.0	1598.0	1598.0
		11/2	150.8	1674.1	1674.1	2070.2	1674.1	2070.2	2070.2	1674.1	1674.1	1674.1	1674.1	1674.1	1674.1	1674.1	1674.1
		11/7	171.3	1744.0	1744.0	2140.1	1744.0	2140.1	2140.1	1744.0	1744.0	1744.0	1744.0	1744.0	1744.0	1744.0	1744.0
		11/13	171.7	1818.1	1818.1	2214.2	1818.1	2214.2	2214.2	1818.1	1818.1	1770.5	1818.1	1460.1	1460.1	1460.1	1460.1
	7/29	11/1	174.8	1530.1	1460.1	1796.2	1460.1	1796.2	1866.2	1460.1	1460.1	1460.1	1460.1	1460.1	1460.1	1460.1	1460.1
		11/6	201.8	1530.1	1530.1	1866.2	1530.1	1866.2	1866.2	1530.1	1530.1	1530.1	1530.1	1530.1	1530.1	1530.1	1530.1
		11/11	213.0	1594.7	1594.7	1930.8	1594.7	1930.8	1930.8	1594.7	1594.7	1571.0	1594.7	1571.0	1594.7	1594.7	1594.7
		11/19	214.8	1693.7	1693.7	2029.8	1693.7	2029.8	2029.8	1682.9	1693.7	1598.8	1693.7	1598.8	1693.7	1693.7	1693.7
		11/23	220.1	1744.4	1744.4	2080.5	1744.4	2080.5	2080.5	1744.4	1744.4	1474.6	1744.4	1474.6	1744.4	1474.6	1744.4
8/9	11/13	138.9	1618.6	1618.6	1832.1	1618.6	1832.1	1832.1	1618.6	1618.6	1571.0	1618.6	1571.0	1618.6	1618.6	1618.6	
	11/19	171.7	1693.7	1693.7	1907.2	1693.7	1907.2	1907.2	1682.9	1693.7	1598.8	1693.7	1598.8	1693.7	1693.7	1693.7	
	11/23	199.7	1744.4	1744.4	1957.9	1744.4	1957.9	1957.9	1733.6	1744.4	1625.5	1744.4	1625.5	1744.4	1625.5	1744.4	
	12/4	190.3	1856.3	1856.3	2069.8	1856.3	2069.8	2069.8	1745.4	1856.3	1625.5	1856.3	1625.5	1856.3	1625.5	1856.3	
	10/29	189.6	2120.3	2120.3	2120.3	2120.3	2120.3	2120.3	2120.3	2120.3	2120.3	2120.3	2120.3	2120.3	2120.3	2120.3	
2019	7/30	11/2	194.2	2178.8	2178.8	2178.8	2178.8	2178.8	2178.8	2178.8	2178.8	2178.8	2178.8	2178.8	2178.8	2178.8	
		11/7	213.1	2247.2	2247.2	2247.2	2247.2	2247.2	2247.2	2247.2	2247.2	2247.2	2247.2	2247.2	2247.2	2247.2	
		11/12	231.7	2306.6	2306.6	2306.6	2306.6	2306.6	2306.6	2306.6	2306.6	2306.6	2306.6	2306.6	2306.6	2306.6	
		11/19	280.6	2387.3	2387.3	2387.3	2387.3	2387.3	2387.3	2354.5	2387.3	2247.2	2387.3	2247.2	2387.3	2387.3	
		11/6	158.2	1997.9	1997.9	1997.9	1997.9	1997.9	1997.9	1997.9	1997.9	1997.9	1997.9	1997.9	1997.9	1997.9	1997.9
	8/8	11/12	188.2	2070.9	2070.9	2070.9	2070.9	2070.9	2070.9	2070.9	2070.9	2011.4	2070.9	2011.4	2070.9	2070.9	
		11/16	204.4	2118.6	2118.6	2118.6	2118.6	2118.6	2118.6	2107.7	2118.6	2011.4	2118.6	2011.4	2118.6	2118.6	
		11/21	271.3	2173.2	2173.2	2173.2	2173.2	2173.2	2173.2	2130.7	2173.2	2011.4	2173.2	2011.4	2173.2	2173.2	
		11/26	292.7	2205.2	2213.8	2221.3	2221.3	2221.3	2221.3	2205.2	2153.6	2221.3	2011.4	2221.3	2011.4	2221.3	
		11/16	185.1	1855.6	1855.6	1855.6	1855.6	1855.6	1855.6	1844.7	1855.6	1748.4	1855.6	1748.4	1855.6	1855.6	
	8/17	11/20	215.9	1900.5	1900.5	1900.5	1900.5	1900.5	1900.5	1867.7	1900.5	1748.4	1900.5	1748.4	1900.5	1900.5	
		11/26	208.5	1942.2	1950.8	1958.3	1958.3	1958.3	1942.2	1890.6	1958.3	1748.4	1958.3	1748.4	1958.3	1958.3	
		11/30	253.1	1952.0	1977.2	1984.8	1990.6	1990.6	1952.0	1890.6	1984.8	1748.4	1984.8	1748.4	1984.8	1984.8	
		12/5	228.7	1952.0	1977.2	1999.8	2023.4	2023.4	1952.0	1890.6	1999.8	1748.4	1999.8	1748.4	1999.8	1999.8	
		11/22	134.5	1717.5	1726.1	1726.1	1726.1	1726.1	1717.5	1675.0	1726.1	1555.7	1726.1	1555.7	1726.1	1726.1	
8/24	11/27	124.6	1759.3	1767.9	1775.4	1775.4	1775.4	1759.3	1697.9	1775.4	1555.7	1775.4	1555.7	1775.4	1775.4		
	12/5	135.7	1759.3	1784.5	1807.1	1830.7	1830.7	1759.3	1697.9	1807.1	1555.7	1807.1	1555.7	1813.8	1813.8		
	12/7	166.9	1759.3	1784.5	1807.1	1836.2	1840.8	1759.3	1697.9	1807.1	1555.7	1807.1	1555.7	1813.8	1813.8		
	12/12	199.8	1759.3	1784.5	1807.1	1859.5	1868.8	1759.3	1697.9	1807.1	1555.7	1807.1	1555.7	1820.5	1820.5		
	11/2	121.0	1320.3	1320.3	1533.1	1320.3	1533.1	1533.1	1320.3	1320.3	1320.3	1320.3	1320.3	1320.3	1320.3		
2020	7/30	11/11	175.2	1450.9	1450.9	1663.7	1450.9	1663.7	1663.7	1450.9	1438.7	1450.9	1438.7	1450.9	1450.9		
		11/17	164.9	1525.5	1525.5	1738.4	1525.5	1738.4	1738.4	1525.5	1525.5	1465.0	1525.5	1525.5	1525.5		
		11/17	79.6	1358.0	1358.0	1540.6	1358.0	1540.6	1540.6	1358.0	1358.0	1297.5	1358.0	1297.5	1358.0		
		11/24	106.5	1456.3	1456.3	1638.9	1456.3	1638.9	1638.9	1456.3	1456.3	1382.9	1456.3	1382.9	1456.3		
		11/30	111.5	1529.2	1529.2	1711.8	1529.2	1711.8	1711.8	1518.3	1529.2	1382.9	1529.2	1382.9	1529.2		
	8/20	11/24	57.0	1426.5	1426.5	1486.8	1426.5	1486.8	1486.8	1426.5	1426.5	1353.1	1426.5	1353.1	1426.5		
		11/30	80.9	1499.4	1499.4	1559.6	1499.4	1559.6	1559.6	1488.4	1499.4	1353.1	1499.4	1353.1	1499.4		

次に、モデル式の 80%予測区間を図 2 に示す。x=1500 のとき、モデル式の推定値は 117.8g、80%予測区間下限は 61.8g、上限は 174.5g である。同様に、x=2000 のときは、194.1g、137.8g、250.3g、x=2500 のときは、270.3g、211.3g、329.4g となる。本試験内では、ニンジンの根重は最大でも 292.7g であることを考慮すると、このモデル式の 80%予測区間は比較的広く、予測モデルとしては実用性が低いと考えられた。

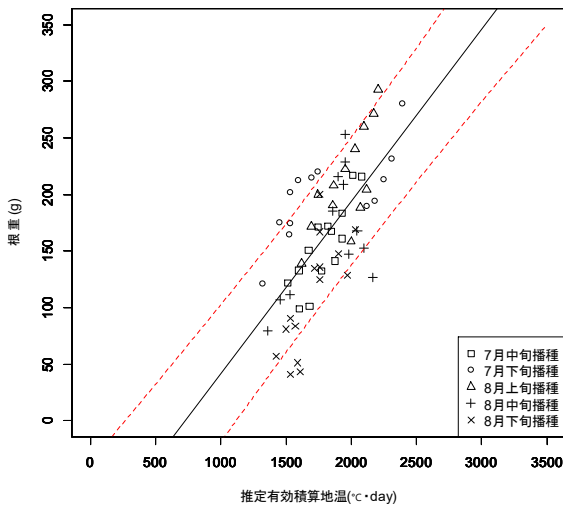


図 2 ‘ひとみ五寸’における推定有効積算地温（9℃以上 30℃未満）を説明変数にとったモデル式の 80%予測区間（破線内）

3. 地温が‘紅ひなた’の根重の変動に及ぼす影響

先述の‘ひとみ五寸’と同じ手法で、MSE および RMSE が最小となる式が、予測力に優れたモデルであるとし、上位 10 番目までを表 3、その時の収穫日別推定有効積算地温を表 4 に記す。最も小さいモデルは、説明変数を地温 7℃以上 31℃未満の積算地温および 4℃以上 31℃未満の積算地温をとった式となった。モデル式は、7℃以上 31℃未満では、 $y=0.21x-234.53$ 、4℃以上 31℃未満では $y=0.21x-238.89$ とそれぞれ表された。このモデル式の RMSE は両方とも 49.0 であった。一方、当てはまりの良さを表す自由度調整済み決定係数は、前者が 0.498、後者が 0.504 と、両者とも大きな違いはなかった。

次に、7℃以上 31℃未満の積算地温を説明変数にとったモデル式の 80%予測区間を図 3 に示す。x=1500 のとき、モデル式の推定値は 83.6、80%予測区間下限は 16.8、上限は 150.3 である。x=2000 のとき、189.6、124.8、254.4、x=2500 のとき、295.8、227.3、364.0 となる。

また、4℃以上 31℃未満の積算地温を説明変数にとったモデル式の 80%予測区間を図 4 に示す。推定値、80%予測区間下限値、上限値の順に、x=1500 で 82.2、15.8、148.5、x=2000 で 189.2、124.8、253.6、x=2500 で 296.2、228.2、364.1 となる。‘ひとみ五寸’と同じく、本モデル式も 80%予測区間の幅が広く、予測モデルとしては実用性が低いと考えられた。

表 3 ‘紅ひなた’における推定有効地温帯の積算値の違いが予測精度に及ぼす影響

地温(℃)		MSE	RMSE	自由度調整済み R2乗値
下限 (以上)	上限 (未満)			
7	31	2398.7	49.0	0.498
4	31	2400.8	49.0	0.504
9	31	2503.0	50.0	0.494
8	31	2512.7	50.1	0.503
6	31	2581.5	50.8	0.499
10	31	2590.9	50.9	0.487
11	31	2653.4	51.5	0.487
12	31	2730.3	52.3	0.497
14	31	2950.7	54.3	0.373
13	31	2952.3	54.3	0.417

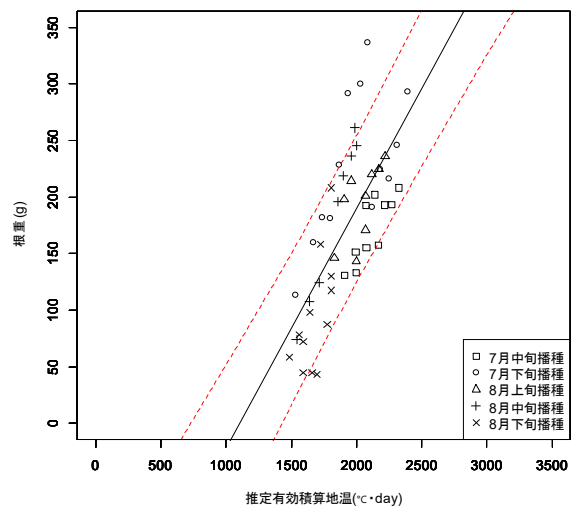


図 3 ‘紅ひなた’における推定有効積算地温（7℃以上 31℃未満）を説明変数にとったモデル式の 80%予測区間（破線内）

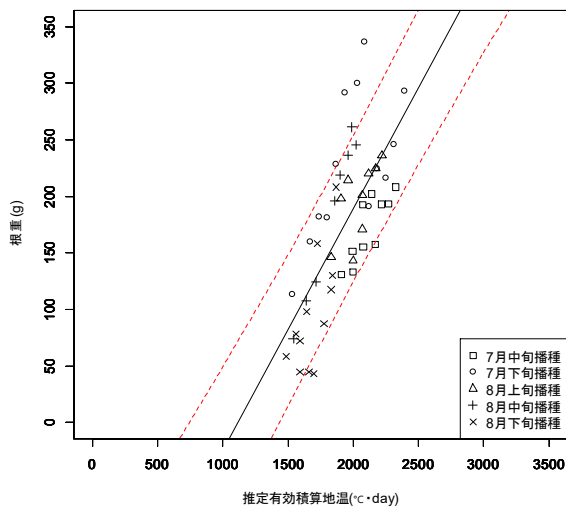


図4 ‘紅ひなた’における推定有効積算地温(4℃以上31℃未満)を説明変数にとったモデル式の80%予測区間(破線内)

考察

堀らは、ニンジンの肥大に適した地温は18~23℃であると示し、28℃を超えるような高地温では肥大効率が低下し、肥大不良となると報告している⁽²⁾。本県においては、過去の生育適地温の評価は、ほぼ経験則のみに基づいており、地温データの統計解析結果を根拠とした例はない。そこで、本試験では、MSEおよびRMSEの小さい順に予測精度が高いモデルとし、肥大を促進させる地温域を探索し、推定有効地温帯と定義した。全体的に適合性はさほど高くはなかったが、‘ひとみ五寸’、‘紅ひなた’の2品種において、MSEおよびRMSEを基準とした式を得た。これらの指標が小さい順に上位10番目までのモデルを見ると、‘ひとみ五寸’では、下限は4~13℃、上限は30~31℃であり、‘紅ひなた’では、下限が4~14℃、上限が31℃のモデルが支持された。このことより、根部肥大を促進させる推定有効地温帯の上限は‘ひとみ五寸’、‘紅ひなた’とも、30~31℃であると解釈できる。本モデル式は適合性に難があることに加え、堀らの報告よりも若干高い地温であるが、概ね同様の傾向が現れていると考えられる。以上のことから、推定有効地温帯の上限値の暫定的な指標として設定したい。一方、推定有効地温帯の下限は、両品種とも一定の値に収束していない。堀らは、根部肥大の適地温は、気温(日中-夜間)23-18℃では23℃、18-13℃では23~18℃、13-8℃では18℃と、気温の低下に伴い、低温域に移行する傾向があり、13℃の

低地温になると、根の肥大効率は高いが、地上部の生育が遅れるために根の肥大は不十分になると述べている。本試験において、推定有効地温帯の下限域が収束しない理由も、気温の低下に伴って推定有効地温帯の下限域が低温側に変動している可能性があるためと考えられる。

本試験では、両品種とも年次間差が非常に大きいものの、7月下旬播種で最も肥大が優れ、それ以前および8月下旬以降の播種では肥大が劣る傾向が見受けられた。これは、堀らの考察に従うと、7月下旬以前の播種では、高地温にさらされる期間が長いためであると考えられる。また、8月下旬の播種では、十分な生育量を確保する前に低地温に入り地上部の生育が劣ることにより肥大不良となるためであると推察できる。本県においては、ニンジンは8月中旬までに播種することとされている⁽⁴⁾。これは、経験的に8/10~15ごろが播種限界であり、それ以降に播種した場合、年内収穫は難しいと考えられているためであるが、本試験の結果はこれらの経験則を裏付けているものと考えられる。

しかし、同時にモデル式の説明力を示す自由度調整済み決定係数は、‘ひとみ五寸’で0.437、‘紅ひなた’で0.498あるいは0.504であった。これは、根重の変動について、前者は43.7%、後者は49.8%あるいは50.4%が、推定有効積算地温によって説明が可能であることを示している。しかし、残りの要因についてはいまだ判然としていない。そこで、作型を7月中旬播種、7月下旬播種、8月上旬播種、8月中旬播種、8月下旬播種の5つに分け、作型を説明変数に入れて重回帰分析を行った。作型には様々な環境情報が含まれ、地温も作型を構成する要因に内包されるため、厳密にはこの2要因の影響度を比較検討するのは好ましくないと思われる。しかし、ここでは作型を説明変数として導入することで、地温だけではない環境情報の存在による、モデル式の説明力の変動およびそれらが根部肥大に及ぼす影響度について検討することを意図して実施した。その結果両品種とも、推定有効積算地温、作型とも有意であった(表5, 6)。しかし、要因の影響度を表す偏回帰係数は、どちらも推定有効積算地温に比べ作型が圧倒的に大きい。この結果から、地温に比べ作型の違いが、根部肥大に大きな影響をもたらすと解釈できる。また、この重回帰分析の自由度調整済み決定係数は、‘ひとみ五寸’で0.637、‘紅ひなた’で0.703であった。

表 5 ‘ひとみ五寸’における地温と作型が根重に及ぼす影響度の違い

要因	水準	一般線形モデル(重回帰分析)	
		偏回帰係数	標準誤差
	1(7月中旬播種)	0.000	0.000
	2(7月下旬播種)	41.741 **	13.297
作型	3(8月上旬播種)	36.473 **	13.618
	4(8月中旬播種)	3.011	13.619
	5(8月下旬播種)	-32.661 *	12.938
地温	推定有効積算地温	0.122 ***	0.018
定数項		-63.814 +	33.626

a) ***:0.1%水準, **:1%水準, *:5%水準, +:10%水準で統計的に有意。

表 6 ‘紅ひなた’における地温と作型が根重に及ぼす影響度の違い

要因	水準	一般線形モデル(重回帰分析)	
		偏回帰係数	標準誤差
	1(7月中旬播種)	0.000	0.000
	2(7月下旬播種)	82.912 ***	16.448
作型	3(8月上旬播種)	39.413 *	17.607
	4(8月中旬播種)	72.707 ***	20.234
	5(8月下旬播種)	15.180	21.325
地温	推定有効積算地温	0.210 ***	0.032
定数項		-272.550 ***	67.904

a) ***:0.1%水準, **:1%水準, *:5%水準, +:10%水準で統計的に有意。

また、ここで興味深い点は、7月中旬播種の作型1と8月下旬播種の作型5を比べた時である。‘ひとみ五寸’では、作型5では偏回帰係数は負の値を示している。これは、遅い作型は有意に根部肥大を抑制すると解釈できる(表5)。一方、‘紅ひなた’は、作型5において、有意ではないものの、偏回帰係数は正の値である(表6)。これは、本試験で供したデータ数では断定的に論ずることができないものの、‘紅ひなた’は、7月中旬播種に比べ、8月下旬播種は根部肥大を促進させるなんらかの条件が優れていることを示唆している。すなわち、‘紅ひなた’は、‘ひとみ五寸’と比べ、遅い作型でも肥大が緩やかではあるが促進される可能性があることを示していると考えられた。

安部らは、あらゆる作物の作型設定は、その地域を取り巻く自然環境条件ならびに社会的条件から総合的に行われるべきであると述べている⁽¹⁾。作型を支配する自然環境条件は、地温だけではなく、気温、日射量、降水量、土壌水分条件、日長など、様々な要因が考えられる。この結果は、地温だけではニンジンの根部肥大を説明することは困難であり、他の要因が関与しあっていることを示唆していると考えられる。今後は、様々な説明変数を選択、導入することで、より適合性の高いモデル式の構築に取り組みたい。

年平均気温は、新潟市において100年間で1.4℃上昇しており⁽³⁾、地球温暖化に伴う気候変動はすでに発生し

ているものと考えられる。RCP8.5シナリオでは、本県は猛暑日が18日、真夏日が51日程度それぞれ増加している⁽³⁾。この想定のまま地球温暖化が進行したと仮定すると、本試験の結果からも、ニンジンを作付けできる期間は確実に短くなると推測される。その場合、肥大不良などのニンジンの形質的な問題にとどまらず、市場においては短期間に大量のニンジンが流入するなど、経済的影響も多分に起こりうるものと考えられる。ニンジン産地においては、将来的に関係機関・団体のみならず、試験研究機関も交えてこの問題に対応する体制が整備されることを期待したい。

謝辞

本試験の実施にあたって、竹田宏行氏、佐藤淳氏(園芸研究センター育種栽培科)、黒田智久氏(現：企画経営部専門研究員)には有益な助言を頂いた。丹後精一氏(園芸研究センター総務課)および角田広美氏には、圃場管理、収穫物調整、調査業務などで尽力いただいた。上記の各位に対し、この場を借りて感謝申し上げる。

引用文献

- (1) 安部章・林勝實・山田芳文・佐藤如 メッシュ気候値を利用したダイコン、ブロッコリーの作型設定。大分県農業技術センター研究報告21:27-41(1991)
- (2) 堀裕・新井和夫・土岐知久 培地温と気温の組合せがそ菜の生育ならびに養分吸収に及ぼす影響(2)。農林省園芸試験場報告9:189-219(1970)
- (3) 新潟地方気象台
(<https://www.data.jma.go.jp/tokyo/shosai/umi/kikouhenka/leaflet2021/pdf/niigata-12021.pdf>)
最終閲覧日：2022年10月11日
- (4) 新潟県農林水産部 野菜栽培指針。令和4年3月423-434(2022)
- (5) 農林水産省 令和2年産野菜生産出荷統計
(<https://www.e-stat.go.jp/stat-search/files?page=1&layout=datalist&toukei=00500215&tstat=000001013427&cycle=7&year=20200&month=0&tclass1=000001032286&tclass2=000001032933&tclass3=000001161149&tclass4val=0>)
最終閲覧日：2022年9月5日
- (6) 大原源二・岡田邦彦 わが国の主要露地野菜の生産実態の同定に基づく温暖化が市場入荷に及ぼす影響の評価。生物と気象20:107-116(2020)
- (7) R Core Team (2021). R: A language and

岸・田崎：ニンジンの根部肥大に対する地温の影響の検討

environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

(8) 清野 裕 地球温暖化が我が国の穀物生産に及ぼす影響. 農業気象 51(2) : 131-138(1995)

(9) 杉浦俊彦・黒田治之・杉浦裕義 温暖化がわが国の果樹生育に及ぼしている影響の現状. 園芸学研究 6(2) : 257-263(2007)

[報文]

スーダン型ソルガム「涼風」の刈取り時期の違いが
収量，飼料成分等に及ぼす影響および家畜を通した品質評価

清水翔太・小柳渉・平尾賢一¹⁾・小橋有里²⁾

新潟県農業総合研究所畜産研究センター

1) 現在，新潟県新潟地域振興局巻農業振興部

2) 現在，全酪連酪農技術研究所

Effects of different harvesting times on yield, feed composition, etc. of Sudan type sorghum
"Suzukaze" and quality evaluation through livestock

Shota SHIMIZU, Wataru OYANAGI, Kenichi HIRAO, Yuri KOBASHI

Niigata Agricultural Research Institute Livestock Research Center

要 約 近年の地球温暖化の進行に伴い増加する台風等の強風雨によってもたらされる長大型飼料作物の倒伏や折損などの気象リスクを回避するために，早刈取りしたスーダン型ソルガム「涼風」の飼料成分および品質について家畜への給与を通じて評価を行った。2018～2020年の3ヵ年に渡って刈取り時期試験を実施し，2019年には泌乳牛を用いて刈取り時期の違いによる選好性試験を実施した。2020年には，泌乳牛を用いて給与試験を実施した。刈取り時期試験では，1番草は止葉抽出期前刈取り以外では収量等に大きな差はなく，1番草刈取り日と飼料成分値との関係では，刈取り日が早いほどCP，Oa，Oa/OCWが高かった。また，1番草の第一胃内乾物消失率は，刈取り日が早いほど高かった。2番草は止葉抽出期と出穂始期では飼料価値が同等であった。選好性試験では，発酵品質に関わらず止葉抽出期の採食量が出穂期よりも有意に多かった。給与試験では，止葉抽出期に収穫した「涼風」サイレージTMRと購入スーダングラス乾草TMRでは，乳量，乳成分等に差はみられなかった。以上から，台風等の気象リスクを回避しつつ，栽培面と飼料面および飼養面からみてバランスの良い刈取り時期は，1番草は止葉抽出期，2番草は出穂始期であると考えられた。

緒言

近年，地球規模での気候変動による影響が極端化してきており，農業分野においても農作物が気象災害を受ける機会が拡大している。また，“〇〇年に一度”と表現されるような極端な気象現象を観測することも増えてきた。気象庁のデータによると，2021年の日本の平均気温の基準値からの偏差は+0.61℃で，1898年の統計開始以降，3番目に高い値となった。日本の年平均気温は，様々な変動を繰り返しながら上昇しており，長期的には100年あたり1.28℃の割合で上昇している。特に1990年代以降，高温となる年が頻出していると報告されている¹⁾。また，気温の上昇に伴い，熱帯夜や猛暑日が増え，1時間あた

りの降水量が50mm以上となる日数は増加傾向にあり，記録的大雨，局地的豪雨といったことが近年多数観測されてきていることから，地球温暖化による影響が考えられている²⁾。特に，2018年頃からは日本列島に強い台風がいくつも上陸し，各地に甚大な被害をもたらしている。地球温暖化の進行に伴い，台風の強さや台風による強風雨の発生頻度の増加がこれからも予想されており，農作物への被害の増加が懸念されている。

飼料作物においては，トウモロコシやソルガム類等の長大型飼料作物で台風等の顕著な強風による倒伏や折損被害がある。倒伏や折損は機械による収穫の際に収穫ロスを生じさせたり，機械作業の効率や飼料品質の低下を

生じさせたりする。そのため、これまで台風等による倒伏、折損被害を軽減するために耐倒伏性や折損抵抗性の高い品種の育成が進められてきた^(3,4)。また、近年清沢らが育成したソルガム新品種「涼風」は、1番草、2番草ともに倒伏がみられなかったと報告されている⁽⁵⁾。

一方で、新潟県は日本海側気候のため総じて梅雨期が長く、最近では局地的大雨も多く発生している⁽⁶⁾。そのため、刈遅れ等による飼料作物の品質低下を招いている。このようなことから、台風等の気象リスクを回避しながら安定多収を図ることができる新たな栽培調製体系が望まれている。その中で、スーダン型ソルガム「涼風」は多回刈り可能な特性を有し、台風被害等を回避するための早刈りとその後の再生が可能であることから、従来のトウモロコシ栽培と組み合わせることで気象リスクを回避することが可能な技術として有望であることが報告されている⁽⁷⁾。

本報告では、前述の報告に関連して実施された生研支援センター「革新的技術開発・緊急展開事業（うち経営体強化プロジェクト）」の「気象リスクに対応した安定的な飼料作物生産技術の開発」の中で実施した、台風被害を回避するために早刈りした場合のスーダン型ソルガム「涼風」の飼料成分や品質について家畜への給与を通じた評価を行ったのでその結果を報告する。

実験方法（材料および方法）

1. 刈取り時期試験

刈取り時期試験は、2018～2020年の3ヵ年に渡って実施した。2018年と2019年は1番草刈取り時期について、2020年は2番草刈取り時期について試験を実施した。各年度ともスーダン型ソルガム「涼風」を供試し、播種量を9kg/10aとして散播した。

2018年はロールベールサイレージ調製用ほ場で行い、5/25に播種し、播種後ディスクハローで覆土、ケンブリッジローラーで鎮圧し、発芽定着後に区割りを行った。刈取りは1番草を7/9～8/3に4段階で刈取り、2番草は全区9/3に刈取った。

2019年は試験ほ場で行い、予め区割りをし、5/22に播種し、播種後ロータリで覆土、ケンブリッジローラーで鎮圧した。刈取りは、1番草を7/9～8/7に5段階で刈取り、2番草を全区9/10に刈取った。

2020年は試験ほ場で行い、予め区割りをし、5/18に播種し、播種後ロータリで覆土・ケンブリッジローラーで鎮圧した。刈取りは、1番草を全区7/27に刈取り、2番

草を9/8～9/23に4段階で刈取った。

区制は各年度とも各区9m²以上×3反復、刈り高さは10cmとした。収穫後、収量、飼料成分等を測定するとともに、2019年の一部試料を泌乳牛2～3頭を用いた第一胃内乾物消失率測定に供した。

2. 泌乳牛の選好性試験

スーダン型ソルガム「涼風」1番草を2019年7/17（早刈区：止葉抽出期）と7/31（遅刈区：出穂期）に刈取り、それぞれ乳酸菌製剤添加の有無を設けロールベールサイレージに調製し、ロールカッターで細断後、泌乳牛6頭を用いて選好性試験を実施した。乾物で0.8kg相当量を給与し、1時間あたりの採食量を算出して選好順位を付けた。本試験は各日TMR飽食後に実施した。

3. 泌乳牛の給与試験

給与試験には、ホルスタイン種泌乳牛6頭を用いた。給与飼料は、2020年8/2に収穫（止葉抽出期：出穂率6%）したスーダン型ソルガム「涼風」ロールベールサイレージをTMRに調製したものと、対照として購入スーダングラス乾草をTMRに調製したものを給与した。給与方法はクロスオーバー法で実施した。給与飼料の構成内容は表1の通りである。馴致2週間、本試験1週間による試験を2期行った。

表1 飼料構成および飼料成分

	涼風サイレージ TMR(試験区)	スーダングラス TMR(対照区)
構成比(乾物%)		
スーダングラス乾草	—	30
涼風	29.9	—
トウモロコシサイレージ	14.1	13.9
市販配合飼料	56	56
乾物率(%)	57	63
飼料成分(乾物%)		
CP	14.6	14.6
aNDFom	39.7	37.5
ADFom	23.1 a	20.7 b
ADL	2.7	2.9
発酵品質		
pH	4.2 b	4.5 a
乳酸(%/FM)	3.0	2.7
酢酸(%/FM)	0.4 b	0.7 a
酪酸(%/FM)	0.0	0.0
Vスコア(点)	98	96

a,b : p<0.05

結果

1. 刈取り時期の違いによる収量、成分、消失率

2018年と2019年の1番草刈取り時期の試験では、1番草の乾物収量は刈取り日が早いほど少なかった。2番草の再生率は刈取り日が早いほど低い傾向であったが、止葉抽出期前刈取り以外では大きな差はみられなかった。合計乾物収量は止葉抽出期前刈取りでは低い傾向であったが、止葉抽出期以降の刈取りでは両年ともほぼ同等であった(表2-A,B)。

2020年の2番草刈取り時期の試験では、2番草の生育・収量の反復内での差が大きかったため有意差はなかったが、刈取り日が遅いほど2番草の乾物収量および年間乾物収量は多くなる傾向がみられた。(表2-C)。

2018年8/16には7/9, 7/18, 7/26区で2番草が、2019年6/30には7/17, 7/23, 7/31区で、2020年7/2には9/8, 9/14, 9/23区で1番草がそれぞれ倒伏したが、いずれも数日後には回復した。

1番草刈取り日と飼料成分値との関係では、刈取り日が早いほどCP, Oa, Oa/OCWが高く、ADL, Obが低かった。2番草も同様であった。特に繊維の消化性に大きく影響するとされるADL, Oa/OCWで顕著であった(表3)。1番草の第一胃内乾物消失率は、いずれの培養時間も7/9区>7/17区>7/23区>7/31区であり刈取り日が早いほど高かった(図1)。8/7区は、培養初期は高いが48時間以降は低く、繊維の消化性に由来する0時間と72時間の差が最も小さかった。

表2 刈取り時期試験結果

A 2018年 1番草刈取り日は4段階 2番草刈取り日は同一日

刈取り日		出穂率		草丈cm		稈径cm		乾物収量kg/10a			苗立数	2番草	再生率				
1番	2番	1番	ステージ	2番	1番	2番	1番	2番	1番	2番	合計	/m ²		茎数/m ²			
7/9	9/3	0%	止葉前	7%	186	187	7.7	7.3	615	b	740	a	1354	52	67	1.3	b
7/18	9/3	1%	止葉期	1%	220	187	8.1	7.0	825	ab	665	a	1490	51	90	1.8	ab
7/26	9/3	5%	止葉期	0%	228	187	8.8	6.9	927	a	501	ab	1428	49	84	1.7	ab
8/3	9/3	60%	出穂期	0%	222	170	9.1	7.0	1115	a	407	b	1522	54	108	2.0	a

B 2019年 1番草刈取り日は5段階 2番草刈取り日は同一日

刈取り日		出穂率		草丈cm		稈径cm		乾物収量kg/10a			苗立数	2番草	再生率			
1番	2番	1番	ステージ	2番	1番	2番	1番	2番	1番	2番	合計	/m ²		茎数/m ²		
7/9	9/10	0%	止葉前	39%	195	252	7.6	7.3	582	d	897	a	1479	157	64	0.4
7/17	9/10	0%	止葉期	36%	225	255	7.5	7.1	721	cd	876	a	1598	139	75	0.5
7/23	9/10	1%	止葉期	6%	243	232	7.2	7.7	883	bc	625	b	1508	155	79	0.5
7/31	9/10	45%	出穂期	0%	255	207	7.1	7.6	1083	ab	479	bc	1562	153	107	0.7
8/7	9/10	90%	出穂終	0%	255	192	7.5	7.3	1297	a	377	c	1674	159	107	0.7

C 2020年 1番草刈取り日は同一日 2番草刈取り日は4段階

刈取り日		出穂率		草丈cm		稈径cm		乾物収量kg/10a			苗立数	2番草	再生率			
1番	2番	1番	ステージ	2番	1番	2番	1番	2番	1番	2番	合計	/m ²		茎数/m ²		
7/27	9/8	12%	出穂始	4%	206	189	7.2	7.4	656		622		1278	150	84	0.6
7/27	9/14	12%	出穂始	11%	206	197	7.2	7.0	685		651		1336	144	87	0.6
7/27	9/18	12%	出穂始	42%	206	208	7.2	6.9	690		778		1468	156	83	0.5
7/27	9/23	12%	出穂始	59%	206	208	7.2	7.1	720		869		1589	159	90	0.6

止葉期：止葉抽出期 止葉前：止葉抽出期前 再生率は2番草茎数/苗立数で算出 a,b,c,d:P<0.05

飼料成分に関するデータを整理し、出穂率とADFomおよびADLの関係を図3,4に示した。同程度の出穂率で1番草と2番草を比較すると、ADFom, ADLとも2番草は1番草に比べ概ね低かった。さらに同程度の出穂率の1番草と2番草の第一胃内乾物消失率を測定した結果、2番草は1番草に比べて乾物消失率が高かった(図2)。

2. 刈取り時期の違いによる泌乳牛の選好性

1~3日目の平均採食量は早刈区(止葉抽出期)と遅刈区(出穂期)に有意な差がみられた(表4)。また、水分が高い早刈区で乳酸菌添加区と無添加区でVスコアに大きな違いがみられたが、採食量には影響がみられなかったため、両者を選好順位1位とした。

次に水分が中程度であった遅刈区2区の採食量を比較したところ、遅刈添加区は無添加区より採食量が有意に多かった(表4)。

このように、採食量および選好順位(嗜好性)に対しては発酵品質より刈取り時期または水分の影響が大きく、止葉抽出期・高水分で調製したサイレージは出穂期・中水分で調製したものより採食量が多かった。

3. 給与試験による乾物摂取量、乳量、乳成分等

乾物摂取量、乳量、乳成分、第一胃液性状、血液性状はいずれも正常な範囲であり、「涼風」給与区と対照区に差は認められなかった(表5)。また、両区とも牛体に乳房炎等の異常は認められなかった。

表3 刈取り時期ごとの飼料成分

A 2019年 1番草刈取日は5段階 2番草刈取日は同一日

	(1番草刈取日)	出穂率	CP%	aNDFom%	ADFom%	ADL%	Oa%	Ob%	Oa/OCW	NO3-N
1番草	(7/9区)	0%	12.2 a	65.5 b	38.9 c	3.2 c	15.6 ab	44.7 b	26% a	1622 a
1番草	(7/17区)	0%	10.8 ab	68.2 a	42.7 ab	3.9 b	17.6 a	47.0 b	27% a	1151 ab
1番草	(7/23区)	1%	8.9 bc	70.2 a	44.8 a	4.4 ab	15.8 ab	52.0 a	23% a	699 b
1番草	(7/31区)	45%	8.1 c	69.8 a	44.1 ab	5.0 a	12.5 b	54.6 a	19% b	587 b
1番草	(8/7区)	90%	7.2 c	65.2 b	41.2 bc	5.2 a	10.3 c	53.6 a	16% b	539 b
2番草	(8/7区)	0%	16.7 a	63.0 b	38.5 b	2.1 d				3060 a
2番草	(7/31区)	0%	13.4 b	66.0 a	40.5 ab	2.5 cd				1793 b
2番草	(7/23区)	6%	10.6 c	67.0 a	40.9 a	2.8 c				968 c
2番草	(7/17区)	36%	9.0 cd	67.4 a	41.6 a	3.7 b				632 c
2番草	(7/9区)	39%	8.1 d	67.5 a	41.9 a	4.5 a				427 c

2番草刈取日は9/10 NO₃-Nの単位はmg/kg乾物 1番草2番草それぞれで統計処理 a,b,c,d : P<0.05

B 2020年 1番草刈取日は同一日 2番草刈取日は4段階

	(2番草刈取日)	出穂率	CP%	aNDFom%	ADFom%	ADL%
2番草	(9/8区)	1~7%	8.2 a	62.8 c	36.6 c	3.2 b
2番草	(9/14区)	10~11%	7.0 ab	65.9 bc	39.8 bc	3.7 ab
2番草	(9/18,23区)	27~46%	6.5 b	67.7 bc	41.2 b	4.2 a
2番草	(9/23,18区)	53~78%	6.1 b	67.6 b	41.1 b	4.5 a
1番草		8~15%	6.6 ab	71.6 a	45.4 a	4.1 a

1番草を全区7/27に刈取り、2番草を区ごとに9/8~9/23に刈取り、出穂率で整理

1番草を含めて統計処理 a,b,c : P<0.05

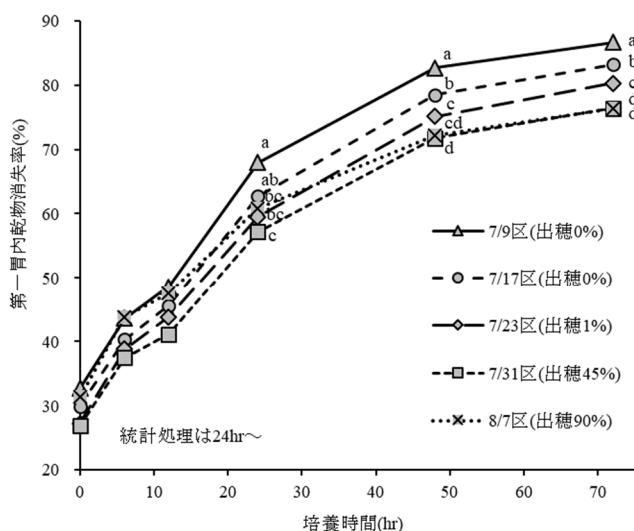


図1 1番草刈取り時期での消失率比較

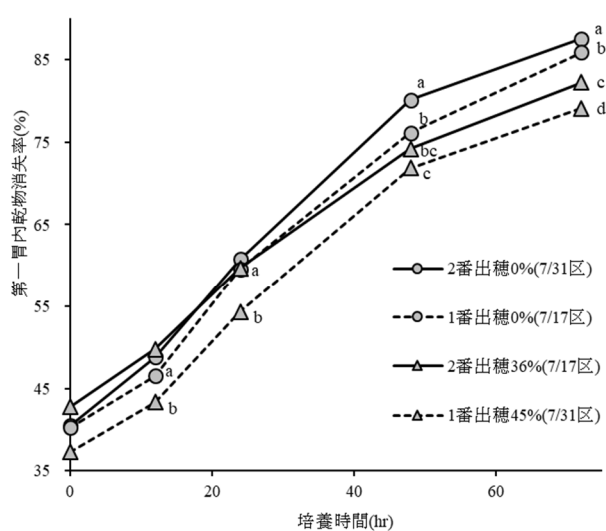


図2 2番草と1番草の消失率比較

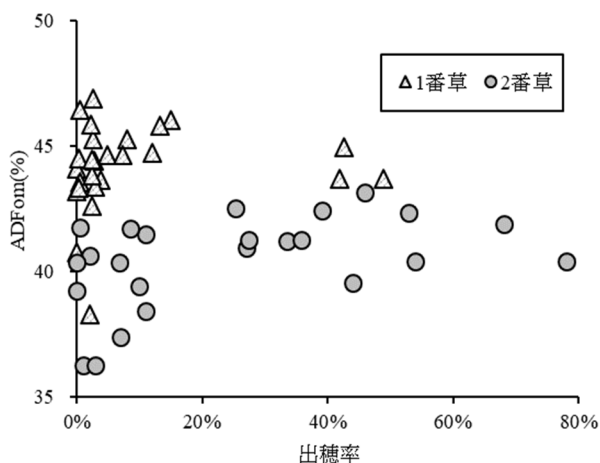


図3 ADFomと出穂率の関係

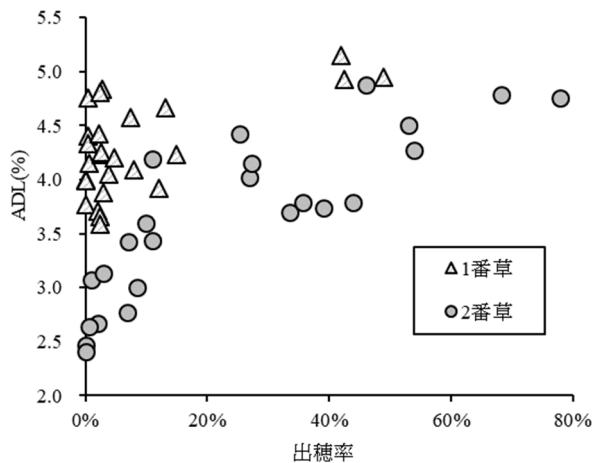


図4 ADLと出穂率の関係

表4 選好性試験結果

	刈取り日	ステージ	乳酸菌添加	開封時水分%	pH	Vスコア ¹⁾	CP %	ADL %	1~3日目採食量 ²⁾	4~5日目採食量 ²⁾	選好順位		
早刈無添加区	7/17	止葉37%	無し	79	5.1	48	8.4	3.3	0.243	A	-	1	
早刈添加区	7/17	止葉37%	有り	76	4.3	94	9.4	2.7	0.245	A	-	1	
遅刈無添加区	7/31	出穂50%	無し	61	4.7	97	8.1	4.0	0.042	B	0.075	b	4
遅刈添加区	7/31	出穂50%	有り	62	4.2	100	7.2	3.8	0.079	B	0.171	a	3

a,b : P<0.05 A,B : P<0.01

1) VBNはインドフェノール法で測定したアンモニア態窒素とした

2) 採食量はDMkg/時間・頭

表5 給与試験結果

	涼風サイレージ TMR(試験区)	スーダングラス TMR(対照区)
体重(kg)	557	555
乾物摂取量(kg/日)	19.0	19.4
乳量(kg/日)	25.4	25.3
乳成分率		
乳脂肪率(%)	4.2	4.2
乳タンパク質率(%)	3.4	3.3
体細胞数(千/ml)	15.1	12.6
第一胃液性状		
pH	6.7	7.0
NH ₄ -N濃度(mg/dl)	3.6	4.3
酢酸/プロピオン酸比	2.5	2.7
血液性状		
GOT(IU/L)	46	46
T-Cho(mg/dl)	192	197
T-Pro(g/dl)	7	7
BUN(mg/dl)	8	9

考察

1 番草刈取り時期の試験では、両年とも止葉抽出期以降の刈取りであれば合計乾物収量は刈取り時期に関わらずほぼ一定であったことから、止葉抽出期以降の刈取り時期が合計収量に及ぼす影響は小さいと考えられた。また、1 番草の第一胃内乾物消失率において、8/7 区で培養初期が高く 48 時間以降で低かったが、これは 8/7 区では出穂終期のため子実（デンプン）の充実により、相対的に繊維含量が減少したものと考えられた。1 番草 8/7 区

の ADFom 含量が 7/31 区に比べて低いこともこのことが要因と考えられた。これらのことと飼料成分値から繊維の消化性は 7/9 区>7/17 区>7/23 区>7/31 区>8/7 区であり、刈取り日（生育ステージ）が早いほど良質であると考えられた。止葉抽出期である 7/17 区と出穂期である 7/31 区の乾物消失率の差は 48 時間、72 時間とも約 7% であり、この数値が早刈りによる飼料価値向上の具体的な数値になると考えられる。

出穂率と ADFom および ADL の関係では、同程度の出穂率で比較した時 ADFom, ADL ともに 2 番草は 1 番草に比べ概ね低く、第一胃内乾物消失率は 2 番草が 1 番草に比べて高かったことから、同一ステージでは 2 番草は 1 番草に比べ消化性が高いと考えられた。また、表 3-B では、同年 1 番草出穂率と同程度の出穂率であるのは 9/14 区であるが、同程度の ADFom および ADL 含量であるのは 9/18 区~9/23 区であったことから、1 番草を刈取ったステージより 2 番草の刈取りを 7 日程度遅らせても 1 番草と同程度の飼料価値が得られると考えられた。これらのことから、2 番草を 1 番草より遅いステージで刈取り、相対的に 2 番草の収量を増やした方が嗜好性を確保しつつ、合計の乾物収量および栄養収量を高めることができると考えられる。また、2 番草を 1 番草より遅いステージで刈取ることは、倒伏しやすい 1 番草の生育期間に比べて倒伏しにくい 2 番草生育期間を相対的に増加させる

清水ら：スーダン型ソルガム「涼風」の刈取り時期の違いが収量、飼料成分等に及ぼす影響および家畜を通じた品質評価

ことによる気象リスクの軽減や、2 番草で高い硝酸態窒素（表 3-A）のリスク軽減にもなると考えられた。

選好性試験では、採食量に影響した要因が刈取り時期、水分いずれかは不明であるが、発酵品質に関わらず止葉抽出期・高水分で調製したサイレージの採食量が出穂期・中水分で調製したサイレージよりも有意に多かったこと、止葉抽出期以前での刈取りでは水分が高くなることが予想されるというのを考慮すると、採食量から見た望ましい刈取り時期は止葉抽出期であると考えられた。また、発酵品質は止葉抽出期刈取りでの嗜好性には影響しなかったが、不良発酵したサイレージを摂取する（摂取してしまう）ことによる悪影響を考慮すると、乳酸菌添加による発酵品質改善は意義があると考えられた。

給与試験では、今回の測定項目では止葉抽出期に収穫した「涼風」サイレージ TMR と購入スーダングラス乾草 TMR には差がみられなかったことから、止葉抽出期に収穫した「涼風」サイレージは購入スーダングラス乾草と同等に用いることができると考えられた。また、今回は測定していないが、脂溶性ビタミンの摂取量や購入飼料に対する一般的な自給飼料生産の利点といった点で「涼風」サイレージの優位性が考えられた。

以上のことから、台風等の気象リスクを回避しつつ、栽培面と飼料面の両方からみてバランスの良い刈取り時期は、1 番草が止葉抽出期、2 番草が 1 番草より遅い出穂始期であると考えられた。また、家畜の飼養面からみても 1 番草刈取り時期が止葉抽出期であれば嗜好性は高く、乳量や乳成分等にも悪影響はないと考えられた。ただし、表 3-A でも明らかのようにソルガムの早刈取りは硝酸態窒素のリスクがあり、ソルガムはトウモロコシ等に比べて硝酸態窒素が高いことが知られている^(8,9)ことから、SPAD 値や簡易測定で硝酸態窒素を確認後、利用することが望ましい。

引用文献

- (1) 気象庁データ
日本の年平均気温偏差の経年変化(1898～2021 年)
https://www.data.jma.go.jp/cpdinfo/temp/an_jpn.html
- (2) 気象庁データ
全国(アメダス)の 1 時間降水量 50mm 以上の年間発生回数
https://www.data.jma.go.jp/cpdinfo/extreme/extreme_p.html
- (3) 濃沼圭一 サイレージ用トウモロコシの高品質・耐倒伏性育種に関する研究. 九州沖縄農業研究センター

Journal of the Niigata Agricultural Research Institute No.20(2023) : 17-22

一報告 39: 79-125. (2001)

- (4) 佐藤ら サイレージ用トウモロコシ品種「タカネスター」の育成とその特性. 長野県中信農業試験場報告 18:11-24. (2008)
- (5) 清沢ら ソルガム新品種「涼風」の育成. 長野県畜産試験場研究報告 33:54-60. (2015)
- (6) 気象庁データ
日本の各地域における気候の変化
<https://www.data.jma.go.jp/tokyo/shosai/umi/kikouhenka/leaflet2021/pdf/niiigata-l2021.pdf>
- (7) 高野ら ソルガムとトウモロコシを組み合わせた作期分散技術によるリスク低減. 日本草地学会誌 66(4):233-241. (2021)
- (8) 原田ら 窒素多量施用条件下におけるソルガムの硝酸態窒素濃度の品種間差. 日本草地学会誌 43(4):449-451. (1998)
- (9) 中岡ら 飼料作物に対する牛ふんの施肥技術に関する試験. 神奈川県畜産試験場研究報告 83:43-63. (1993)

[報文]

ウシガラス化卵子由来胚における体外受精後の卵割状況が胚盤胞への発生 及び胚移植後の受胎性に及ぼす影響

山家崇・市川雄紀¹⁾・福留信司²⁾・中川浩

新潟県農業総合研究所畜産研究センター

1) 現在, 下越家畜保健衛生所, 2) 現在, 農業大学校

Effect of cleavage state after in vitro fertilization in embryos derived from bovine vitrified oocytes on blastocyst development and fertility after embryo transfer

Takashi YAMAGA, Yuki ICHIKAWA¹⁾, Shinji FUKUDOME²⁾, Hiroshi NAKAGAWA

Niigata Agricultural Research Institute Livestock Research Center

1) Niigata Kaetsu Livestock Hygiene Service Center

2) Niigata Prefectural Agricultural College

要約 超急速ガラス化保存した卵子（ガラス化卵子）を加温処理した後に体外受精を行い、卵割状況別の胚盤胞発生率を調査するとともに、簡易選別した体外受精胚（体外胚）の移植試験を行った。供試卵子は黒毛和種雌牛の生体内卵巣から超音波画像診断装置を用いた経膈採卵により採取した。体外受精開始から30時間後に卵割形態を分類し胚盤胞発生率を比較したところ、ガラス化卵子由来、新鮮卵子由来ともに正常卵割した胚が異常卵割した胚より有意に高い胚盤胞発生率を示した。また、体外受精開始から54時間後に胚を観察したところ、ガラス化卵子由来、新鮮卵子由来ともに6細胞以上であった胚は、5細胞以下であった胚と比較して、胚盤胞発生率が有意に高かった。体外受精開始から30時間後に正常卵割、54時間後に6細胞以上に卵割し、その後胚盤胞に発生した体外胚を新鮮胚移植あるいはガラス化保存し、後日加温後に移植（凍結胚移植）したところ、ガラス化卵子に由来する体外胚において新鮮胚移植、凍結胚移植いずれも60%を超える受胎率が得られた。本試験で11頭のガラス化卵子に由来する産子が得られたが、いずれの分娩産子にも奇形等の異常は認められなかった。

緒言

現在、優良牛の遺伝資源の保存は、精子及び受精卵で行われており、ウシ卵子に関しては、精子や受精卵の凍結ほど盛んに行われてはいない。ウシの繁殖技術において、精子や胚の保存だけでなく、受精前の卵子を低コストで長期間保存することが可能となれば、将来現れる能力の高い雄ウシの遺伝子と、能力の高い雌ウシの遺伝子を掛け合わせ、高能力の産子を得られる可能性がある。また、一個体から採取し保存した多数の卵子を同時に融解し体外受精を行うことで、希少精液の使用効率向上や産子の生産性向上が期待でき、その意義は大きい。一般的に、卵子の凍結保存には超急速ガラス化法が有効⁽¹⁾と

されているが、ガラス化保存した卵子（ガラス化卵子）の体外受精後の胚盤胞発生率は、ガラス化保存していない卵子（新鮮卵子）と比べ低く、ガラス化卵子の活用はあまり進んでいない。当センターでは、ナイロンメッシュを用いて保存したガラス化卵子からの胚生産が可能となったが⁽²⁾、ガラス化卵子由来の体外胚への発生率は新鮮卵子に比べ未だ低く、胚発生率のさらなる改善が必要である。当センターでは、細胞の一部（16～50%）が変性した低品質な胚（低ランク胚）の超急速ガラス化保存において、ラフィノース等を添加したガラス化液でガラス化後の生存率及び受胎率は良好な結果が得られており⁽³⁾、このガラス化液を卵子のガラス化時に利用することで、

山家ら：ウシガラス化卵子由来胚における体外受精後の卵割状況が胚盤胞への発生及び胚移植後の受胎性に及ぼす影響

ガラス化卵子の胚発生率が改善する可能性がある。

また、近年、体外受精後の胚の観察を経時的に観察できるタイムラプス観察装置を用い、体外受精後の初期卵割形態を観察することにより、新鮮胚移植で受胎性の高い体外胚を選別できることが示されている⁽⁴⁾。高山ら⁽²⁰¹⁷⁾⁽⁵⁾は、個別培養ディッシュを用いて体外受精後の簡易な胚の卵割形態の観察により、高価なタイムラプス観察装置を用いずとも受胎性の高い胚の選別が可能であるとしている。また、当センターでも、体外受精後の胚の卵割状況を簡易的に観察することで、凍結保存後において受胎性の高い体外胚の選別が可能であると報告した⁽⁶⁾。これらの報告のように体外受精後の胚の形態観察はその後の受胎性の高い胚選別方法として有効であることが示されているが、この方法をガラス化卵子に応用し、受胎性を調査した報告は見当たらない。

1992年に凍結卵子由来子牛の生産が報告されているが⁽⁷⁾、これまでガラス化卵子に由来する体外胚の移植により誕生した子牛は少ない。卵子凍結技術を畜産現場に普及させるには、ガラス化卵子の体外受精後の胚盤胞発生率の改善だけでなく、ガラス化卵子に由来する体外胚の受胎性及び移植産子の正常性を確認する必要がある。

そこで、本試験では、ガラス化卵子の胚発生率向上を図るため、ガラス化液の検討を行った。また、ガラス化卵子に由来する体外胚の受胎性向上のため、体外受精後に胚の形態観察を実施し、卵割形態別の胚盤胞発生率を新鮮卵子由来胚と比較するとともに、簡易選別した体外胚の移植試験を行い、生産胚の受胎性及び産子の正常性を確認した。

材料及び方法

1. 供卵牛及び供試卵子

(1) 供卵牛

当センター又は県内で飼養する黒毛和種経産牛及び未経産牛を本試験に供試した。なお、本試験において行った試験は、全て新潟県農業総合研究所畜産研究センター動物実験等実施規定に基づき実施した。

(2) 供試卵子

卵子採取は山家ら⁽⁶⁾の方法に準じて、経膈採卵(OPU)により供試牛の生体内卵巢から未成熟卵子を採取した。OPU実施牛にはリドカイン塩酸塩(キシロカイン注射液「2%」、アスベンジャパン)を用いて尾椎硬膜外麻酔を施した。17Gの採卵針を装着した7.5MHzプローブを膈内に挿入し、超音波画像診断装置で卵胞を確認しながら

採卵針を卵胞に穿刺し、吸引器により卵胞液とともに卵子を回収した。回収時の吸引圧は、80~90mmHgとした。回収液は、1%ウシ血清、10万単位/mLヘパリン及び抗生物質(ペニシリンGカリウム10万単位/mLと硫酸ストレプトマイシン0.1mg/mL)を加えた乳酸リンゲル液(ハルゼンV注射液、日本全薬工業)を用いた。吸引した回収液をフィルターでろ過洗浄した後、実体顕微鏡下で卵子の検索を行い、卵丘細胞が2層以上かつ透明帯周囲全体に付着しているものを選択した。

2. 体外成熟培養、体外受精及び体外発生培養

体外成熟培養(IVM)及び卵丘細胞の調整は山家ら⁽²⁾の方法に準じて実施した。すなわち、IVMには、0.02AU/ml卵胞刺激ホルモン(アントリン-R10、共立製薬)、0.6mg/mL L-カルニチン及び抗生物質を添加した5%新生子ウシ血清添加TCM199を成熟培地として用いた。成熟培地で卵子を洗浄後、流動パラフィンを重ねた成熟培地に、100µlあたり卵子20個となるよう卵子を導入し、38.5°C、5%CO₂、95%air及び湿度飽和状態で22~23時間成熟培養した。

IVM後、卵子を0.1%ヒアルロニダーゼ、0.3%牛血清アルブミン(BSA)、0.2mMピルビン酸ナトリウムを含むTCM199へ移し、60秒以内に細ピペットで穏やかにピペッティングすることにより卵丘細胞を1~2層程度に剥離した。

3. 卵子のガラス化保存

[対照区]

平衡液及びガラス化液は山家ら⁽²⁰²¹⁾⁽²⁾の方法に準じて作成した。TCM199にエチレングリコール(EG)、ジメチルスルホキシド(DMSO)、ショ糖、牛胎仔血清(FBS)を表1のように添加した溶液を用いた。

[試験区]

平衡液及びガラス化液は、市川ら⁽²⁰²²⁾⁽³⁾の方法を修正して作成した。PBS(+)にEG、DMSO、ショ糖、BSA、D(+)ラフィノース、ポリエチレングリコール(PEG)及びFBSを表1のように添加した溶液を用いた。

卵子のガラス化保存手技は山家ら⁽²⁰²¹⁾⁽²⁾の方法に準じて実施した。すなわち、IVM後に卵丘細胞を1~2層程度に剥離した卵子を平衡液中に入れ、3分後に卵子をガラス化液中に移した。ガラス化液中に投入後50~60秒の間に、卵子をガラス化保存用器具(自作器具:

山家ら⁽²⁰²¹⁾⁽²⁾のメッシュ部にガラス化液とともに置き、ただちに保存用器具ごと液体窒素中に投入してガ

ラス化した。

表1 各溶液の組成

溶液名	EG (%)	DMSO (%)	Suc (M)	PEG (%)	Raf (M)	BSA (%)	FBS (%)
平衡液	8.5	8.5	0.15	0.025	0.075	0.4	10
対照区 ガラス化液	17	17	0.3	0.05	0.15	0.4	10
試験区 平衡液	7.5	7.5	-	-	-	-	20
試験区 ガラス化液	15	15	0.5	-	-	-	20

Suc: ショ糖

Raf: D (+) ラフィノース

4. ガラス化卵子の加温及び修復培養

ガラス化した卵子を液体窒素中で1週間以上保存した後、対照区では20%FBS添加TCM199を、試験区では20%FBS添加PBS(+)を基礎液とし、ガラス化保存用器具の卵子搭載部分を38.5°Cに保温した0.5Mショ糖を含む基礎液中に60秒間浸漬することで加温した。その後、卵子を0.25Mショ糖を含む基礎液中に3分間、0.125Mショ糖を含む基礎液中に5分間及びショ糖を含まない基礎液中に5分間順次静置し、ガラス化液の希釈及び洗浄を行った。

加温後の卵子は、Yashiroら(2015)⁽⁸⁾の方法に基づき修復培養を実施した。つまり、5%FBS添加TCM199に0.2mMビルビン酸ナトリウム、0.3mM α -トコフェノール及び抗生物質を添加した修復培養液中で体外成熟培養と同様の気相条件下で、加温後の卵子を2時間培養した。培養後、細胞膜が破綻していない卵子を生存と判断し、体外受精を実施した。

5. 体外受精及び体外発生培養

体外受精には、供卵牛の血統情報に応じて、11頭の黒毛和種雄牛の凍結精液を使用した。凍結精液を38.5°Cの温湯中に15秒間浸漬した後、Matobaら(2014)⁽⁹⁾の方法に従い、パーコール密度勾配均衡法により生存精子の分離を行った。つまり、45%及び60%パーコール液を作成し、60%パーコール液上に45%パーコール液を重層した15ml遠沈管中に、精液ストロー内容物を重層し、740×gで10分間遠心分離した。遠心後、上清をアスピレーターで除去し、残った精子ペレットに5.5mlの媒精液(IVF100, 機能性ペプチド研究所)を加えて再懸濁し、540×gで5分間遠心分離した。遠心後、再び上清をアスピレーターで除去し、残った精子ペレットを精子濃度が500万/mlに

なるよう媒精液で調整し、精子浮遊液とした。成熟卵子は媒精液で洗浄後、流動パラフィンを重ねた35mmディッシュ中の精子浮遊液ドロップに100 μ lあたり成熟卵子20個となるよう導入し、38.5°C、5%CO₂、95%air及び湿度飽和状態で6時間媒精した。

体外受精後、接合子を微細ピペットで穏やかにピペッティングすることにより、透明帯の表面から卵丘細胞及び精子を除去し、体外発生培養を行った。発生培地には0.6mg/ml L-カルニチン及び5%NCSを添加したCR1aa⁽¹⁰⁾を用いた。接合子は発生培地で洗浄後、流動パラフィンを被覆した個別管理培養ディッシュ(LinKID micro25, 大日本印刷)の中央部に作製した発生培地ドロップ中で培養した。このとき、接合子は個別管理培養ディッシュの中央部にある25個の微細なウェルに1つずつ配置し、発生培地125 μ lあたり接合子25個となるよう導入し、38.5°C、5%CO₂、5%O₂、90%N₂及び湿度飽和状態で8日間培養した。

6. 卵割形態及び細胞数による分類

体外受精後の卵割形態観察は山家ら⁽³⁾の方法に準じて実施した。体外受精開始から30時間後に倒立顕微鏡を用いて、胚の割球観察を行い、卵割形態を確認するとともに、デジタルカメラを用いて胚を写真撮影した。撮影した胚を観察し、均等に卵割し、フラグメントがないものを正常卵割とし、3細胞以上に卵割しているもの、不均等に卵割しているもの、均等に卵割しているが、フラグメントを有するものを異常卵割とした^(11,12,13)(図1)。また、体外受精開始から54時間後においても胚の観察を行い、割球数が5細胞以下のものと6細胞以上のものに分類した。

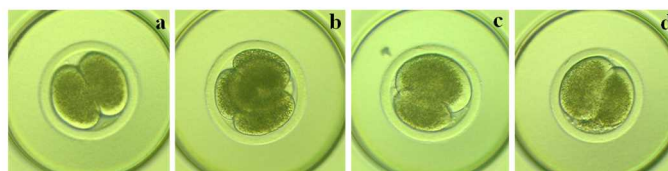


図1 卵割形態の分類

(a) 均等卵割 (b) 複数卵割 (c) 不均等卵割 (d) フラグメント
(a) を正常卵割、(b), (c), (d) を異常卵割とした

7. 体外胚のガラス化保存及び加温

体外受精日を0日として、体外受精後7~8日目に発生した胚盤胞又は拡張胚盤胞をガラス化保存した。ガラス化保存手技は、山家ら(2022)⁽⁶⁾の方法に準じ、市販のガラス化保存用器具(Cryotec Animal, リプロライフ)

山家ら：ウシガラス化卵子由来胚における体外受精後の卵割状況が胚盤胞への発生及び胚移植後の受胎性に及ぼす影響

を用いて実施した。20%FBS 添加 TCM199 を基礎液とし、基礎液に 7.5%EG, 7.5%DMSO を添加した平衡液中に胚を 5~10 分間浸漬した。平衡後、基礎液に 15%EG, 15%DMSO, 0.5M ショ糖を添加したガラス化液中に胚を移した。ガラス化液中に投入後 50~60 秒の間に、胚をガラス化保存用器具のシート部に約 0.1 μ l のガラス化液とともに置き、液体窒素中に投入して胚をガラス化保存した。加温は、胚を搭載したシート部分を液体窒素中から取り出し、直ちに 38.5°C に保温した 0.5M ショ糖を添加した基礎液中に 60 秒間浸漬することで行った。その後、胚を 0.25M ショ糖を添加した基礎液に 3 分間、0.125M ショ糖を添加した基礎液に 5 分間及び基礎液に 5 分間順次静置し、ガラス化液の段階希釈及び洗浄を行った。

8. 胚移植及び妊娠診断

受胎牛には当センター又は県内で飼養する黒毛和種及びホルスタイン種を用いた。発情後、7~8 日目の黄体側子宮角深部に注入カテーテルを使用し、胚移植を行った。移植胚は、体外受精開始から 30 時間後に正常卵割し、54 時間後に 6 細胞以上であった体外胚のうち、国際胚移植学会マニュアル⁽¹⁴⁾に基づく形態学的品質評価により、code1 又は 2 と判定した胚を用いた。胚移植は、体外胚を凍結せず移植する新鮮胚移植又は体外胚を再度ガラス化保存し、加温後に移植する凍結胚移植で行った。妊娠診断は、発情後から 60 日目以降に超音波診断装置を用いて、胎子とその心拍の確認により判定した。

9. 試験設計

(1) 試験 1 卵子ガラス化液の検討

試験 1 では、ガラス化液の違いによるガラス化卵子の加温後の体外受精成績について調査した。従来のガラス化液で卵子のガラス化を行ったものを対照区、ガラス化液の組成を変更したガラス化液で卵子のガラス化を行ったものを試験区とし、ガラス化加温後の卵子回収率並びに卵子生存率を比較した。また、生存していた卵子を体外受精した際の卵割率及び胚盤胞発生率を比較した。

(2) 試験 2 卵割形態及び細胞数別の胚盤胞発生率の比較

試験 2 では、卵子のガラス化処理を行ったものをガラス化卵子区、卵子をガラス化せず体外受精を行ったものを新鮮卵子区とし、体外受精後の卵子卵割数と胚盤胞発生数についてガラス化卵子と新鮮卵子で比較した。また、体外受精開始から 30 時間後に卵割形態を確認し、正常卵割した胚と異常卵割した胚の胚盤胞発生率を比較した。

加えて、体外受精開始から 54 時間後に胚の細胞数を確認し、5 細胞以下の胚と 6 細胞以上の胚の胚盤胞発生率を比較した。なお、ガラス化卵子区の卵子ガラス化方法は試験 1 の試験区と同様の方法で行った。

(3) 試験 3 作出した体外胚の胚移植後の受胎性調査

試験 3 では、ガラス化卵子又は新鮮卵子から作出した体外胚の移植試験を実施した。ガラス化卵子に由来する胚をガラス化卵子区、新鮮卵子に由来する胚を新鮮卵子区とし、体外胚の受胎率を比較した。なお、ガラス化卵子区の卵子ガラス化方法は試験 1 の試験区と同様の方法で行った。また、出生したガラス化卵子由来産子について、在胎日数及び生時体重を調査した。

10. 統計解析

試験 1 では、ガラス化卵子の回収率と生存率並びに体外受精後の卵割率及び胚盤胞発生率を、 χ^2 検定により比較した。試験 2 では、ガラス化卵子と新鮮卵子の卵割数と胚盤胞発生率並びにガラス化卵子由来胚と新鮮卵子由来胚の胚盤胞発生率を、 χ^2 検定により比較した。試験 3 では、フィッシャーの正確確率検定を用いて、ガラス化卵子由来体外胚と新鮮卵子由来体外胚の受胎率を比較した。

結果

1. 試験 1 卵子ガラス化液の比較

OPU により採取した生体内卵巣由来卵子を体外成熟後にガラス化し、加温及び修復培養した際の卵子回収率並びに卵子生存数を表 2 に示した。試験区で 2 個、対照区で 1 個の卵子を紛失したが、回収率に有意な差は見られなかった。修復培養後の卵子生存率は、試験区が 89.3%、対照区が 92.2%であり、有意な差は見られなかった。

表 2 ガラス化卵子の回収率及び生存率

区分	OPU 実施頭数	ガラス化卵子数	回収卵子数 (回収率 ^a)	生存卵子数 (生存率 ^b)
試験区	4	226	224 (99.1%)	200 (89.3%)
対照区	4	155	154 (99.4%)	142 (92.2%)

a : 回収率は回収卵子数/ガラス化卵子数

b : 生存率は生存卵子数/回収卵子数

また、生存していた卵子を体外受精した際の卵割数及び胚盤胞発生数を表3に示した。体外受精後の卵割率は、試験区68.0%が対照区58.5%に比べ、高い傾向(P=0.092)にあった。胚盤胞発生率は、試験区が41.0%、対照区が35.9%で、試験区が高かったものの有意な差は見られなかった。

表3 生体内卵巣由来ガラス化卵子の体外受精成績

区分	発生培養 卵子数	分割数 (分割率)	胚盤胞発生数 (胚盤胞胚発生率)
試験区	200	136 (68.0%)	82 (41.0%)
対照区	142	83 (58.5%)	51 (35.9%)

2. 試験2 卵割形態及び細胞数別の胚盤胞発生率

OPUにより採取した卵子をガラス化し、加温、修復培養後に体外受精したガラス化卵子区とガラス化を行っていない新鮮卵子を体外受精した新鮮卵子区における試験区別全体の卵割数及び胚盤胞発生数を表4に示した。体外受精後の卵割率は、ガラス化卵子区(68.5%)が新鮮卵子区(78.8%)に比べ有意に低かった。また、胚盤胞発生率についても、ガラス化卵子区(38.3%)が新鮮区(49.5%)に比べ、有意に低かった。

表4 ガラス化卵子及び新鮮卵子の体外受精成績の比較

区分	OPU 実施 頭数	発生 培養 卵子数	分割数 (分割率)	胚盤胞発生数 (胚盤胞胚発生率)
ガラス化 卵子区	9	321	220 (68.5%) ^b	123 (38.3%) ^b
新鮮 卵子区	9	198	156 (78.8%) ^a	98 (49.5%) ^a

a,b: 異符号間に有意差あり (P<0.05)

体外受精開始から30時間後に卵割形態を観察した際の卵割形態別の胚盤胞発生数を表5に示した。ガラス化卵子区における胚盤胞発生率は正常卵割した胚が75.7%、異常卵割した胚が49.4%であった。一方、新鮮卵子区における胚盤胞発生率は正常卵割した胚が74.4%、異常卵割した胚が57.9%であり、両区ともに正常卵割した胚が異常卵割した胚より有意に高い胚盤胞発生率を示した。また、正常卵割した胚の胚盤胞発生率は両区で同等の胚盤胞発生率を示した。

表5 体外受精開始から30時間後の卵割形態別の胚盤胞発生率の比較

区分	卵割形態	供試数	胚盤胞発生数 (胚盤胞胚発生率)
ガラス化 卵子区	正常卵割	103	78 (75.7%) ^A
	異常卵割	79	39 (49.4%) ^B
新鮮 卵子区	正常卵割	78	58 (74.4%) ^a
	異常卵割	57	33 (57.9%) ^b

A,B: 異符号間に有意差あり (P<0.01)

a,b: 異符号間に有意差あり (P<0.05)

体外受精開始から54時間後に胚の細胞数を観察した際の細胞数別の胚盤胞発生数を表6に示した。ガラス化卵子区における胚盤胞発生率は5細胞以下であった胚が39.8%、6細胞以上であった胚が71.4%であった。一方、新鮮卵子区における胚盤胞発生率は5細胞以下であった胚が44.4%、6細胞以上であった胚が72.5%であり、ガラス化卵子区、新鮮卵子区ともに6細胞以上であった胚が5細胞以下であった胚より有意に高い胚盤胞発生率を示した。また、体外受精開始から54時間後に6細胞以上であった胚の胚盤胞発生率は、両区で同等の胚盤胞発生率を示した。

表6 体外受精開始から54時間後の細胞数別の胚盤胞発生率の比較

区分	細胞数	供試数	胚盤胞発生数 (%)
ガラス化 卵子区	5細胞以下	108	43 (39.8%) ^B
	6細胞以上	112	80 (71.4%) ^A
新鮮 卵子区	5細胞以下	54	24 (44.4%) ^D
	6細胞以上	102	74 (72.5%) ^C

A,B: 異符号間に有意差あり (P<0.01)

C,D: 異符号間に有意差あり (P<0.01)

3. 試験3 作出した体外胚の胚移植後の受胎性

本試験で実施した胚移植の試験成績を表7に示した。ガラス化卵子区では、ガラス化卵子から作出した胚を受胎牛17頭(新鮮胚移植:4頭、凍結胚移植:13頭)に移植したところ、11頭が受胎し、受胎率は64.7%(新鮮胚移植:75.0%、凍結胚移植:61.5%)であった。一方、新鮮卵子区では、新鮮卵子から作出した胚を受胎牛16頭(新鮮胚移植:1頭、凍結胚移植:15頭)に移植したところ、11頭が受胎し、受胎率は68.7%(新鮮胚移植:100.0%、

凍結胚移植：66.7%)であり、両区間に有意な差は見られなかった。

ガラス化卵子に由来する体外胚の胚移植により得られた産子の在胎日数と生時体重を表8に示した。獣医師の判断により分娩誘起を実施したものも含むが、平均在胎日数(平均値±標準誤差)は、293.6±1.1日(雌：291.3±1.8, 雄：294.5±1.4)であり、また、出生した産子の平均生時体重(平均値±標準誤差)は37.3±1.4kg(雌：30.7±2.4, 雄：38.3±1.4)であった。分娩産子に奇形等の異常は認められず、本試験で11頭のガラス化卵子に由来する産子が得られた(図2)。

表7 体外胚の移植試験成績

区分		移植頭数	受胎頭数 (受胎率)
ガラス化 卵子区	新鮮胚移植	4	3 (75.0%)
	凍結胚移植	13	8 (61.5%)
	計	17	11 (64.7%)
新鮮 卵子区	新鮮胚移植	1	1 (100.0%)
	凍結胚移植	15	10 (66.7%)
	計	16	11 (68.7%)

表8 ガラス化卵子に由来する体外胚の胚移植により生まれた産子の在胎日数及び生時体重

性別	出生頭数	在胎日数	生時体重 (kg)	備考
雌	3	291.3±1.8	30.7±2.4	
雄	8	294.5±1.4	38.3±1.4	分娩誘起 3頭含む
計	11	293.6±1.1	37.3±1.4	

平均値±標準誤差



図2 ガラス化卵子から生産した子牛

考察

試験1において、ガラス化液の組成を変更して卵子のガラス化を実施したところ、体外受精後の卵割率が向上する傾向が得られたが、胚盤胞発生率の向上は見られなかった。超急速ガラス化保存は、細胞を微量の高濃度のガラス化液と共にガラス化保存容器に付着させ、液体窒素に投入したときの冷却速度を飛躍的に高める方法であ

る。細胞が大きく、水分の多い卵子のガラス化保存は、高濃度の耐凍剤を使用し、微量のガラス化液で細胞内を脱水することと、高濃度の耐凍剤の毒性増加の相反する条件を克服する必要がある。Erogluら(2010)⁽¹⁵⁾は、マウス卵子の凍結保存において、凍害防止剤であるDMSOに糖類であるラフィノースを併用することで、高い受精率と胚発生率が得られると報告している。この報告では、糖類の併用により、低濃度の耐凍剤でも十分な凍結保護を得ることができようになり、高濃度の耐凍剤による毒性を防ぐことができる可能性を指摘している。また、O'neilら(1997)⁽¹⁶⁾はマウス卵子の凍結保存において、DMSOによるガラス化液にPEGを添加することで、凍結保存後の卵子の生存率が改善すると報告しており、PEGの添加によりガラス化に必要な耐凍剤濃度を低減できるとしている。今回の試験区のガラス化液には、ラフィノースとPEGをともに添加していたが、耐凍剤濃度が高濃度であったため、耐凍剤の毒性というデメリットを回避できず、胚盤胞発生率に差がみられなかった可能性がある。EGやDMSOといった耐凍剤とラフィノース並びにPEGの相対的な濃度を検討し、耐凍剤の濃度を減少させることで、ガラス化卵子の体外受精成績を改善できる可能性が考えられ、胚盤胞発生率の向上を目指して今後更なる研究が必要と思われた。

試験2において、ガラス化卵子の体外受精後の卵割率及び胚発生率は、新鮮卵子に比べ有意に低かったものの、38.3%の胚盤胞発生率が得られ、ガラス化卵子からの体外胚生産は十分可能であった。体外胚の生産過程において、体外受精開始から30時間後の卵割形態を観察したところ、ガラス化卵子由来胚と新鮮卵子由来胚ともに正常卵割した胚が異常卵割した胚より有意に高い胚盤胞発生率を示し、正常卵割したガラス化卵子由来胚は正常卵割した新鮮卵子由来胚と同等の胚盤胞発生率を示した。また、体外受精開始から54時間後の細胞数を観察したところ、ガラス化卵子由来胚と新鮮卵子由来胚ともに6細胞以上であった胚が5細胞以下であった胚より有意に高い胚盤胞発生率を示し、6細胞以上であったガラス化卵子由来胚は6細胞以上であった新鮮卵子由来胚と同程度の胚盤胞発生率を示した。これらのことから、体外受精後のガラス化卵子由来胚の卵割状況を観察することで、新鮮卵子由来胚と同等の高い胚盤胞発生能を有する胚の選別が可能であると推察された。中橋ら(2019)⁽¹²⁾は正常卵割と異常卵割を比較すると、正常卵割において胚盤胞発生率が高値であったと報告している。また、高山ら(2017)⁽⁵⁾は、異常卵割において、フラグメントを有す

山家ら：ウシガラス化卵子由来胚における体外受精後の卵割状況が胚盤胞への発生及び胚移植後の受胎性に及ぼす影響

る胚や不均等な卵割をした胚は、正常卵割した胚に比べ、胚盤胞発生率が低下すると報告している。さらに、Sugimura ら (2012) (4) は、体外受精開始から 56~67 時間後に始まる卵割休止期において、細胞数が 4-5 細胞の胚は、染色体異常が認められる割合が高く、8-16 細胞の胚と比べて、体外胚の内細胞塊及び総細胞数が有意に少なく、アポトーシス発生率が高くなると報告している。これらは新鮮卵子を用いた報告であるが、本試験においても新鮮卵子の場合と同様の結果が得られており、ガラス化卵子においても異常卵割を示した胚は胚盤胞発生率が低下し、体外受精開始から 54 時間後に 5 細胞以下であった胚は、胚盤胞発生率が低下していることから、新鮮卵子と同様に染色体異常等が起きているものと推察された。

日本におけるウシ体外胚の受胎率は、およそ 40%で推移¹⁷⁾しているが、本試験においては、ガラス化卵子に由来する体外胚の移植試験で、新鮮胚移植並びに凍結胚移植合わせて 64.7%の受胎率が得られた。新鮮卵子由来胚において、正常卵割を示した体外胚は、異常卵割を示した体外胚に比べ、受胎率が高いことが知られている^(6,11,18)。本試験においても、正常卵割に由来する体外胚を移植胚に利用したため、高い受胎率が得られたと思われる。また、体外胚の凍結法として一般的な緩慢凍結法ではなく、凍結後の生存性及び受胎性が高い超急速ガラス化法⁽¹⁹⁾を用いたことも要因の 1 つとして挙げられる。体外受精開始から 30 時間後に正常卵割した胚及び 54 時間後に 6 細胞以上であった胚においては、ガラス化卵子由来胚は新鮮卵子由来胚と同程度の胚盤胞発生能を有し、移植試験において体外胚の受胎性に差は見られなかった。新鮮卵子由来体外胚と同様に、ガラス化卵子由来体外胚においても、体外受精後の卵割状況を観察することで胚盤胞発生能だけでなく、受胎性の高い胚を選別できる可能性が示唆され、卵割状況の観察がガラス化卵子を利用した産子の効率的生産における有用な指標になると思われる。新鮮卵子においては、体外受精開始から卵割開始までの時間が短い胚は受胎率が高いとの報告⁽⁴⁾があり、卵割形態や細胞数と同様に卵割時間もガラス化卵子由来胚の受胎性と関係している可能性がある。今後は、ガラス化卵子由来胚の受胎性の更なる向上を目指し、卵割時間も含めて検証していく必要があると思われる。

本試験における胚移植により 11 頭のガラス化卵子に由来する産子が得られた。得られた産子の在胎日数は、過去に黒毛和種の体外胚の移植産子について調査した報告⁽²⁰⁾とほぼ同様であり、生時体重についてもこれまで

の調査報告⁽²¹⁾とほぼ同等であった。また、分娩産子に奇形等の異常も認められなかったことから、ガラス化卵子から生産した体外胚の産子正常性については問題ないと推察された。しかし、体外胚の移植により妊娠した場合、胎子の成長異常(過大子)が多いとの報告⁽²²⁾があり、本試験においても獣医師の判断で分娩誘起を行った例もあることから、ガラス化卵子に由来する産子の分娩の際にも、過大子に注意し、状況によっては分娩誘起を検討する必要があると思われる。

以上より、ガラス化液の変更を行うことでガラス化卵子の胚発生率を向上させることはできなかったものの、ガラス化卵子においても体外受精後の卵割状況を簡易的に観察することで新鮮卵子と同等の胚盤胞発生能の高い胚並びに受胎性の高い胚を選別できる可能性が示唆された。また、産出された産子 11 頭に卵子ガラス化の影響は見られず、異常は認められなかった。これらのことから、ガラス化卵子に由来する体外胚を利用した産子生産に体外受精後の卵割状況による胚の選別技術は有用であると思われる。

謝辞

本試験を実施するにあたり、供卵牛の提供にご協力いただいた県内畜産農家の皆様並びに胚移植の受胎牛提供にご協力いただきました新潟県農業大学校、県内畜産農家の皆様に深謝いたします。

引用文献

- (1) Kuwayama M, Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos : the Cryotop method, Theriogenology, 67, 73-80, (2007)
- (2) 山家崇ら, ナイロンメッシュを用いたウシ成熟未受精卵の超急速ガラス化保存, 新潟県農業総合研究所研究報告, 18, 47-53, (2021)
- (3) 市川雄紀ら, ウシ低ランク胚の緩慢凍結及び超急速ガラス化保存におけるダイレクト移植時の受胎率の比較, 新潟県農業総合研究所研究報告, 19, 75-79, (2022)
- (4) Sugimura S., et al. Promising system for selecting healthy in vitro-fertilized embryos in cattle, PLoS ONE, 7(5), e36627, (2012)
- (5) 高山茉莉ら, 牛体外受精由来胚の卵割形態が胚の発生及び新鮮胚移植の受胎率に及ぼす影響, 日本胚移植学雑誌, 39(2), 73-80, (2017)
- (6) 山家崇ら, 体外受精後の割球観察による黒毛和種体外受精胚の簡易選別方法の検討, 新潟県農業総合研究所研

究報告, 19, 80-87, (2022)

(7) Fuku E., et al. In vitro fertilization and development of frozen-thawed bovine oocytes, *Cryobiology*, 29, 485-492, (1992)

(8) Yashiro I., et al. High revivability of vitrified-warmed bovine mature oocytes after recovery culture with α -tocopherol, *Reproduction*, 149, 347-355, (2015)

(9) Matoba S., et al. Optimizing production of in vitro matured oocytes from superstimulated Holstein cows for in vitro production of embryos using X-sorted sperm, *Journal of Dairy Science*, 97, 743-753, (2014)

(10) ソムファイ タマスら, 発生培地へのL-カルニチン添加は牛体外受精卵の胚盤胞期への発生率と耐凍性を高める, *畜産技術*(696), 2-5, (2013)

(11)江頭潤将ら, 高い受胎率が望める体外胚生産技術の確立(第2報)-胚の継時的観察による高品質胚の選別手法の検討-, 佐賀県試験成績書, 第54号, 10-12, (2018)

(12)中橋冬陽ら, ウシ体外受精胚生産における高品質胚の簡易判別技術の開発と培養液の改善, 千葉県畜産総合研究センター研究報告, 第19号, 1-6, (2019)

(13) Somfai T., et al. Relationship between the length of cell cycles, Cleavage pattern and developmental competence in bovine embryos generated by in vitro fertilization or parthenogenesis. *Journal of Reproduction and Development*, 56(2), 200-207, (2010)

(14) Robertson I, Nelson RE, Certification and identification of embryos. In: Stringfellow DA, Givens MD (eds.), *Manual of the international embryo transfer society*. 4th edition, Champaign: International Embryo Transfer Society, 86-105, (2010)

(15) Eroglu A, Cryopreservation of mammalian oocytes by using sugars: Intra-and extracellular raffinose with small amounts of dimethylsulfoxide yields high cryosurvival, fertilization, and development rates. *Cryobiology*, 60(3), S54-S59.,(2010)

(16) O'neil L., et al. Vitrification of mature mouse oocytes: improved results following addition of polyethylene glycol to a dimethyl sulfoxide solution. *Cryobiology*, 34(3), 295-301, (1997)

(17) 農林水産省, 牛受精卵移植実施状況, http://www.maff.go.jp/j/chikusan/sinko/lin/1_katiku/attach/pdf/index-10.pdf, 2022,11,5

(18) Sugimura S., et al. Time-lapse cinematography-compatible polystyrene-based microwell culture system: a *Journal of the Niigata Agricultural Research Institute* No.20(2023) : 23-30

novel tool for tracking the development of individual bovine embryos. *Biology of reproduction*, 83(6),970-978,(2010)

(19) 橋谷田豊ら, Cryotop を用いた超急速ガラス化がウシ体外受精胚の生存性及び受胎性に及ぼす影響, 第104回日本繁殖生物学会大会講演要旨集, 1116-1116,(2011)

(20) Numabe T., et al. Birth weight and gestation length of Japanese black calves following transfer of embryos produced in vitro with or without co-culture. *Journal of Veterinary Medical Science*, 63(5), 515-519, (2001)

(21)片岡妃奈ら,黒毛和種繁殖牛における後産排出時間と後産重量, 子牛生時体重の関係, 第4回日本胚移植技術研究大会講演要旨集,27-27,(2021)

(22) 塩谷康生,牛の体外受精技術,農林水産研究技術ジャーナル,21(9),17-24, (1998)

[ノート] 水稲有機栽培における出穂期後の条間除草による雑草発生量削減効果

大峽広智
新潟県農業総合研究所基盤研究部

Reduction of Paddy Field Weed Emergence Quantity by Interrow Space Weeding after Heading Stage in Organic Rice Production

Hiroto OHBA
Niigata Agricultural Research Institute, Agro-Environment Research Division

緒言

農林水産省が令和3年5月に策定した「みどりの食料システム戦略」⁽¹⁾において、2050年までに目指す姿のひとつとして「耕地面積に占める有機農業の取組面積を25%に拡大する」ことが示されており、有機農業の拡大が今後の重要な課題となっていくことが予想される。

水稲の有機栽培に取り組むうえで最も困難な課題は雑草対策であり、この対策を効果的に実施できない限り有機栽培における安定した経営は望めない。そのため、雑草対策としては成苗移植や2回代かき、深水管理等栽培的な対策のほか、動力除草機やチェーン除草機等様々な除草方法が提案されている⁽²⁾。しかし、ほとんどの除

草方法は田植えから約1か月間の生育初期に実施するものであり、水稲生育後半に有効な雑草対策はまだ確立されていない。そのため、初期除草がうまく実施できず、雑草が繁茂してしまっても、有効な対策を講じることができず、最終的に収量が大幅に減少してしまったという事例も多く、生育後半（特に出穂期後）に有効な除草技術の確立が求められている。

そこで、出穂期後に条間の雑草を芝刈り機のような機械で刈り取ることで、当年や翌年以降の雑草発生量を削減する方法を検討した結果について報告する。

材料および方法

1. 供試ほ場

試験は令和元年度から3年度に、新潟県農業総合研究所内の有機栽培ほ場および十日町市の現地農家ほ場で実施した。なお、十日町市の現地農家ほ場は有機JAS認証を取得しているほ場である。

いずれのほ場も供試水稲品種はコシヒカリBLである。両ほ場の栽培管理の概要を表1に示す。

2. 出穂期後の条間除草

両ほ場とも出穂期約1週間後までに（表1）、落水した水田において、家庭用芝刈り機（BPB-1800：リョービ販売株式会社）を用いて、稲の条間の雑草を田面から高さ2～3cmの辺りで刈り取った（図1）。刈った雑草はほ場外に持ち出さず、その場に放置した。また、条間除草が翌年の雑草発生量に与える影響を調査するため、条間

表1 供試ほ場の栽培概要

ほ場	栽培作業	作業実施日		
		R元	R2	R3
所内	基肥 ^{※1}	4/18	4/17	4/6
	田植	5/24	5/28	5/27
	追肥&除草 (菜種油かす 2.5kg N/10a)	5/27	5/29	5/28
	除草(表層拡販型除草機 ^{※2})	5/27～6/26	5/31～6/28	5/30～6/17
	穂肥(1.5kg N/10a)	7/18	8/5	8/4
	出穂期	8/3	8/11	8/7
十日町	条間除草	8/6	8/19	8/11
	基肥(3.6kg N/10a)	5/7	5/6	5/6
	田植	6/1	6/10	6/10
	除草(表層拡販型除草機 ^{※2})	6/4～6/30	6/15～6/25	6/15～6/25
	穂肥(1.2kg N/10a)	7/30	8/11	8/1
	出穂期	8/15	8/18	8/12
	条間除草	8/21	8/26	8/17

※1 R元及びR2:2.4kg N/10a、R3:1.2kg N/10a

※2 『令和4年度研究成果情報 水稲有機栽培用の新しい除草機「表層攪拌型除草機」』参照



図1 条間除草に用いた芝刈り機（左）、除草作業（中央）及び条間除草イメージ（右）図1

除草有りと無しの試験区配置は3年間固定して実施した。

3. 雑草発生量および収量調査

雑草発生量は、各供試ほ場の幼穂形成期および成熟期に一定面積（60cm×60cm：3条間×5株間程度）内の雑草をすべて採取し、泥等を水洗いしたのち、草種別に分類して、75℃で2日以上乾燥した後の乾物重を測定した。また、各試験区において、成熟期に水稻の収量調査も行った。

実験結果および考察

1. 条間除草の有無による成熟期の雑草発生量

所内の成熟期における雑草乾物重を図2に、十日町の結果を図3に示す。なお、所内の令和2年度については、中干し時期（7月上中旬）の断続的な降雨の影響で過剰生育になり、成熟期（9/18）の20日前には稲が倒伏しはじめ、最終的に甚倒伏になった。そのため、雑草が稲の下敷きになってほとんど枯死してしまったため、雑草発生量の調査が出来なかった。

確認された雑草は、所内ではノビエ、コナギ、ホタルイ、オモダカおよびアゼナの5種類、十日町ではノビエ、コナギ、オモダカおよびアゼナの4種類であった。いずれのほ場においても、出穂期後に条間除草を行うことで、除草を行わなかった場合に比べて成熟期の雑草乾物重が30～50%減少していた。また、草種による効果の違いも認められなかった。令和元年度の所内ほ場ではノビエが、十日町ほ場ではコナギが条間除草で増える傾向が認められたが、これはもともと条間除草無の調査地点にノビエやコナギが少なかったことに起因するもので、条間除草

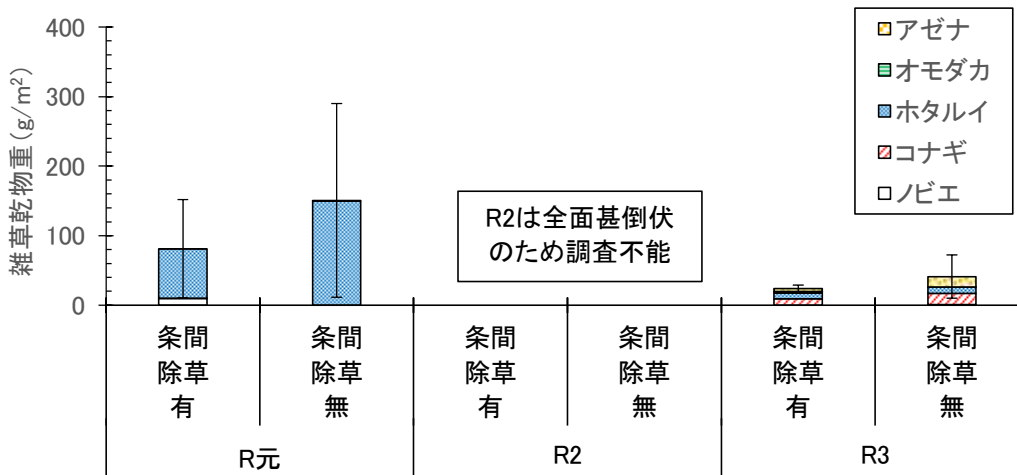


図2 成熟期の雑草乾物重〔所内:エラーバーはSD(n=3)を示す〕

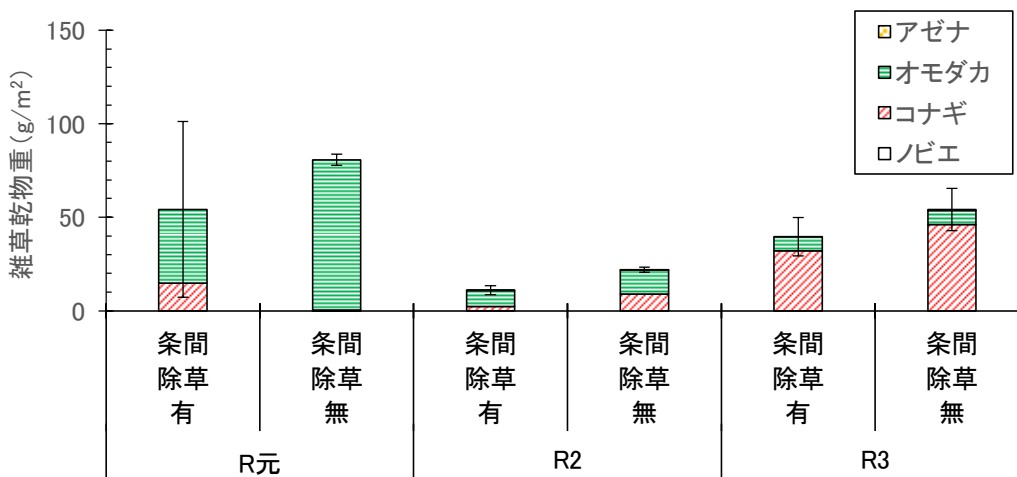


図3 成熟期の雑草乾物重〔十日町:エラーバーはSD(n=2)を示す〕

によって増えたものではないと考えられた。

2. 条間除草の有無による翌年の雑草発生量

前年度に条間除草を実施した試験区と無実施の試験区における翌年の幼穂形成期の雑草乾物重を図4（所内）および図5（十日町）に示す。

いずれのほ場においても、前年度の出穂期後に条間除草を実施した試験区のほうが雑草乾物重が少なくなった

ことから、出穂期後の条間除草は当年度だけでなく、翌年以降の雑草発生量の削減も見込めることが示唆された。

2. 条間除草の有無による収量

条間除草を実施した試験区と無実施の試験区における精玄米重を図6（所内）および図7（十日町）に示す。

条間除草の実施による明確な精玄米重の増加は認められなかった。

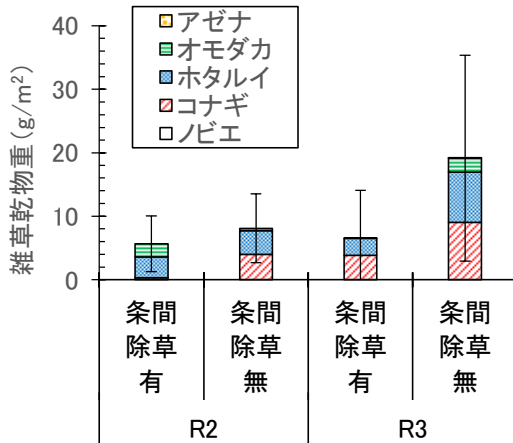


図4 幼形期の雑草乾物重
〔所内:エラーバーはSD(n=3)を示す〕

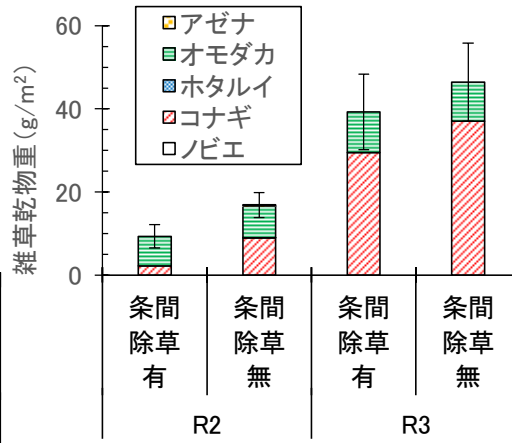


図5 幼形期の雑草乾物重
〔十日町:エラーバーはSD(n=2)を示す〕

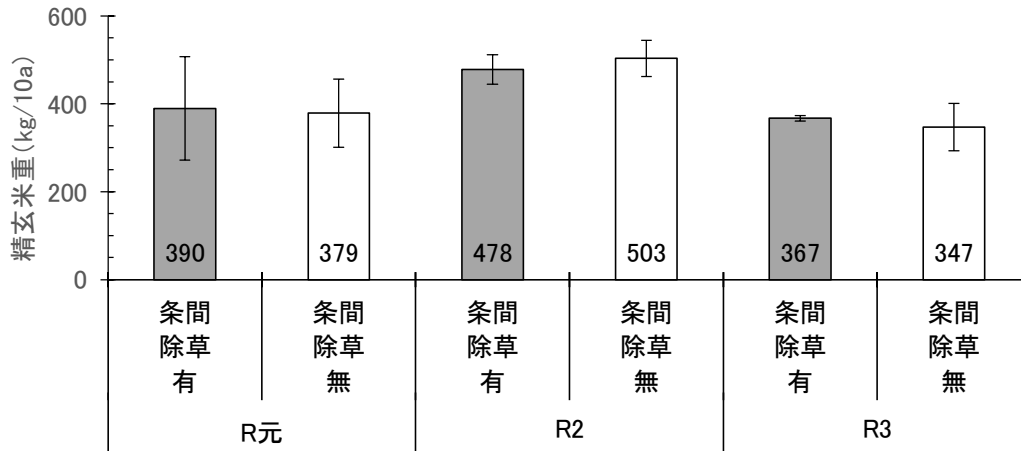


図6 精玄米重〔所内:エラーバーはSD(n=3)を示す〕

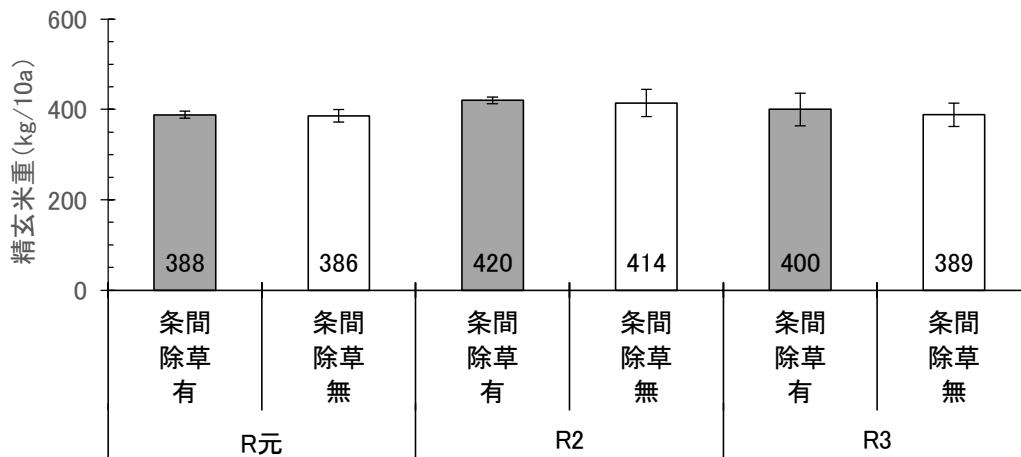


図7 精玄米重〔十日町:エラーバーはSD(n=2)を示す〕

以上の結果から、水稲有機栽培において出穂期後から1週間以内に条間の雑草を除草することで、当年の成熟期だけでなく、翌年以降の雑草発生量も減少することが示された。本試験では、水稲収量への明確な効果は認められなかったが、水稲有機栽培において雑草管理は最も重要な課題であり、出穂期後の条間除草によって雑草発生量を減らす技術は、水稲有機栽培の安定化に貢献できると考えられる。

一方で、本技術は1条間ずつ作業者が歩きながら除草する必要があり、10aあたりの作業時間は約4時間と8月の暑い時期に長時間の重労働を強いられる作業となる。また、供試した芝刈り機は濡れている草を刈ることを想定しておらず、水稲作付け期間の条間雑草を刈るのに適した機械ではないため、今後本技術をより省力的かつ安全に実施できるような機器の開発が望まれる。

謝辞

現地試験の実施に当たり、現地ほ場の所有者である生産者の皆様には栽培管理等でご協力いただきました。ここに深く感謝の意を表します。

引用文献

- (1) 農林水産省 2021, みどりの食料システム戦略～食料・農林水産業の生産力向上と持続性の両立をイノベーションで実現～, P. 6, 東京.
- (2) 新潟県農林水産部 2011, コシヒカリ BL における有機栽培の手引き. P. 20-29, 新潟.

[ノート]

酢酸ナトリウム抽出とカリウムイオンメーターによる土壌交換性カリの簡易測定法

小柳渉・清水翔太

新潟県農業総合研究所畜産研究センター

A Simple Method for Measuring Exchanged Soil Potassium by Using Sodium Acetate Solution Extraction and A Compact Potassium Ion Meter

Wataru OYANAGI and Shota SHIMIZU

Niigata Agricultural Research Institute Livestock Research Center

緒言

施設土壌や飼料畑土壌では交換性カリ含量の過不足が顕著である⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾⁽⁶⁾。交換性カリの過不足は、養分不足による生育障害の他、施設栽培ではミネラルバランスの悪化による生理障害⁽²⁾、飼料作では乾乳期におけるカリウム多量摂取による乳牛の低カルシウム血症⁽⁷⁾をもたらす。適切な値に保つためには、交換性カリ含量を頻りに測定することによってカリ施肥量や堆肥施用量を増減することが必要である。また、交換性カリの把握は蓄積したカリを考慮した減肥による肥料費節減にもつながる⁽⁸⁾。しかし、測定には分析委託または高価な分析機器と時間を要す。

近年、酢酸アンモニウム抽出後小型カリウムイオンメーターを用いることで交換性カリ含量を簡易・迅速に測定できることが報告されている⁽⁹⁾が、抽出液に含まれるアンモニア態窒素がイオンメーターのブランク値やベースラインに大きく影響するため測定前希釈や連続測定時の洗浄を必要とする。そこで、抽出液を 1M 酢酸ナトリウム溶液に変更し、その適用性と測定精度について検討した。

材料及び方法

土壌は新潟県内より採取した施設土壌と飼料畑土壌の風乾細土計 20 点（交換性カリ含量 9~243mg/100g 乾土）を用いた。

常法値は 12.5 倍の 1M 酢酸アンモニウム（風乾細土 2.0g : 1M 酢酸アンモニウム溶液 pH7.0 25ml）で 1 時間振とう抽出⁽¹⁰⁾後、原子吸光法（日立ハイテクサイエンス社製 ZA3000）で測定した。

簡易法として、12.5 倍の 1M 酢酸ナトリウム（風乾細土

2.0g : 1M 酢酸ナトリウム溶液 pH7.0 25ml）で 30 分振とう抽出後、原子吸光法で測定することでカリ抽出率を測定した。さらに抽出液をカリウムイオンメーター（HORIBA B-731）に直接滴下し、表示される値よりブランク値を差し引くことにより簡易法値を求めた。

結果及び考察

1. 酢酸ナトリウムによる土壌交換性カリの抽出

土壌試料 6 点（いずれも飼料畑土壌）を用い、1M 酢酸ナトリウム溶液で抽出されたカリを原子吸光法で測定し図 1 に示した。常法値と酢酸ナトリウム溶液で抽出されたカリの間に原点を通る決定係数 0.994 の極めて高い正の相関関係が認められた。回帰式の係数が 0.842 であったことから、12.5 倍の 1M 酢酸ナトリウム溶液 30 分振とうでのカリ抽出率は 84% で安定していると考えられた。

また、抽出液濃度や抽出倍率を変えてカリ抽出率をカリウムイオンメーターで推定した結果、抽出液濃度や抽出倍率が低くなるほど抽出率が低下したことから、抽出液濃度と抽出率は一定にすることが必要と考えられた（データ略）。

これらのことから、本法での抽出濃度と抽出倍率は、12.5 倍量の 1M 酢酸ナトリウム（風乾細土 2.0g : 1M 酢酸ナトリウム溶液 pH7.0 25ml）を用いることとした。

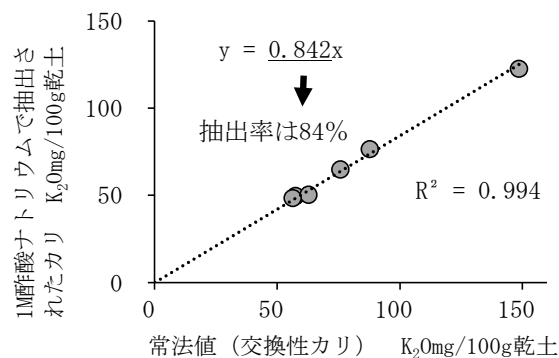


図 1 12.5 倍の 1M 酢酸ナトリウム 30 分振とうによる土壌交換性カリの抽出率

2. 1M 酢酸ナトリウム溶液がカリウムイオンメーターのブランク値と表示値に与える影響

カリウム標準液を用いた濃度添加法により、1M 酢酸ナトリウム溶液下におけるカリウムイオンメーターのブランク値と 1M 酢酸ナトリウム溶液が表示値に与える影響を評価した（図 2）。ブランク値は 8 であり測定前の希釈は必要ないと判断した。カリウム濃度に対するイオンメーター

の表示値の比は0.63であったことから、1M酢酸ナトリウム溶液下においてはイオンメーター値を補正係数0.63で除すことにより抽出液中カリウム濃度を推計することができると考えられた。また、連続測定においてカリウムイオンメーターのベースラインは変動しなかった。

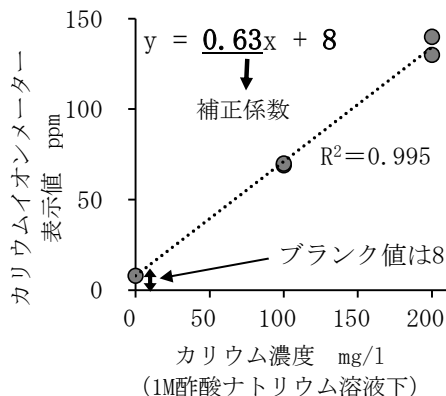


図2 1M酢酸ナトリウム溶液下におけるカリウムイオンメーターのblank値と表示値低下度合い

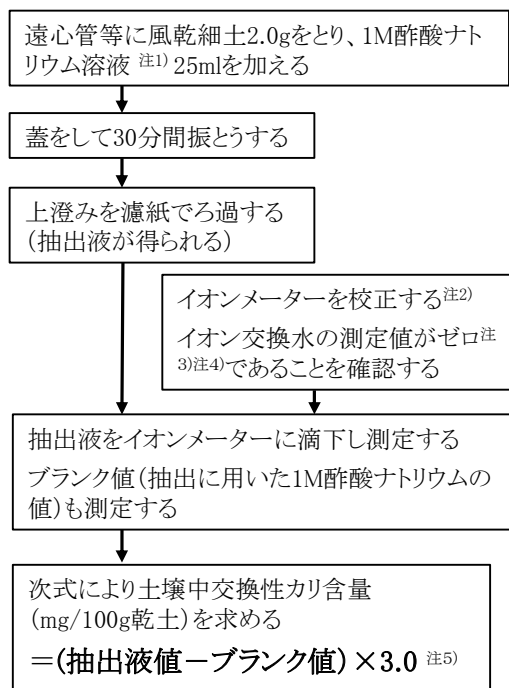
3. 酢酸ナトリウム抽出とカリウムイオンメーターによる土壌交換性カリの簡易測定法

以上の結果から抽出液に1M酢酸ナトリウム溶液を用いることができると判断し、簡易測定手法を構築した(図3)。風乾細土2.0gに1M酢酸ナトリウム溶液25mlを加え、

30分間振とう後ろ過し、得られた抽出液をカリウムイオンメーターに滴下測定し抽出液値を得る。同様にblank値(抽出に用いた1M酢酸ナトリウムの値)も測定する。抽出液値からblank値を差し引き、係数3.0(抽出率等を勘案した固定値)を乗じることにより交換性カリ含量を算出する。

標準誤差は9.1mg/100g乾土(図4)、試薬・消耗品費は40円/1サンプル程度、所要時間は3日間程度(風乾細土調製:3日間程度、測定:1時間)と低コストかつ迅速に測定できる。

留意点としては、①アンモニウムイオンが測定値に影響するため、局所施肥部分等アンモニア態窒素が多く含まれる箇所からの土壌サンプリングは避ける。②土壌は、予め風乾し2mm程度の篩を通したもの(風乾細土)を用いる。③カリウムイオンメーターは、HORIBA B-731を用いる。④抽出液濃度や抽出倍率を変えると抽出率が変わるため、必ず1M溶液を用い12.5倍(土壌2に対し抽出液25)で抽出する。⑤抽出液の温度や測定時の室温がイオンメーター測定値に影響を与えるため、測定は20~25℃の環境で行う。⑥水田土壌は未検討である。が挙げられる。



注1 特級酢酸ナトリウム・3水和物(試薬)136gを1Lのイオン交換水に溶解し、10%酢酸でpH7.0に調整したもの

注2 取扱および校正は付属の説明書に従う

注3 ゼロの場合は「Ur」と表示される

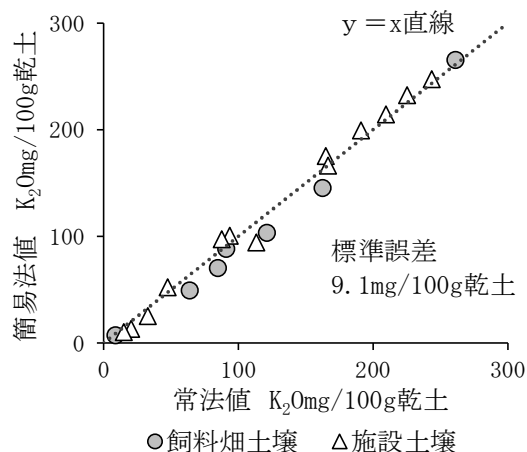
注4 数値が表示された場合はイオン交換水で洗浄する

注5 係数(3.0)の根拠は以下のとおり

$$\frac{25^a \times 1.205^b \times 100^c}{2^d \times 0.95^e \times 1000^f \times 0.63^g \times 0.84^h} = 3.0$$

a: 溶液量(ml)
 b: K→K₂Oの変換係数
 c: g→100gの変換係数
 d: 土壌重量(g)
 e: 乾土率
 f: mg→gの変換係数
 g: 1M酢酸ナトリウム溶液下におけるイオンメーター表示値の補正係数(図2)
 h: 1M酢酸ナトリウム溶液による交換性カリの抽出率(図1)

図3 土壌交換性カリの簡易測定法の手順



定の確度向上のための改良 日本土壤肥料学雑誌 89 ; 311-316 (2018)

(10) 新潟県農林水産部 土壤及び植物分析法の手引き p36 (1999)

図4 土壤交換性カリの測定精度

引用文献

- (1) 新潟県農林水産部 野菜栽培指針 p25 (2022)
- (2) 土づくりの現状と課題 農林水産省 (2019)
https://www.maff.go.jp/kyusyu/syohianzen/nouchiku/attach/pdf/1909_symposium-5.pdf
- (3) 千葉県 農耕地土壤の現状と変化 土壤実態調査8巡目 (2013~2016) の結果より
https://www.pref.chiba.lg.jp/ninaite/seikafukyu/documents/04_noukouchi-dojou.pdf
- (4) 青森県攻めの農林水産業推進本部 健康な土づくり技術マニュアル p132 (2008)
https://www.maff.go.jp/j/seisan/kankyo/hozen_type/h_sehi_kizyun/pdf/tuti234.pdf
- (5) 小柳渉・平尾賢一・森山則男 県内採草地土壤の実態と改善方向 新潟県畜産試験場研究報告 12 ; 38-43 (1998)
<https://www.pref.niigata.lg.jp/uploaded/attachment/220545.pdf>
- (6) 佐藤拓実・高橋朋子・横澤将美 土壤養分が飼料作物の成分組成に及ぼす影響 群馬県畜産試験場研究報告 16 ; 115-122 (2009)
<https://agriknowledge.affrc.go.jp/RN/2010782634.pdf>
- (7) 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 編 日本飼養標準・乳牛 (2017年版) p68-69 中央畜産会 (2017)
- (8) 安西徹郎 全国減肥基準からみた土壤リン酸およびカリウムにおける減肥の指標値と100%減肥とする基準値(案) 農業および園芸 88 (2013)
<https://agriknowledge.affrc.go.jp/RN/2010870710.pdf>
- (9) 中山秀貴・佐藤翔平・荒井義光・佐藤睦人 小型カリウムイオンメーターによる土壤交換性カリ含量簡易測

[ノート] おけさ柿及び加工柿の β -クリプトキサンチン含量

太養寺真弓・小林妙子¹⁾・佐藤和人²⁾・
佐藤嘉一・中島正晴

新潟県農業総合研究所食品研究センター

- 1) 現在, 新潟県新潟地域振興局巻農業振興部
- 2) 現在, 新潟県農業総合研究所アグリ・フーズ
バイオ研究部

β -Cryptoxanthin content of 'Okesa-gaki' persimmon

Mayumi TAIYOJI, Taeko KOBAYASHI¹⁾, Kazuhito
SATO²⁾, Kaichi SATOH and Masaharu
NAKAJIMA

Niigata Agricultural Research Institute Food
Research Center

- 1) Niigata Regional Promotion Bureau Maki
Agricultural Promotion Department
- 2) Niigata Agricultural Research Institute
Biotechnology Division

緒言

柿は新潟県の果樹栽培の中で最も生産量が多く、2019年は約10,200トンと全国6位の生産量を占める。新潟県内ほぼ全域で栽培され、「おけさ柿」のブランドで販売されている。主な品種は「平核無」と「刀根早生」の種のない2品種の渋柿であり、脱渋後に生柿として販売される他に、あんぼ柿や干し柿の加工柿が製造されている。あんぼ柿は剥皮し硫黄でくん蒸した後に約1週間乾燥させ水分含有率50~55%程度としたものであり、鮮やかなオレンジ色と半生状の食感を持つ。干し柿は剥皮し、水分20~30%程度まで乾燥させたものを指し、「ころ柿」とも呼ばれる。

柿はカロテノイドを多く含み、特に β -クリプトキサンチンとリコペンの比率が高いとされている¹⁾。 β -クリプトキサンチンは骨粗鬆症予防作用を有するとされ²⁾、注目されている機能性成分であるが、新潟県産おけさ柿の β -クリプトキサンチン含量についての知見がないことから、県内で生産されている生柿及び加工柿の β -クリプトキサンチン含量について調査を行った。また、成分表示

や品質管理を目的に、生産現場等で β -クリプトキサンチン含量を簡易に推定するための簡易測定法について検討を行った。

実験方法（材料及び方法）

1. 供試試料

生柿は、県内の7農協(A~G)で生産出荷されている「刀根早生」及び「平核無」について2015年の最盛期に各農協で収穫後脱渋処理したものを、「刀根早生」は2Lサイズ(220~260g)を各10玉、「平核無」はLサイズ(190~220g)を各30玉供試した。「刀根早生」のLサイズ、「平核無」のM(160~190g)、2L及び3L(260g以上)サイズについては一部農協より入手して供試した。農協FとGの「平核無」試料は渋みが残っていたことから、食品研究センターにおいて20°Cで約2週間の追加脱渋を行った。

加工柿について、あんぼ柿は2015年度産90個(3農協)、2016年度産50個(1農協)、2019年度産14個(1農協)を供試し、干し柿は2015年度産88個(2農協)、2016年度産63個(1農協)、2017年度産35個(1農協)、2019年度産20個(1農協)を供試した。

2. おけさ柿の性状分析及び β -クリプトキサンチン分析用サンプルの調製

2015年度産の生柿と加工柿について性状分析を行った。生柿とあんぼ柿の表面色調について、色彩測色計(コニカミノルタ製CM-3500d, 反射SCI式, 測色口:直径8mm)を用い、L*, a*, b*を測定した。生柿は果底部の2か所、あんぼ柿は側面2か所を測定した。干し柿断面の色調は、半分に切断後、左右の中央2か所を測定した。

色調を測定後、生柿は剥皮しサンプルミルでペースト状にした。あんぼ柿及び干し柿はヘタを除き、それぞれ等量または2倍の水を加えた後にサンプルミルで同様にペースト状にした。糖度計(アタゴ製, ポケット糖度計PAL-1)を用いて各ペーストの糖度測定を行い、加工柿については常圧乾燥法による水分測定を行った。生柿は10試料を抜き取って測定した平均水分値83.8%を乾物重量の計算に用いた。

3. β -クリプトキサンチンの定量

HPLCによる β -クリプトキサンチンの分析は、日本食品標準成分表2015年度版(七訂)分析マニュアル³⁾の方法を一部改変して行った。ペースト約2gを精秤し、こ

れにピロガロール1gを加えた。エタノール4mLを加えて攪拌し、遠心分離(3,000rpm, 5分間)した上清をガラス遠沈管に移し、沈殿に再度エタノールを加え同様の操作を3回繰り返した。抽出液に60%水酸化カリウム溶液4mLを加え、時々攪拌しながら暗所37°Cで1時間放置してけん化を行った。2% (w/v) 塩化ナトリウム溶液10mL、ヘキサナー2-プロパノール-酢酸エチル混液(9:1.5:1, v/v/v) 14mL加え、5分間振とう後遠心分離して、上清の有機溶媒層を回収し、残った水層にヘキサナー2-プロパノール-酢酸エチル混液14mLを加え、同様の操作を2回繰り返した。

回収した全有機溶媒層を合わせて遠心エバポレーターで減圧乾固後、0.1%ブチル化ヒドロキシトルエン含有メタノール10mLで溶解し、0.45μmのメンブランフィルターでろ過した溶液をHPLCに供試した。

HPLCはODSカラム(GLサイエンス社製 Inertsil ODS-2 (2.1mm I.D.×150mm))を用いて行った。溶離液はA液(メタノール:t-ブチルメチルエーテル:H₂O=95:1:4)、B液(メタノール:t-ブチルメチルエーテル:H₂O=7:90:3)を用いて、リニアグラジエントにより溶出した。カラム温度、流速、注入量はそれぞれ40°C、0.2mL/min、10μLとし、検出は450nmで行った。

4. β-クリプトキサンチン簡易測定方法の検討

ペースト化した生柿及び加工柿試料2gを遠沈管に取り取り、エタノール18mLを加え、ホモジナイザー(KINEMATICA製, POLYTRON PT 10-35)を用いて1分間磨砕した。磨砕物を遠心分離(3,000rpm, 5分間)し、上清の450nmにおける吸光度を測定した。

実験結果及び考察

1. 生柿のβ-クリプトキサンチン含量

2015年産の生柿の測定結果を表1に示した。「刀根早生」と「平核無」で糖度や色調に大きな違いはなかった。

「刀根早生」は2Lサイズ、「平核無」はLサイズを供試し、農協Aのみ複数のサイズを供試して測定を行ったが、β-クリプトキサンチンの含有濃度にはサイズによる大きな違いはなく、重量に比例して1個あたりの含量が多くなる傾向が見られた。

生重量100gあたりβ-クリプトキサンチン含量は、「刀根早生」は221~264μgと農協間で大きな差はなかったが、「平核無」は145~444μgと3倍程度の差が見られ、農協Bで低く、FとGで高かった。新川ら⁴⁾は、カロテノイド合成遺伝子の発現に温度依存傾向があり、β-クリプトキサンチンに関しては25°Cで9日保管後には収穫時に比べて約2倍に増加すると報告している。農協FとGの試料については、他と異なり追加脱渋を20°Cでの約2週間行ったため、脱渋中にβ-クリプトキサンチンが増加したものと思われる。また、今回は市販の脱渋柿を供試しているため、脱渋前の柿は未測定であるが、脱渋は一般的に20°C付近で1週間程度行われることから、いずれの柿も脱渋前よりβ-クリプトキサンチン含量は増加していることが推測された。Zhouら⁵⁾は中国の柿46品種を比較した結果、β-クリプトキサンチン含量は61~941μg/100gFWで、渋柿の方がβ-クリプトキサンチンの含量と総カロテノイド中の割合が高いと報告している。その中で「刀根早生」と「平核無」のβ-クリプトキサンチン含量は「刀根早生」191μg/100g(重量215g, L* = 38.7, a* = 21.6, b* = 23.0), 「平核無」170μg/100g(重量113g, L* = 44.7, a* = 20.2, b* = 32.5)と低いと推

表1 生柿の性状

品種	農協	サイズ	重量 (g)	糖度 (Brix)	表面色調				β-クリプトキサンチン			
					L*	a*	b*	h	(μg/100gFW)	(μg/100gDW)	(μg/個)	
刀根早生	A	L	194 (7)	15.5 (0.7)	57.3 (0.8)	40.6 (1.0)	54.0 (1.1)	53.1 (1.0)	239 (35)	1,475 (215)	398 (69)	
		2L	233 (15)	15.1 (0.6)	59.1 (0.9)	39.6 (1.0)	56.7 (1.1)	55.0 (1.0)	221 (55)	1,363 (342)	443 (120)	
	B	2L	219 (6)	14.1 (0.8)	58.6 (0.7)	41.2 (1.1)	56.1 (0.5)	53.7 (0.9)	228 (62)	1,409 (384)	430 (114)	
		2L	224 (9)	15.9 (0.6)	59.3 (1.1)	39.1 (1.2)	57.3 (1.8)	55.7 (1.4)	251 (63)	1,548 (386)	478 (126)	
	D	2L	203 (8)	14.3 (0.9)	59.1 (0.8)	40.5 (0.8)	56.4 (1.0)	54.3 (0.9)	264 (46)	1,629 (283)	449 (72)	
E	2L	231 (12)	14.3 (0.7)	56.1 (1.2)	41.9 (1.5)	52.9 (2.1)	51.6 (1.9)	259 (54)	1,596 (333)	506 (108)		
平核無	A	M	172 (12)	16.0 (0.8)	59.5 (0.8)	38.9 (1.6)	58.5 (1.2)	56.4 (1.2)	218 (63)	1,346 (387)	326 (104)	
		L	206 (8)	15.8 (0.9)	59.9 (0.8)	39.0 (1.1)	58.7 (1.2)	56.4 (0.9)	248 (54)	1,533 (333)	443 (100)	
		2L	224 (10)	15.6 (0.8)	58.9 (1.0)	38.2 (1.8)	57.7 (1.5)	56.5 (1.5)	226 (63)	1,397 (388)	437 (122)	
	B	3L	262 (8)	15.3 (0.6)	58.3 (0.9)	38.9 (1.5)	56.9 (1.6)	55.6 (1.4)	257 (67)	1,585 (412)	587 (160)	
		L	198 (7)	14.5 (0.8)	61.1 (0.8)	36.3 (1.1)	58.3 (1.3)	58.1 (1.2)	145 (37)	894 (228)	250 (62)	
		C	L	204 (8)	16.2 (0.7)	60.0 (0.8)	38.7 (1.5)	58.9 (1.3)	56.7 (1.4)	258 (70)	1,590 (432)	451 (117)
		D	L	194 (7)	15.5 (1.1)	59.7 (0.8)	39.7 (0.8)	58.9 (1.8)	56.0 (1.0)	254 (73)	1,567 (453)	426 (124)
		F	L	208 (9)	14.0 (0.6)	59.3 (1.2)	40.5 (1.3)	55.5 (1.8)	53.9 (1.3)	418 (77)	2,580 (472)	753 (147)
		G	L	215 (13)	15.4 (0.7)	58.6 (1.2)	41.4 (1.2)	56.4 (1.8)	53.7 (1.4)	444 (80)	2,741 (493)	825 (155)

平均値(標準偏差)

刀根早生:n=10, 平核無:n=30

表2 あんぽ柿の性状

品種	農協	重量 (g)	糖度 (Brix)	水分 (%)	表面色調				β-クリプトキサンチン		
					L*	a*	b*	h	(μg/100gFW)	(μg/100gDW)	(μg/個)
刀根早生	A	61.2 (3.9)	39.9 (0.7)	56.5 (0.9)	42.9 (1.2)	3.8 (0.9)	11.6 (1.6)	72.0 (2.1)	792 (124)	1,820 (280)	470 (82)
	A	56.8 (3.9)	40.7 (1.0)	55.3 (1.2)	41.4 (1.7)	9.9 (1.9)	13.3 (2.0)	53.5 (1.9)	2,127 (288)	4,756 (616)	1,164 (166)
	B	58.4 (4.4)	44.6 (2.8)	51.6 (3.0)	41.4 (1.7)	8.7 (2.0)	12.2 (2.5)	54.5 (2.2)	1,700 (321)	3,507 (595)	952 (162)
平核無	B	59.7 (4.1)	42.4 (1.5)	53.2 (2.0)	36.6 (1.2)	5.6 (0.7)	8.1 (1.3)	55.4 (2.8)	2,099 (259)	4,487 (536)	1,210 (165)
	C										

平均値(標準偏差)

刀根早生:n=10、平核無:n=30

表3 干し柿(「平核無」)の性状

農協	n数	水分 (%)	重量 (g)	糖度 (Brix)	断面色調				β-クリプトキサンチン		
					L*	a*	b*	h	(μg/100gFW)	(μg/100gDW)	(μg/個)
A	53	30.4 (4.1)	46.5 (7.3)	64.3 (3.2)	31.1 (2.7)	5.3 (1.7)	6.3 (1.9)	49.8 (4.9)	1,814 (461)	2,587 (538)	789 (157)
B	35	31.5 (3.7)	44.0 (5.1)	61.6 (3.0)	30.5 (2.7)	5.0 (1.5)	6.0 (1.6)	50.1 (5.0)	1,300 (451)	1,888 (605)	561 (276)

平均値(標準偏差)

察され、今回の県産試料の含量が脱渋工程中に高まっていることが考えられた。

2. 加工柿のβ-クリプトキサンチン含量

あんぽ柿の性状を表2に示した。水分は51.6~56.5%で、水分が高いものは糖度が低い傾向が見られた。表面に糖由来の結晶はほとんどなく、すべての供試試料で表面の測色は可能であった。

「平核無」あんぽ柿のβ-クリプトキサンチン含量は加工によっていずれの農協も大きく増加しており、生柿と比較すると乾物重あたり2.8~3.9倍であった。あんぽ柿製造の温度や日数条件は生産者により様々であると思われるが、特にあんぽ柿は色良く仕上げるため乾燥初期に加温し短時間で乾燥させる必要があり、概ねヒーターと除湿機が用いられている。そのため、β-クリプトキサンチン含量の増加率が高かったものと考えられる。一方、「刀根早生」は1農協のみの試料であるが、乾物重あたりのβ-クリプトキサンチン含量は1.2倍程度と微増であった。「刀根早生」を早生品種の「早秋」と比較した報告⁶⁾で、脱渋前の「刀根早生」は「早秋」に比べてカロテノイド生成関連酵素遺伝子の発現レベルが高いにもかかわらず、出荷時にカロテノイド蓄積が「早秋」の1/4程度と少なく、その理由としてカロテノイド分解関連酵素によりカロテノイドが分解しやすい状態が継続していると推察されている。同じ農協Aのあんぽ柿での「平核無」と「刀根早生」のβ-クリプトキサンチン含量の違いは、代謝酵素などの品種間差が影響していると考えられた。

干し柿は、「平核無」のみ2農協より入手した。あんぽ柿より乾燥が進み、糖度も高くなった。表面は糖の析出により測色は不可能であり、内面の測定値もばらつきが

大きかった(表3)。乾物重あたりのβ-クリプトキサンチン含量は生柿と比べると農協Aで1.8倍、Bで2.1倍に増加していた。どちらの試料もあんぽ柿と比較すると増加率は小さく、ばらつきも大きかった。近らは⁷⁾、温度履歴は不明であるが、「四つ溝柿」を干し柿に加工するとカロテノイドが減少すること、冷蔵保存でカロテノイドは減少すると報告している。干し柿はあんぽ柿と比べて比較的低温で長期間乾燥を行うことから、乾燥中の柿組織内の代謝反応においてβ-クリプトキサンチンの生成反応だけでなく、分解反応も同時に進んでいると推察された。そのため、生産者による乾燥条件の差が大きく影響しやすいことが考えられた。

3. β-クリプトキサンチンと柿性状との関連及び簡易測定方法の検討

みかんは、β-クリプトキサンチン含有量と糖度の間に正の相関(相関係数 $r = 0.688$)があることが報告されており⁸⁾、機能性表示食品として届出されているみかんの品質管理には近赤外線光センサーによる非破壊選果機でβ-クリプトキサンチン含有量を担保することが可能とされている。そこで、柿において、非破壊測定や簡易測定によってβ-クリプトキサンチン含有量の推定が可能か検

表4 β-クリプトキサンチン含量(μg/100gFW)と糖度及び色調との相関

品種	糖度	色調				
		L*	a*	b*	h	
生柿	刀根早生	0.361	-0.348	0.472	-0.362	-0.457
	平核無	0.004	-0.535	0.742	-0.545	-0.800
あんぽ柿	平核無	-0.078	-0.193	0.112	-0.027	-0.432
	干し柿	平核無	0.734	-0.055	0.187	0.052

色調:生柿・あんぽ柿;表面,干し柿;断面

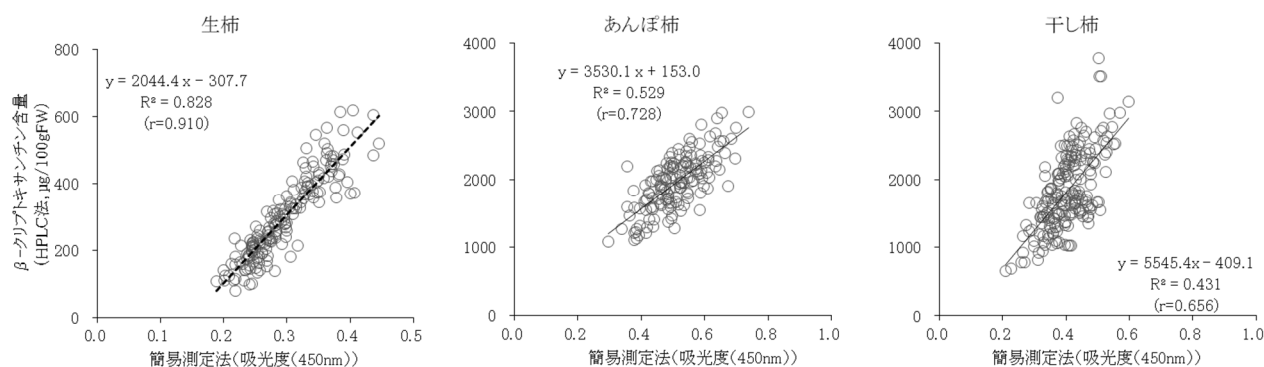


図1 「平核無」における簡易測定法とβ-クリプトキサンチン含量との関係

討を行った。なお、「刀根早生」あんぽ柿は試料数が少ないため、解析から除外した。

その結果、β-クリプトキサンチン含量と糖度の間には、生柿、あんぽ柿において相関が見られなかったが、干し柿は $r = 0.734$ と正の相関が見られた(表4)。しかし、干し柿のβ-クリプトキサンチン含量には乾燥による濃縮効果も影響しており(水分との相関係数 $r = -0.589$)、非破壊選果機の適応可能性については今後更に検討する必要がある。

表面色調については、「平核無」生柿でβ-クリプトキサンチン含量とh値(色相角 $h = \tan^{-1}(b^*/a^*)$)の間に相関係数 $r = -0.800$ の強い負の相関が見られ、表面色調を用いてβ-クリプトキサンチン含量を推定できる可能性が示唆された(表4)。「刀根早生」生柿と「平核無」あんぽ柿のh値はβ-クリプトキサンチン含量とそれぞれ相関係数 $r = -0.457$, -0.432 の弱い相関を示し、干し柿は断面の色調に相関は見られなかった。

β-クリプトキサンチン含量を、HPLCを用いず簡便に測定できる方法を検討した。生柿と加工柿試料をペースト化した後にエタノールを添加して簡易に抽出を行い、カロテノイドの吸収波長である450 nmで抽出液の吸光度を測定したところ、生柿、あんぽ柿及び干し柿においてHPLCで測定したβ-クリプトキサンチン含量と相関係数 $r = 0.656 \sim 0.910$ の正の相関が見られた(図1)。

生柿はエタノール簡易抽出による測定で、外観色調よりも精度高く推定することが可能であった。加工柿は複数年の試料を供試したが、干し柿では年次間差が若干認められた。なお、未脱渋の柿や加工初期の干し柿は、エタノール抽出時に柿渋由来と思われる濁りが生じたため、測定不可能であった。加工柿については、更なるデータの蓄積と条件検討が必要と考えられるが、生産現場等でのβ-クリプトキサンチン含量の簡易測定法としての可能性が示唆された。

引用文献

- 1) G. Brossard and G. Mackinney, The carotenoids of *Diospyros Kaki* (Japanese Persimmons), *J. Agric. Food Chem.*, 11, 501-503 (1963)
- 2) M. Yamaguchi et al., Effect of β-cryptoxanthin on circulating bone metabolic markers : Intake of juice (Citrus unshiu) supplemented with β-cryptoxanthin has an effect in menopausal women. *J. Health Sci.*, 52, 758-768 (2006)
- 3) 文部科学省科学技術・学術審議会資源調査分科会, 日本食品標準成分表2015年度版(七訂)分析マニュアル(2015)
- 4) 新川猛ら, 収穫後の高温処理によるカキ‘富有’果肉中のカロテノイド含量の増強, *園学研*, 7, 123-128 (2008)
- 5) C. Zhou et al., Carotenoids in Fruits of Different Persimmon Cultivars, *Molecules*, 16, 624-636 (2011)
- 6) 新川猛ら, カキ‘早秋’と‘刀根早生’果実におけるカロテノイド蓄積とカロテノイド生合成関連酵素遺伝子の発現特性, *園学研*, 13, 53-58 (2014)
- 7) 近雅代, 榛葉良之助, 四ツ溝柿の成熟, 貯蔵および干し柿加工中のカロチノイド組成の変化, *日食工誌*, 34, 3, 155-162 (1987)
- 8) 久永絢美ら, 主要産地のウンシュウミカンに含有されるβ-クリプトキサンチン量の品種群間差およびその糖度との関連について, *園学研*, 17, 459-464 (2018)

[ノート]

かぐらなんばんに含まれる有用成分の簡易測定法

中島正晴・松岡竜邦¹⁾・太養寺真弓・中尾令子・相原浩太郎

新潟県農業総合研究所食品研究センター

1) 現在、新潟県長岡地域振興局農林振興部

Study on simplified analysis of useful components in Kaguraneanban

Masaharu NAKAJIMA, Ryuho MATSUOKA¹⁾,
Mayumi TAIYOJI, Reiko NAKAO and Kotaro
AIHARA

Niigata Agricultural Research Institute Food
Research Center

1) Nagaoka Regional Promotion Bureau Agriculture
and Forestry Promotion Department

緒言

健康志向の高まりにより農産物に含まれる有用成分が注目されている。2015年に施行された食品表示法により生鮮食品にも栄養成分等の機能や含有量を推定値として表示できるようになり、生産現場では、高速液体クロマトグラフ (HPLC) 法等の高精度測定法に代わる安価な装置を用いた非破壊での簡易な方法により含量を推定する方法を求めている。

かぐらなんばんは、長岡市や南魚沼市などの中山間地域で生産される地域伝統野菜のとうがらしである¹⁾。とうがらしの辛味成分であるカプサイシン類の主成分は、カプサイシン及びジヒドロカプサイシンで、カプサイシン類の約80~90%を占めている²⁾。かぐらなんばんに含まれるカプサイシン類の量は、成熟度や乾燥・湿潤などの急激な環境の変化により変化し、同一株内の果実であっても辛味に差違があることが知られている³⁾。カプサイシン類は、操作性や精度の点からUV、蛍光、電気化学 (EC) あるいはマスマスペクトロメトリー (MS) を検出器とするHPLC法により測定されているが、栽培研究現場では安定した辛味度を持たせる栽培手法を確立するために、辛味強度が最も強いカプサイシン及びジヒドロカプサイシンの合計量 (辛味成分量) を簡易に測定する方法を求めている。

一方、かぐらなんばんには、全国標準の青ピーマンの含有量 (約75mg) に比べて青色果実 (以下未熟果) で100mg、赤ピーマンの含有量 (約170mg) に比べて赤色果実 (以下完熟果) で200mg前後の多量のビタミンC (還元型及び酸化型ビタミンCを合わせたもの) が含まれていることから、栄養機能表示食品としての表示を行うことで消費者への訴求力を高めることが可能である。そのために、酢酸エチル抽出を行い、HPLCを使用する衛生試験法⁴⁾に代わる生産現場でも利用可能な非破壊での簡易なビタミンC測定法が必要となっている。

そこで、本研究では、簡易な方法として蛍光光度計により辛味成分量を推定する方法と、酢酸エチル抽出を要しない比色法のヒドラジン法⁵⁾や糖度によりビタミンC量を推定する方法を検討した。

実験方法

1. 試料

本試験では、2022年に中山間地農業技術センター (中農技セ) で栽培されたかぐらなんばん未熟果: 54.4±9.2g (n=72)、完熟果: 52.8±10.9g (n=72) を用いた。

2. 試薬

水は蒸留水を用いた。2,4-ジニトロフェニルヒドラジン (DNPH) 及びチオ尿素は、富士フィルム和光純薬工業 (株) 製特級を、2,6-ジクロロインドフェノールナトリウム n 水和物 (インドフェノール) は、関東化学 (株) 製1級を、ヘキサン、酢酸エチル、メタノール及びアセトニトリルはHPLC用のものを用いた。その他試薬は、市販の特級以上の品質のものを用いた。

3. N-(2,4-dimethoxybenzyl)-2-methylheptamide (DMBMH) の調製

カプサイシン及びジヒドロカプサイシン (辛味成分) のHPLC分析に内標準物質 (I.S.) として用いたDMBMHは、CooperらによるN-(2,4-dimethoxybenzyl)-2-methyloctamideの合成方法⁶⁾を基にして調製した。すなわち、塩化オキサリル1.4mlを2-methyl heptanoic acid 1.0gのベンゼン溶液30mlに加え80℃で1時間加熱した。放冷し濃縮した液にトリエチルアミン1.2mlを含むベンゼン溶液20mlと2,4-dimethoxybenzylamine 1.2gを含むベンゼン溶液20mlを加え80℃で1時間加熱した。放冷後、反応液を10%塩酸に加えジエチルエーテル抽出を行った。有機層を飽和NaHCO₃溶液、飽和食塩水で洗浄後無水MgSO₄

により乾燥し減圧下濃縮した。残渣からヘキサン-酢酸エチルによる再結晶で 1.1g の DMBMH を得た。

4. HPLC 分析条件

辛味成分の HPLC は、ポンプ: LC-20AD [(株) 島津製作所], 分光蛍光検出器: RF-10AXL [(株) 島津製作所], カラム: Develosil C30-UG-5 (φ2.0mm X 250mm, 粒子サイズ 5 μm) [野村化学 (株)], カラム恒温槽: CTO-20A [(株) 島津製作所], オートサンプラー: SIL-20AC [(株) 島津製作所] を用いた。標準溶液及び試料溶液を HPLC に注入し, DMBMH, カプサイシン及びジヒドロカプサイシンを蛍光検出器により検出し, データ処理装置を用いて DMBMH のピーク面積値との面積比による検量線法から試料中のカプサイシン及びジヒドロカプサイシン濃度を算出しその合計量を辛味分量とした。HPLC の測定条件は, 以下のとおりとした。カラム温度: 40°C。測定波長: 励起波長 (Ex) 280nm, 蛍光波長 (Em) 320nm。流量: 0.2ml/min。試料注入量: 5 μl, 移動相 A, アセトニトリル-水 (1:9, V/V) 混液。移動相 B, アセトニトリル。溶出条件: 試料注入時から 5 分間 B 液を 40% に保持した後 12 分間で B 液 40% から 72% に混合割合を直線的に変化させる。その後, カラム洗浄のため, B 液 100% とし 13 分間保持した後, 次の分析のため, 試料注入時と同じ B 液 40% を 10 分間保持する。繰り返し分析回数は, すべての分析測定において 1 回とした。

ビタミン C の HPLC は, ポンプ: LC-20AD [(株) 島津製作所], フォトダイオードアレイ紫外可視検出器 (PDA): SPD-M20A [(株) 島津製作所], カラム: Mightysil Si60 (φ2.0mm X 150mm, 粒子サイズ 5 μm) [関東化学 (株)], カラム恒温槽: CTO-20A [(株) 島津製作所], オートサンプラー: SIL-20AC [(株) 島津製作所] を用いた。標準溶液及び試料溶液を HPLC に注入し, 得られたクロマトグラムより DNPH 誘導体ピーク面積値による検量線法から試料中のビタミン C 濃度を算出した。HPLC の測定条件は, 以下のとおりとした。カラム温度: 40°C。測定波長: 495nm。流量: 0.24ml/min。試料注入量: 2 μl, 移動相, 酢酸エチル-ヘキサン-酢酸 (5:4:1, V/V) 混液。

5. HPLC による分析用試料の前処理・調製方法

かぐらなんばんからの辛味成分の抽出は次のように行った。粗粉碎した試料全量を POLYTRON (KINEMATICA AG 社) で均質化しその 1g を採取し, DMBMH メタノール溶液 (0.4mg/ml) 0.1ml 及びメタノール 2 ml を加え,

70°C で 30 分攪拌した。放冷後, 遠心分離 (3000rpm, 5 分) により上清を得た。残渣に更にメタノール 2 ml を加え 30 秒攪拌し遠心分離 (3000rpm, 5 分) 後に上清を得た。同様の抽出をさらに 2 回繰り返し, 得られた上清を併せて試料溶液とした。この試料溶液を HPLC 用ろ過フィルターに通過させ HPLC へ注入した。

ビタミン C の分析用抽出液は, 均質化した試料 0.5g に 5.5% (W/V) メタリン酸溶液 5 ml を加え約 60 分攪拌した後, 5.5% (W/V) メタリン酸溶液で 10ml に定容し遠心分離 (7000rpm, 5 分) を行い調製した。凍結乾燥 (F.D.) 処理した試料からの抽出液は, 試料 40mg に 5% (W/V) メタリン酸溶液 5 ml を加え約 60 分攪拌した後, 5% (W/V) メタリン酸溶液で 10ml に定容し遠心分離 (7000rpm, 5 分) を行い調製した。DNPH 誘導体化は衛生試験法に基づいて次のように行った。抽出液 2 ml に 5% (W/V) メタリン酸溶液 1ml を加え 0.2% (W/V) インドフェノール溶液を 30 秒間経過しても色が消えなくなるまで添加した後, 2% チオ尿素 (5% メタリン酸溶液) 2 ml 及び 2% DNPH (9N 硫酸溶液) 0.5ml を加え 50°C で 90 分攪拌した。放冷後, 酢酸エチル 2 ml を加え 30 秒攪拌し遠心分離 (3000rpm, 5 分) 後に下層を除き, 無水 MgSO₄ で酢酸エチル層を脱水し HPLC 用ろ過フィルターに通過させ HPLC へ注入した。

6. 光度計による分析用試料の前処理方法及び測定

光度計としてマイクロプレートリーダー: Infinite M1000 (TECAN 社) を使い, マイクロプレートは吸光度測定用に UV-STAR MICROPLATE 96well (Greiner bio-one 社), 蛍光光度測定用に U96 PP-0.5mL Black (Nunc 社) を用いた。

辛味成分の抽出及び測定は次のように行った。均質化した試料 1g を採取し, 25% メタノール 4.1ml を加え, 70°C で 30 分攪拌し放冷した後に遠心分離 (3000rpm, 5 分) により得られた上清を用いた。固相抽出には, Bond Elut C18 カートリッジ (100mg/1ml, Agilent 社) を用いた。Bond Elut C18 カートリッジに予めメタノール 1 ml, 水 1 ml, 続いて 0.1% 酢酸を含む 20% (V/V) メタノールを通液し, 上清 2 ml を導入した。0.1% 酢酸を含む 20% (V/V) メタノール 3 ml で洗浄した後, 90% (V/V) メタノール 1 ml で溶出させた液を分析試料とし, その 200μl について吸光度 (280nm) 及び蛍光光度 (Ex 280nm, Em 320nm) を測定した。

ビタミン C の DNPH 誘導体化は次のように行った。

抽出液 0.4ml に 0.2% (W/V) インドフェノール溶液を 30 秒間経過しても色が消えなくなるまで添加した後、2% チオ尿素 (5%メタリン酸溶液) 0.2ml 及び 2%DNP (9 N 硫酸溶液) 0.2ml を加え 50°C で 90 分撹拌した。氷冷しながら 85%硫酸溶液 1ml を加え約 30 分室温で放置しその 200µl について吸光度 (540nm) を測定した。

実験結果

1. 辛味成分の蛍光光度計による測定法と HPLC 法との相関

2022 年に中農技セで栽培収穫されたかぐらなんばんについて HPLC によるカプサイシン分析及び蛍光光度法による測定を行った。HPLC による分析は、DMBMH を I.S. として用いる内標準法により行った。図 1 は、試料抽出液 5 µl を分析したときの蛍光検出器及び UV を検出器としたクロマトグラムで、保持時間 10.3 分に DMBMH, 12.1 分にカプサイシン及び 15.1 分にジヒドロカプサイシンのピークが検出された。その検出感度は大きく異なり、選択性の高い蛍光検出において良好なクロマトグラムが得られ、本研究では HPLC-蛍光法により分析を行うこととした⁷⁾。11.3 分及び 18.1 分等に認められるピークは他のカプサイシン類と考えられるが、辛味相対強度はカプサイシンやジヒドロカプサイシンの半分程度であること

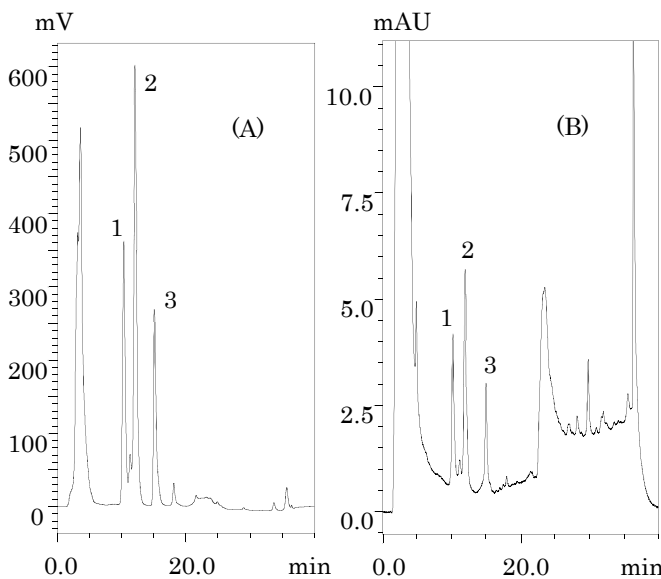


図 1 かぐらなんばん抽出液の HPLC クロマトグラム

(A) 蛍光検出 (Ex280nm, Em320nm), (B) UV 検出 (280nm)
1:DMBMH (I.S.), 2:カプサイシン, 3:ジヒドロカプサイシン

から本試験ではカプサイシン及びジヒドロカプサイシンの合計量を辛味成分量として測定した²⁾。本法において、DMBMH の回収率は面積値から 100.4±3.6%, 辛味成分量 150µg/g の添加回収率は 108.0±4.0%で、2022 年試料中の辛味成分量は、未熟果:3.6±2.8mg/100g F.W. (n=72), 完熟

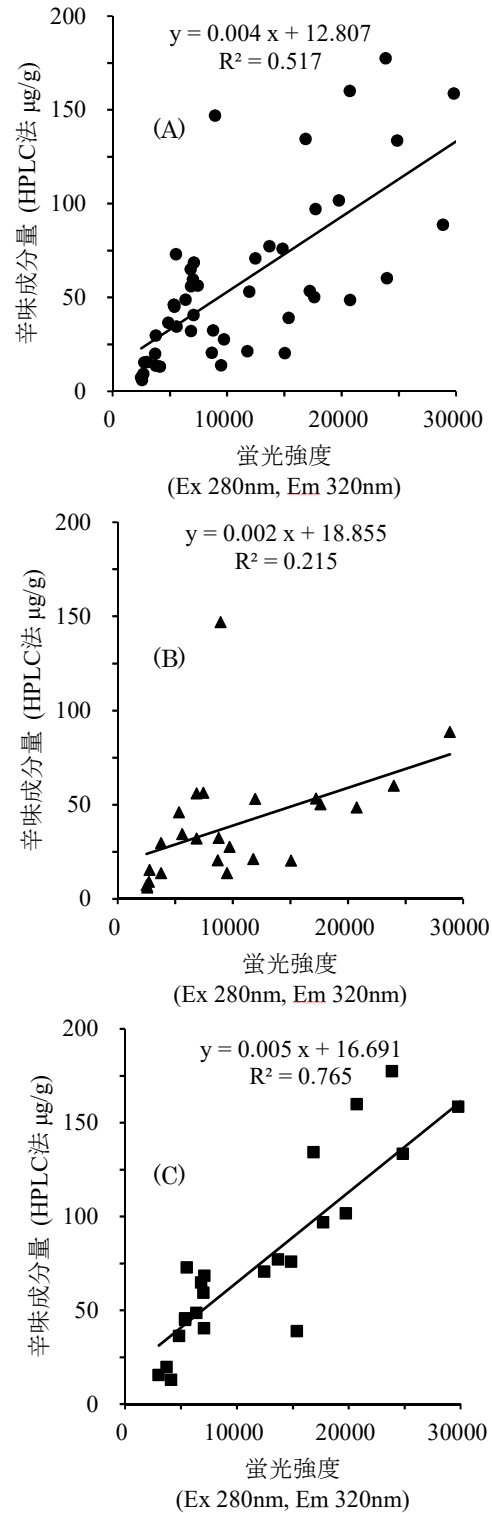


図 2 かぐらなんばん抽出液の蛍光強度と HPLC による辛味成分量の関係

(A) 未熟果+完熟果 (n=48), (B) 未熟果 (n=24), (C) 完熟果 (n=24)

果:5.4±3.9mg/100g F.W. (n=72) だった。予備試験として冷凍保存されていた2021年の試料 (n=56 (未熟果=41, 完熟果=15)) を用いて固相抽出処理後の蛍光光度計 (Ex 280nm, Em320nm) 及び吸光度計 (280nm) による結果と HPLC による辛味成分量との間でそれぞれ $R^2:0.692$, $R^2:0.127$ の関係を示したことから、2022 年においては蛍光光度計による結果との関係を検討することにした。なお、蛍光光度計による結果と比較して吸光度計による結果で関係性が低かったことは、HPLC 法と同様に固相抽出処理で簡易に夾雑物と分離しただけでも蛍光法の感度が高いことや辛味成分のみを選択的に検出できていることによると判断された。2022 年における結果は、HPLC による分析値とは図 2 に示す相関 ($R^2:0.517$, n=48) が得られたが、完熟果のみの相関 ($R^2:0.765$, n=24) に比較して、未熟果のみの相関 ($R^2:0.215$, n=24) が低い結果となった。

これは、未熟果 (青) における水溶性夾雑物の除去が不十分だったことなどが考えられる。今後、抽出に用いる溶媒や濃度などを検討しさらに改良する必要がある。糖度との関係についても検討したが、関係は認められなかった。

2. ビタミン C の比色法による測定法及び糖度と HPLC 法との相関

F.D.処理し冷凍保存されていた2021年の試料を用いて、HPLC 法で測定する衛生試験法⁴⁾及び酢酸エチル抽出を要しない比色法のヒドラジン法⁵⁾によりビタミン C の分析を行った。衛生試験法によるビタミン C の分析は、DNPH との反応後に酢酸エチルを加えて1時間の振とうにより生成したオサゾン酢酸エチル層に転溶させ、静置後、水層を除き、無水硫酸ナトリウムで脱水し試験溶

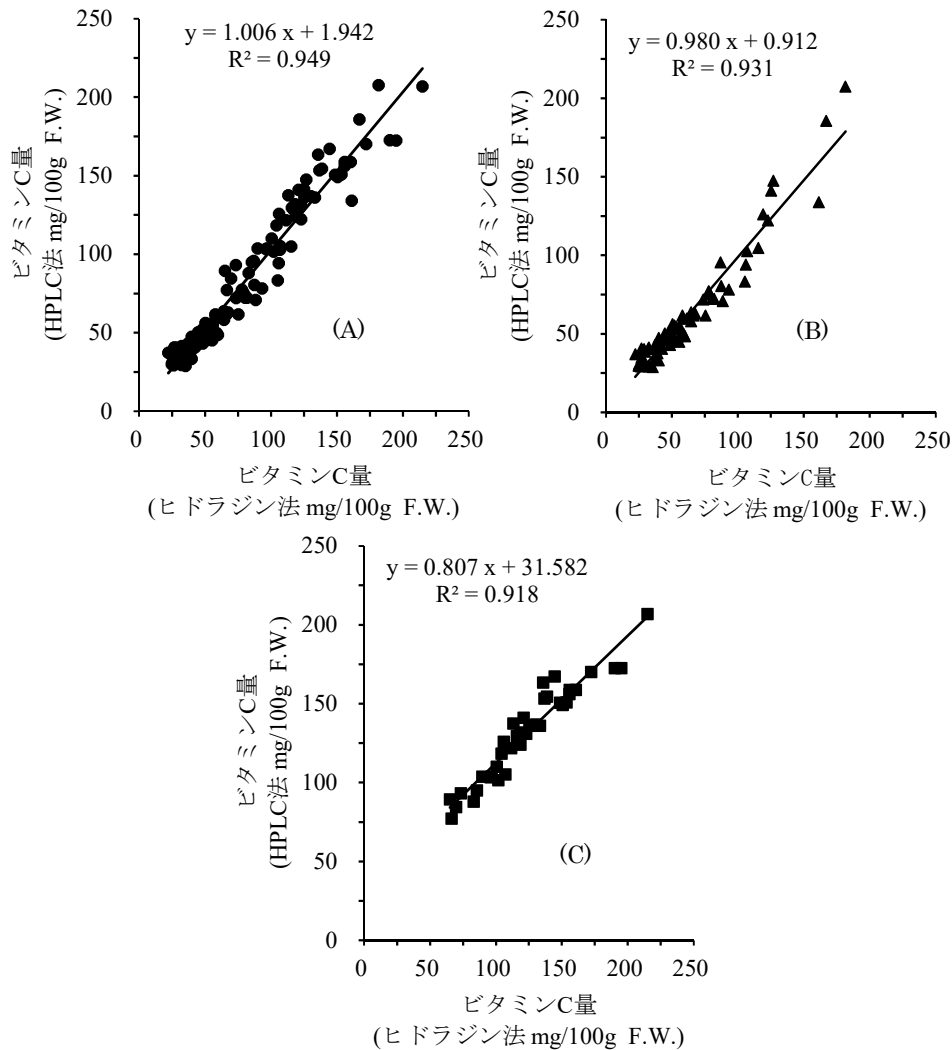


図 3 ヒドラジン法と HPLC 法によるビタミン C 量の関係

(A) 未熟果+完熟果 (n=110), (B) 未熟果 (n=71), (C) 完熟果 (n=39)

表1 ビタミンC量への保存処理の影響

性状	無処理 ¹⁾ mg/100g F.W.	F.D.処理 ²⁾ mg/100g F.W.	F.D.処理 ³⁾ mg/100g F.W.
青 (未熟果)	124.4±3.2	110.6±2.3	92.0±3.0
赤 (完熟果)	186.3±3.2	183.3±2.7	182.5±4.4

mean±S.D (n=4), 1)-20℃, 24時間保存後に抽出, 2)-20℃, 24時間保存後に3日間F.D.処理・抽出, 3)-20℃, 13日間保存後に3日間F.D.処理・抽出

液としている。また、HPLCによる分析は、酢酸エチル、ヘキサン、酢酸を移動相に用いる内径6.0mmのシリカカラムで行っている。そこで、本試験では、1時間の振とうと静置を約30秒の攪拌・遠心分離とし、HPLCによる分析は内径2.0mmセミマイクロカラムを用い約1/6スケールで行った。その結果、ヒドラジン法はHPLC法による結果との間で図3に示すような良好な相関 ($R^2:0.949$, $n=110$) が得られた。また、未熟果 ($R^2:0.931$, $n=71$), 完熟果 ($R^2:0.918$, $n=39$) による違いもなくいずれも良好な関係を示した。抽出液について4回の繰り返し分析を行った結果、未熟果: 111.3 ± 2.6 mg/100g F.W., 完熟果: 182.9 ± 1.4 mg/100g F.W. となり、反応によるバラツキは少ないと判断した。次に、ビタミンCは酸化されやすく素早い前処理が求められていることから、均質化した試料0.5gを-20℃で保存し3日間のF.D.処理後にビタミンC量を測定したところ、表1に示す結果となった。対照となる無処理に対して完熟果は大きく減少することはなかったが、未熟果では3日間の冷凍保存後のF.D.処理で約11%、13日間の冷凍保存後のF.D.処理では26%も減少していた。この違いは、試料の熟度によるものと推察された。一方、均質化処理した試料からメタリン酸で抽出した液は、冷蔵保存で5日間安定だったことから、本研究では、均質化処理した試料からのメタリン酸抽出後に冷蔵保存し、3日以内にビタミンC量を測定することとした。2022年に中農技セで栽培収穫されたかぐらなんばんについてヒドラジン法により測定を行った結果、ビタミンC量は、未熟果: 123.4 ± 40.2 mg/100g F.W. ($n=72$), 完熟果: 194.8 ± 26.4 mg/100g F.W. ($n=72$) だった。これら試料について糖度を測定しヒドラジン法によるビタミンC量との関係性を検討した結果、図4に示す相関 ($R^2:0.650$, $n=144$) を得ることができ、ビタミンC量推測法への発展が期待できる。

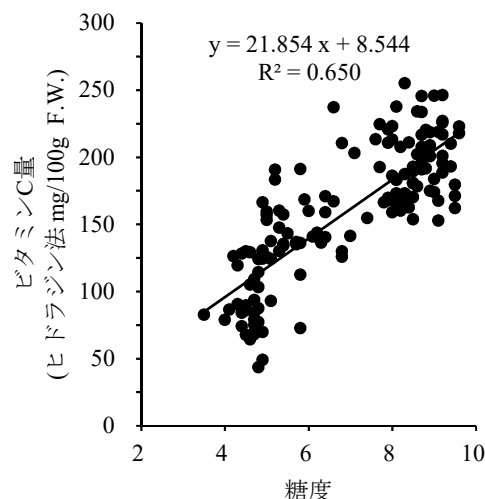


図4 糖度とヒドラジン法によるビタミンC量の関係
未熟果+完熟果 (n=144)

引用文献

- 1) 新潟県農林水産部, 新潟県農林水産業研究成果集, 地域伝統野菜とうがらし「かぐらなんばん」の安定栽培技術, 41-42 (2014)
- 2) 岩井和夫, 渡辺達夫編, トウガラシ-辛味の科学-, 初版, 幸書房, 東京: 22 (2000)
- 3) 新潟県ホームページ, かぐらなんばんの辛味について, https://www.pref.niigata.lg.jp/sec/nosoken_tyusankanchi/spicykagura.html
- 4) 平山晃久ら, 衛生試験法・要説, 日本薬学会編, 第一版, 金原出版, 東京: 104-105 (2000)
- 5) 中村良ら, 新・食品分析法, 日本食品科学工学会編, 光琳, 東京: 443-447 (1996)
- 6) T.H.Cooper, J.A.Guzinski, C.Fisher, Improved High-Performance Liquid Chromatography Method for the Determination of Major Capsaicinoids in Capsicum Oleoresins, J.Agric.Food Chem., 39: 2253-2256 (1991)
- 7) 岩井和夫, 渡辺達夫編, トウガラシ-辛味の科学-, 初版, 幸書房, 東京: 43 (2000)

[ノート]

新水稻系統「新潟 129 号」の玄米粉とこれを用いた麺類の特徴

野呂渉・本間紀之・佐々木朋子¹⁾・

松木順子¹⁾・宍戸功一

新潟県農業総合研究所食品研究センター

1) 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品研究部門

Characteristics of the brown rice flour of the new rice line "Niigata 129" and that processed noodles

Wataru NORO, Noriyuki HOMMA, Tomoko SASAKI, Junko MATSUKI and Kouichi SHISHIDO

Niigata Agricultural Research Institute Food Research Center

緒言

「新潟 129 号」は、超硬質米「EM10」¹⁾と高アミロース米「こしのめんじまん」²⁾を交配し、育成された水稻系統である。「新潟 129 号」は、超硬質米「EM10」と同様に澱粉枝切り酵素 BEIIb (branching enzyme IIb) が欠失していると考えられ、ヨード吸収曲線からもアミロペクチンの分子構造には分枝構造が少なく、側鎖が長いと推定される。そのため、澱粉は糊化しにくく老化しやすい、米飯は硬く粘りが少ない特徴を有する。また、食後の血糖値上昇を緩慢にする難消化性澱粉を多く含むため、機能性食品素材として有望と考えられる³⁾。

一方、玄米は精米に比べて食物繊維⁴⁾などの機能性成分やミネラルを多く含むことが知られている⁵⁾。「新潟 129 号」の玄米食による難消化性澱粉と食物繊維の同時摂取は、糖代謝の改善だけではなく腸内環境の改善も期待できる。

そこで、「新潟 129 号」の玄米を積極的かつ効率的に摂取できるよう粉体としての利用を見据え、「新潟 129 号」玄米粉の加工性や保存性を評価した。併せて、玄米粉麺を製造し、その物性、難消化性澱粉含量及び糊化度を測定した。

材料及び方法

1. 供試試料

コシヒカリは、令和 2 年新潟県産を用いた。「新潟 129 号」は、令和 2 年に新潟市農業活性化研究センターで栽培されたものを用いた。

2. 製粉

玄米の製粉は、气流粉碎機 (SPM-R200 型, ㈱西村機械製作所) を使用し、処理速度 5 kg/hr, 回転数 8,000 rpm の条件で行った。玄米粉は、玄米を洗米・浸漬せずに製粉する乾式气流粉碎と、浸漬した玄米を製粉する湿式气流粉碎により製造した。湿式气流粉碎は、洗米した玄米を 7 °C の水道水に 12 時間浸漬し、脱水後に製粉を行った。その後、流動層乾燥機 (20F, ㈱長門電機工作所) を用いて、玄米粉水分が 12.5 ± 1.0 % になるように乾燥した。

また、比較対象として精白米 (搗精歩合 = コシヒカリ: 90.4 %, 新潟 129 号: 88.0 %) を上記方法で製粉し、精米粉を得た。

3. 製粉性評価

米粉の粒度分布は、レーザー回折式散乱光粒度分布測定器 (LMS-2000e, セイシン企業㈱) を用いて測定した。米粉をドライ分散条件 (0.3 MPa) で測定器に送り込み、粒度分布、中位径 (d[0.5]) 及び積算篩上分布 10 % (d[0.9]) を付属のソフトウェアで解析した。また、Megazyme 社の Starch Damage Kit 測定による澱粉損傷度で米粉の澱粉の損傷程度を評価した。

4. 保存性評価

玄米粉の保存性を評価するために、玄米粉を包装袋 (ラミジップ (ナイロン/ポリエチレン), ㈱セイニチ) に入れ、25 °C の恒温器で静置し、貯蔵試験を行った。サンプリングは、製粉・貯蔵から 2 週間後、3 か月後及び 6 か月後で行い、脂質の分解により生じた遊離脂肪酸を脂肪酸度⁶⁾として測定することで玄米粉の劣化程度を評価した。脂肪酸度の検量線は、リノール酸を用いて作成した。

5. 玄米粉麺の製造と調理

小麦粉の一部 (30 %, 50 %) を玄米粉に代替した玄米粉麺を製造した。玄米粉は、乾式气流粉碎、または湿式气流粉碎してから 1 週間以内のものを用いた。小麦粉は

準強力粉（特ナンバー1，日清製粉（株））を用い，50%代替区と30%代替区のグルテン量が同等になるように，50%代替の場合は活性グルテンを2%加えた．食塩は，原料粉に対して外割で2%加えた．加水量は米の吸水性に応じて調整し，「新潟129号」玄米粉使用の場合は代替量30%で46%，同50%で48%，コシヒカリ玄米粉使用の場合は同30%で44%，同50%で46%とした．加水後10分間ミキシングした生地を三段ロール製麺機（UT-50，（株）豊製作所）にて複合と圧延をそれぞれ3回行い，厚さ1.5mm，幅1.9mmの麺線となるように切出機で切断した．

調理は，玄米粉麺の水分が68%となるように茹で時間を調整して行った．茹で時間は，茹でた時間と玄米粉麺の水分値から導き出した検量線より算出した．

6. 玄米粉麺の物性

調理後の玄米粉麺の硬さは，テンシプレッサー（TTP-50BXII2006，タケトモ電機（株））を用いて測定した．調理後2分以内の麺をステージに固定し，プランジャーを2回降下させて麺を圧縮し，応力のデータを得た．測定条件は以下のとおりである．

プランジャー：V型，プランジャー速度：2mm/sec，1次圧縮率：圧縮前の麺の太さに対して30%，2次圧縮率：圧縮前の麺の太さに対して95%，ロードセル：10kg．各試験区の麺をそれぞれ6回測定し，付属の解析ソフトにより玄米粉麺の「全体の硬さ」を算出した．

7. 玄米粉麺の難消化性澱粉と糊化度の測定

調理後の玄米粉麺を液体窒素に浸して瞬間凍結させ，その後凍結乾燥した．凍結乾燥した試料をサイクロテック（スクリーン：1.0mm，Tecator CYCLOTTEC 1093，フォス・ジャパン（株））で粉碎し，分析に供試した．

難消化性澱粉は，Megazyme社のResistant Starch Kitを用いて測定した．付属のパンクレアチン α -アミラーゼで16時間消化し，残渣のグルコース量から算出した．

糊化度は，貝沼ら⁷⁾の方法を参考に β -アミラーゼ-ブルナーゼ法（BAP法）で測定した．分析試料（A）とこれをアルカリ糊化させた試料（B）について，酵素分解した区分（AC及びBC）と，分析試料に不活化酵素を加えたブランク区分（AD）について，生じた還元糖量を測定し，以下の式により算出した．

$$\text{糊化度 (\%)} = (\text{AC} - \text{AD}) \div (\text{BC} - \text{AD}) \times 100$$

実験結果及び考察

1. 「新潟129号」玄米の製粉性

「新潟129号」とコシヒカリの玄米粉及び精米粉の粒度分布を図1に，粒度ならびに澱粉損傷度を表1に示した．「新潟129号」は，コシヒカリと同様の粒度分布を示した．また，どの米においても湿式気流粉碎の玄米粉は，乾式気流粉碎と比べて中位径が小さくなる傾向を示したが，積算篩上分布10%（ $d[0.9]$ ）は大きくなり，糠層由来の粗い画分が含まれていることが明らかになった．

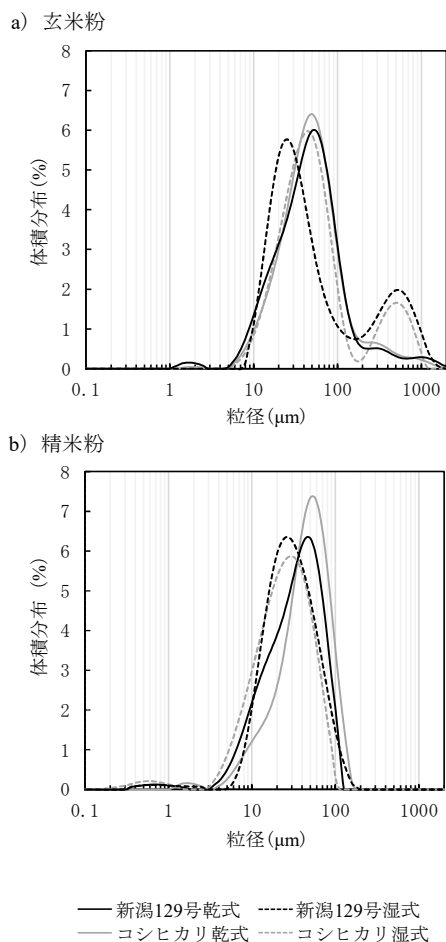


図1 米粉の粒度分布

表1 米粉の粒度と澱粉損傷度

品種	搗精	製粉条件	粒度分布		澱粉損傷度 (%)
			中位径 [d(0.5)] (μm)	積算篩上分布10% [d(0.9)] (μm)	
新潟129号	玄米	乾式	43.2	122.1	4.1
		湿式	34.6	517.4	3.4
	精白米	乾式	32.0	70.3	5.0
		湿式	26.7	66.1	3.3
コシヒカリ	玄米	乾式	44.3	131.0	12.7
		湿式	43.6	400.0	5.0
	精白米	乾式	42.5	85.7	12.3
		湿式	22.9	54.3	4.8

「新潟129号」の米粉の澱粉損傷度は、製粉方式によらず玄米粉・精米粉とも5%以下であったのに対し、コシヒカリの乾式気流粉碎では10%以上と澱粉の損傷が著しかった。

以上のことから、「新潟129号」を乾式気流粉碎することによって、糠層を微粉末化しながら澱粉損傷を抑えた玄米粉の製造が可能であることが明らかとなった。

2. 「新潟129号」玄米粉の保存性

「新潟129号」などの超硬質米は、コシヒカリなどの一般的な粳米と比べて粗脂肪を多く含むことが報告されている^{3) 8)}。そのため「新潟129号」玄米粉は、コシヒカリ玄米粉と比べてより遊離脂肪酸が増加しやすいと考えられる。そこで貯蔵による脂肪酸度の変化を図2のとおり測定し、保存性の評価を行った。「新潟129号」玄米粉は、コシヒカリと比べて貯蔵による脂肪酸度の増加が顕著であることが分かった。その一方で、粉碎方法の違いが脂肪酸度増加に及ぼす影響は試料米によって異なり、「新潟129号」は、湿式気流粉碎で脂肪酸度が増加しやすい傾向であった。

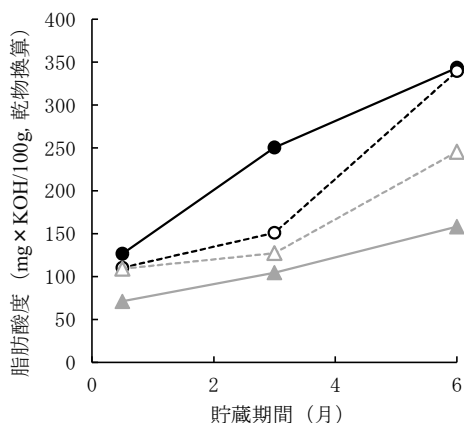


図2 貯蔵による玄米粉の脂肪酸度の変化

○—新潟129号 乾式 ●—新潟129号 湿式
△—コシヒカリ 乾式 ▲—コシヒカリ 湿式

3. 「新潟129号」玄米粉麺の特徴

調理後の玄米粉麺の写真を図3に示した。「新潟129号」玄米粉麺は、コシヒカリ玄米粉麺と比べて黄色味を帯びていた。一方で、製粉方法の違いによる玄米粉の色調に差は認められなかった。湿式気流粉碎した有色素米の玄米粉を用いると糠由来の粗い画分により、斑点模様がみられることがある。しかし、「新潟129号」は糠と胚乳の色が似ていることから、玄米粉麺に目立った斑点模様は観察されなかった。

調理後の玄米粉麺の硬さを図4に示した。「新潟129号」玄米粉麺は、コシヒカリ玄米粉麺と比べて軟らかく

なる傾向を示した。一方で、製粉方法の違いによる玄米粉麺の硬さに差は認められなかった。また、いずれの玄米粉を用いた場合でも、50%代替した玄米粉麺の方が軟らかく、活性グルテンの効果も2%の添加量では効果が限定的と考えられた。超硬質米は吸水速度が速く、小麦粉生地と混合するとグルテンへ水の供給が阻害され、パンの膨化が抑制されることが報告されている⁹⁾。本研究において、玄米粉麺の製造や調理の際、加水量や茹で時間を適正に調整したことにより、玄米粉麺の硬さに対する米の違いによる影響を小さくしたものと考えられた。

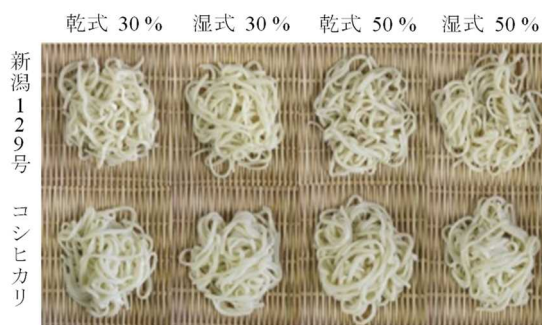


図3 玄米粉麺の調理後の外観

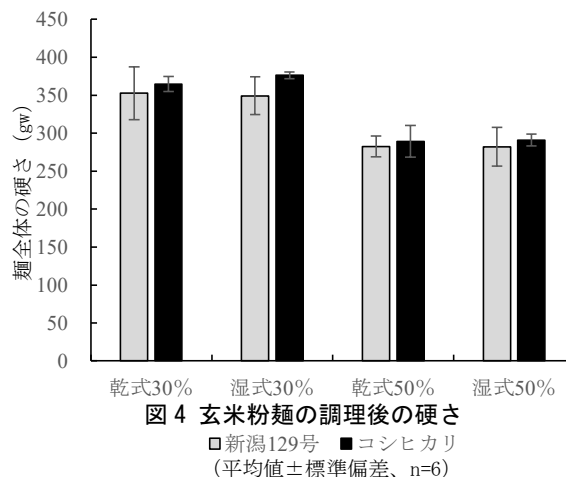


図4 玄米粉麺の調理後の硬さ

□新潟129号 ■コシヒカリ
(平均値±標準偏差、n=6)

4. 「新潟129号」玄米粉麺の難消化性澱粉含量と糊化度

茹でたて（茹で直後）、または茹でた後冷水処理を1分間行った（水冷1分）玄米粉麺の難消化性澱粉含量を図5に示した。「新潟129号」玄米粉麺の難消化性澱粉は、コシヒカリのものに比べて多かった（「新潟129号」：1.07~1.86%、コシヒカリ：0.31~0.49%）。「新潟129号」玄米粉麺は、代替量に応じて難消化性澱粉含量が増加したが、コシヒカリ玄米粉麺は、代替量に応じて減少した。このことから、コシヒカリ玄米粉の難消化性澱粉は小麦粉と比べて若干少なく、「新潟129号」玄米粉は、これらに比べて難消化性澱粉を多く含んでいることが示唆された。さらに、「新潟129号」玄米粉麺は、茹でた

後冷水に1分間晒すことで難消化性澱粉が増加し、澱粉の老化により難消化性澱粉が増加したものと推測された。したがって、「新潟129号」玄米粉麺は、温麺で食べるよりも冷麺で食べる方が効率よく難消化性澱粉を摂取できると考えられた。また、「新潟129号」において、乾式気流粉碎よりも湿式気流粉碎で製造した玄米粉を用いた方が麺の難消化性澱粉が多い結果となった。玄米粉の澱粉損傷度や粒度構成が影響している可能性があり、今後検討が必要と考えられた。

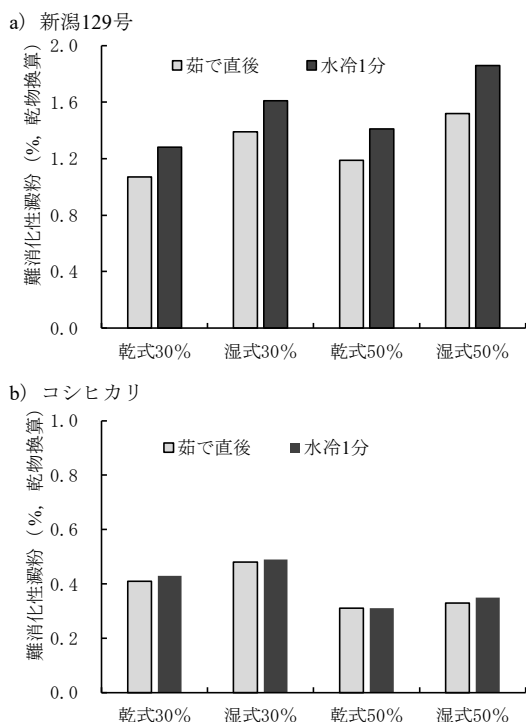


図5 玄米粉麺の難消化性澱粉含量

次に、調理後の玄米粉麺の糊化度を図6に示した。「新潟129号」玄米粉麺の糊化度は、コシヒカリ玄米粉麺に比べて低かった（「新潟129号」：48.4~72.6%，コシヒカリ：82.8~93.2%）。「新潟129号」玄米粉麺は、代替量に応じて糊化度が低下したが、コシヒカリ玄米粉麺は、代替量への依存は認められなかった。このことから、「新潟129号」玄米粉は、コシヒカリ玄米粉や小麦粉に比べて糊化しにくいことが確認され、高い難消化性の一因となっていることが示唆された。一方で、冷水に1分間晒らしたことによる糊化度の変化は、それぞれの玄米粉麺において異なっていた。特に、「新潟129号」玄米粉麺は、澱粉の老化により糊化度の低下が予測されたが、明らかな低下は認められなかった。なお、乾式気流粉碎よりも湿式気流粉碎した玄米粉を用いた場合、玄米粉麺の糊化度は高くなる傾向を示した。

佐々木¹⁰⁾は、増粘多糖類の併用により、澱粉の消化性が抑えられることを報告している。増粘多糖類は、米

粉麺のつなぎや食感改良に使われることが多く、今後これらを組み合わせることでさらに難消化性を増加できるものと考えられる。また、「新潟129号」玄米粉麺は、冷水に晒し澱粉を老化させることで、麺の硬さやコシの増強も期待できる。「新潟129号」玄米粉を用いることで、機能性と物性の両面から高品質な麺の製造が可能になると考えられた。

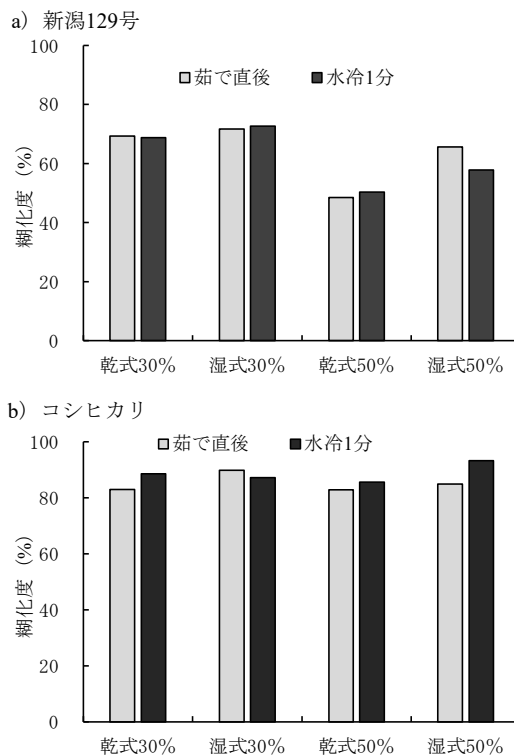


図6 玄米粉麺の調理後の外観

謝辞

本研究を実施するにあたり、新潟薬科大学大坪研一教授、伊藤満敏教授から懇切丁寧なご指導ご助言を賜り、深謝する。また、「新潟129号」を栽培し、分与いただいた新潟市農業研究活性化センター中村晴彦所長補佐、「新潟129号」の品種特性をご教授いただいた作物研究センター重山博信科長、松井崇晃専門研究員、柏崎農林振興部板谷越重人主査普及指導員に感謝する。

本研究は、イノベーション創出強化研究推進事業「超高齢化社会対応と輸出促進のための認知症・糖尿病複合予防効果のある米加工食品の開発」（令和元年~3年）により実施した。

引用文献

- (1) 佐藤光：イネ胚乳澱粉変異体の作製とその解析，農芸化学会誌，68，1577-1580(1994)。
- (2) 石崎和彦，松井崇晃，金田智，小林和幸，重山博信，阿部聖一，平尾賢一，星豊一：水稻新品種「こ

- しのめんじまん」, 新潟県農業総合研究所研究報告, 11, 19-26(2011).
- (3) Noro W., Itayagoshi S., Hosono R., Matsui T., Takahashi M., Nakamura S., Watanabe S. and Ohtsubo K.: Characterization of the new amylopectin long-chain rice cultivar Chou 2418 and its boiled rice grains, *Food Sci. Technol. Res.*, 25 (2), 227-235 (2019).
- (4) 青江誠一郎: 穀類に含まれる食物繊維の特徴について, *日本調理科学会誌*, 49(5), 297-302(2016).
- (5) 原本正文: 「米」利用による機能的加工食の展開, *美味技術学会誌*, 16(2), 51-56(2018).
- (6) 大坪研一, 柳瀬肇: 比色法による米の脂肪酸度の測定 —貯蔵による米の品質変化と Duncombe 法を改良して測定した脂肪酸度との関係について, *食品総合研究所研究報告*, 51, 59-65(1994).
- (7) 貝沼圭二, 松永暁子, 板川正秀, 小林昭一: β -アミラーゼ—プルランナーゼ (BAP) 系を用いた澱粉の糊化度, 老化度の新測定法, *澱粉科学*, 28(4), 235-240 (1981).
- (8) 中村充, 市原敬司, 栗田賢一, 治井敏明, 堀野成代, 庄條愛子, 宮谷秀一, 平井宏昭, 北村進一: *wx/ae* 米の長期経口摂取時における血中脂質代謝に与える影響, *日本栄養・食糧学会誌*, 66, 35-40(2013).
- (9) 野呂渉, 赤石隆一郎, 吉井洋一: 米粉パンの低GI化の可能性, *食品の試験と研究*, 50, 71(2013).
- (10) Sasaki T.: Effect of xanthan and guar gums on starch digestibility and texture of rice flour blend bread, *Cereal Chem.*, 95(1), 177-184(2018).

[ノート]

村上茶のカテキン類及び遊離アミノ酸含量の調査

相原浩太郎・太養寺真弓・中島正晴・
小林妙子¹⁾・滝澤結友・大源正明・西脇俊和
新潟県農業総合研究所食品研究センター
1) 現在、新潟県新潟地域振興局巻農業振興部

Study in the amount of tea catechins and free amino acids of the green tea leaves cultivated in the Murakami region, Niigata prefecture

Kotaro AIHARA, Mayumi TAIYOJI, Masaharu
NAKAJIMA, Taeko KOBAYASHI, Yu TAKIZAWA,
Masaaki DAIGEN and Toshikazu NISHIWAKI
Niigata Agricultural Research Institute Food
Research Center
1) Niigata Regional Promotion Bureau Maki
Agricultural Promotion Department

緒言

村上茶は新潟県村上市で生産され、生産量は日本の茶のうち約1%であるが、産業として400年の歴史を持ち、日本における茶の商業的な生産地では最北にある「北限の茶」として流通している。村上産茶葉は、やさしい味わい、まろやかな渋みが特長とされている⁽¹⁾。しかし、村上茶の成分に関する報告はこれまでほとんどない。

そこで、本研究では、村上茶の成分の特長を把握するため、村上産及び県外産茶葉に含まれる、日本茶の味に影響を与えるとされる成分、カテキン類及び主要な遊離アミノ酸を分析定量した。

実験方法

1. 材料

本試験では、村上産及び対照として県外産の茶葉（緑茶）を用いた。2019年産21種（村上産9種、県外産12種）、2020年産31種（村上産27種、県外産4種）であり、いずれも一番茶を摘採後、荒茶に加工された茶葉を用いた。茶葉の品種及び産地は図1及び図2のグラフ横軸に示した。茶葉は村上産茶葉組合より提供を受けた。

2. 成分分析

(1) カテキン類

茶中のカテキン類の抽出は既報⁽²⁾の方法に準拠して行い、粉碎した茶葉の粉末約30mgを試験管に採取し100°Cの熱湯3mLで30分間熱抽出した。抽出液をメンブランフィルター(0.45μm)にて濾過し、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で分析した。8種類のカテキンは、(-)-エピカテキン(EC)、(-)-エピガロカテキン(EGC)、(-)-エピカテキンガレート(EGCG)及び(-)-エピガロカテキンガレート(EGCG)と、その熱異性化体である(+)-カテキン(C)、(-)-ガロカテキン(GC)、(-)-カテキンガレート(CG)及び(-)-ガロカテキンガレート(GCG)をそれぞれ定量し、それらの合計値をカテキン類の定量値とした。

(2) 遊離アミノ酸

茶中のアミノ酸の抽出は既報⁽³⁾の方法に準拠して行い、茶葉粉末約30mgを試験管に採取し80°Cの熱湯3mLで30分間熱抽出した。抽出液をメンブランフィルター(0.45μm)にて濾過し、オルトフタルアルデヒド(OPA)誘導体化によるHPLC法によりテアニン、グルタミン酸、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン、セリン、アスパラギン、アラニンを分析した。

実験結果及び考察

1. カテキン類の含量

各サンプルにおけるカテキン類の含量を図1に示す。また、カテキン類及びそれらの中でも機能が期待される成分であるEGC及びEGCGについて、2019及び2020年産の茶葉のうち、同一県産で3サンプル以上分析した品種(やぶきた、在来種)の平均値を図2に示す。

カテキン8種の中ではEGCGが最も多く、カテキン類の約20~30%含まれ、次いでGCが20%前後、EGC及びGCGが約10~20%含まれていたが、品種や産地による組成の特徴は見られなかった。遮光栽培を行った(かぶせ茶)サンプルは総じてカテキン類含量が低く(図1A、B)、遮光栽培を行った村上茶も同様であった(図1B)。新芽の生育期間中に遮光を行うと露地栽培より遊離アミノ酸類の含量が高く、カテキン類の含量が低くなることが報告されている⁽⁴⁾

村上産やぶきた及び在来種のカテキン類やEGCG含量は、静岡産よりも有意に高かったが(図2)、それらの差が品種、産地、栽培方法や摘採時期、製茶方法等によるものか不明である。

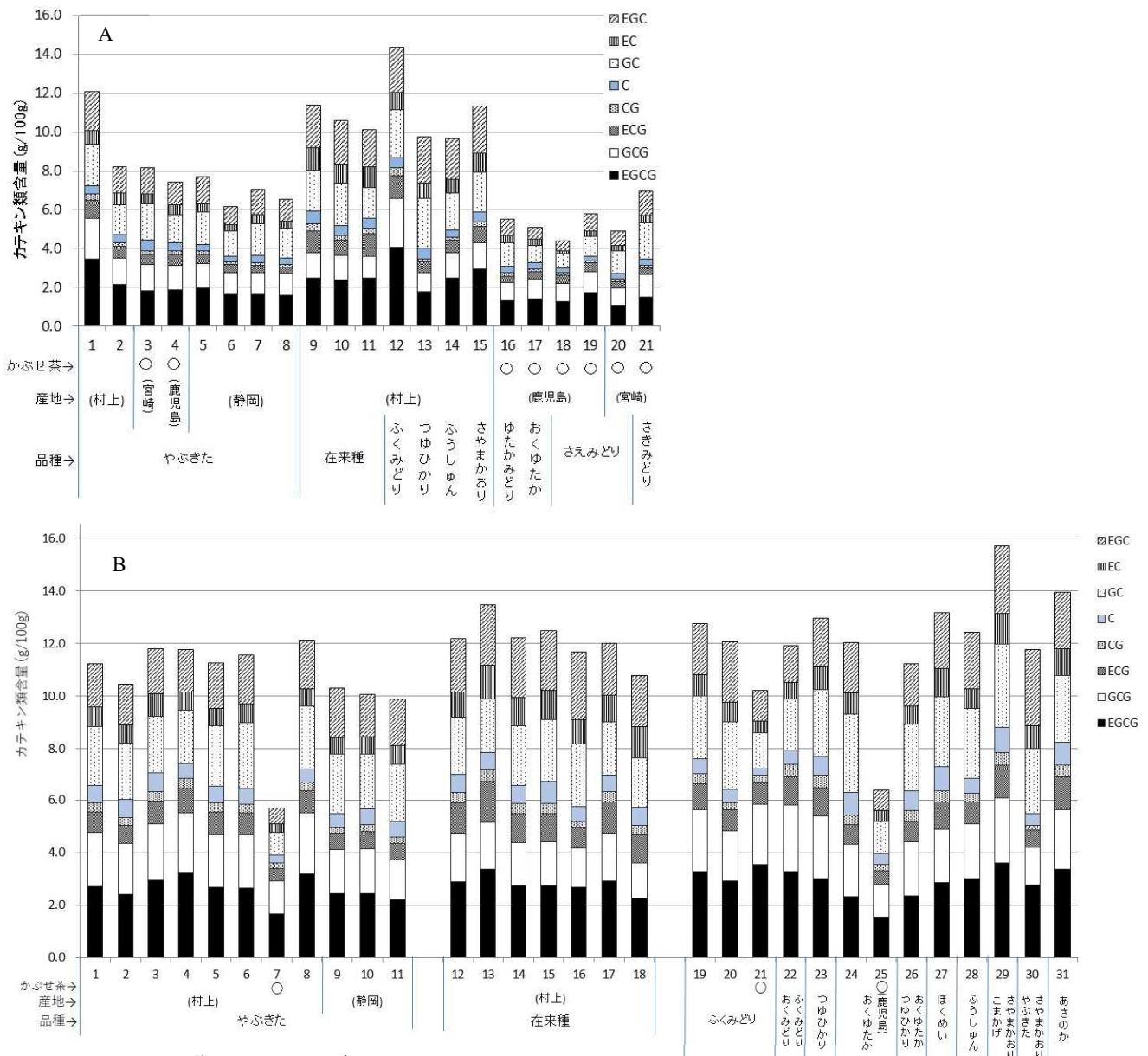


図1 茶葉のカテキン類含量

A 2019年産 B 2020年産；試料No.19~31は村上産茶葉（No.25を除く）

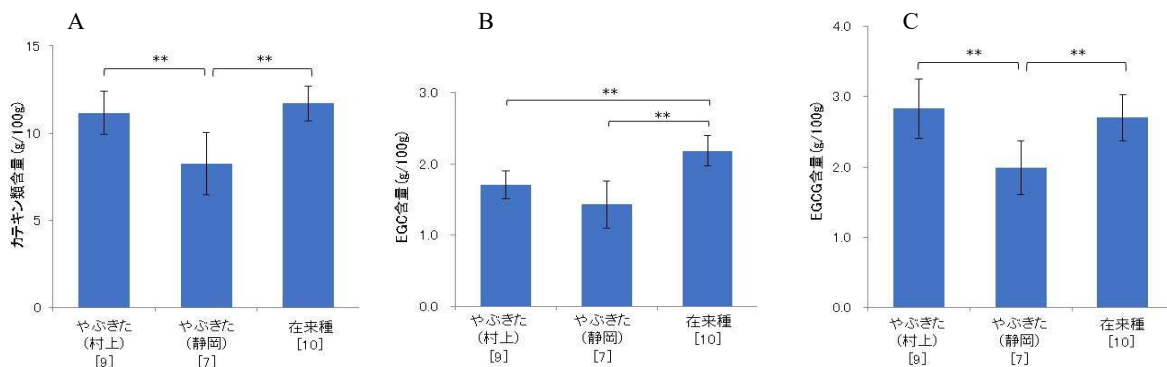


図2 茶葉のカテキン類含量の比較

A カテキン類 B EGC C EGCG

(平均値±標準偏差；有意差あり，* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$)

2019及び2020年産の茶葉のうち3点以上分析した品種の平均値を示す

[]内数字はサンプル数を示す。(遮光栽培のサンプルは除く)

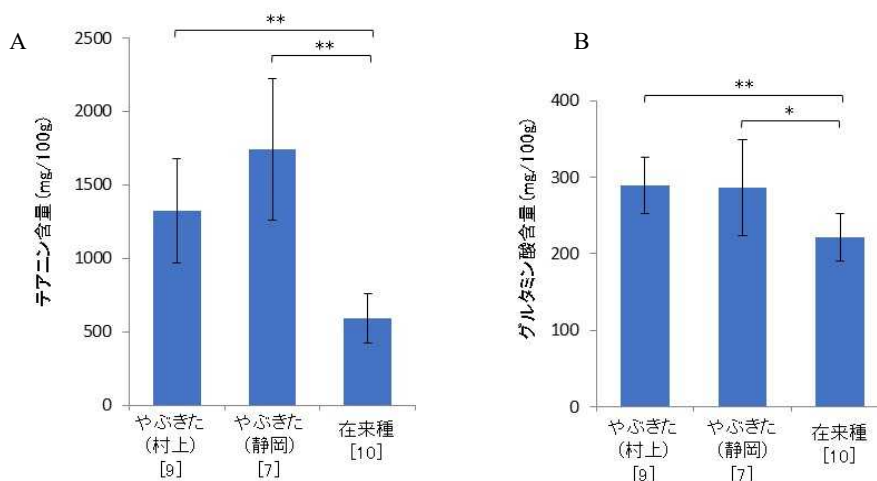


図4 茶葉のテアニン及びグルタミン酸含量の比較

A テアニン B グルタミン酸

(平均値±標準偏差；有意差あり，* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$)

2019 及び 2020 年産の茶葉のうち 3 点以上分析した品種の平均値を示す

3. 総合考察

本研究により村上茶の特長ある風味をもたらす要因を示唆する手がかりは得られなかったが、これまでほとんど調べられていなかった村上茶の多様なサンプルの成分分析データを得ることができた。

村上茶は、冬期間の降雪及び日本海からの厳しい寒風、また春先の新芽が成長する時期に無風になることが少なく遅霜の被害があまり見られない等特有の栽培環境によって甘味、旨味、渋味、苦味さらに香気が調和した独自の味わいを持つとされる。また遮光栽培により苦渋味の少ない甘味、旨味の強い茶の栽培も可能であるため、村上茶は他産地の茶と同様に消費者の幅広い需要に応えられる。また、品種以外に在来種が多く残っていることも村上茶の特長の一つで、この在来種も活かして消費者の需要に応えている⁷⁾。

茶の風味はタンニン等の苦味渋味とアミノ酸類等の旨味や甘味の調和、さらに香気成分も関与すると考えられ、複数成分のバランスが重要と言われている。村上茶の風味の特長を本研究結果から説明するのは難しく、茶葉固有の成分含有量以外にも様々な要因が存在する可能性があり、村上茶の風味を形成する要因の解明は今後の課題であるが、村上茶の品質としては明治期より評価は高く、近年にかけても各種博覧会、品評会等において受賞実績があり⁷⁾、他産地と遜色ないことが推察できる。風味に関しては、例えば、製茶工程では、最初の工程である蒸熱の時間を 2~3 倍以上多くした煎茶（深蒸し茶）は、浸出液の水溶性ペクチン含量が増加し、渋味が抑制されるとの報告があり⁸⁾、加工方法が風味に影響する可能性を

示す。また、茶の香気成分も風味に影響する重要な要素である。村上茶の香気成分に関する報告もこれまでになく、香気成分の解析により風味の特長をもたらす手がかりが得られる可能性もある。茶の香りの産地間差に関しては、国内主要産地で製造されたやぶきた品種の緑茶の香気成分を分析し各産地の特徴を比較した報告がある⁹⁾。

茶葉の成分含量の比較で留意すべきこととして、同産地、同品種の中でも、事業者や圃場により茶樹の栽培履歴、環境、栽培方法、荒茶の製造方法などがある程度異なると考えられ、それらが茶葉の成分含量に影響を及ぼす可能性がある。さらに、今回、県外産（主に静岡）の茶葉については、同県内で数ある産地の中から一部の茶葉を用いたに過ぎない。県外産地とのより詳細な比較を行うためには、村上を含め各産地の事業者からそれぞれの品種ごとに栽培方法や加工（製茶）条件等を調査した上で、それらがある程度共通した茶葉を多くサンプリングする必要がある。

今回の分析結果より、村上茶は品種や栽培方法によってはカテキン類、テアニンの十分な量の摂取が可能と考えられる。カテキン類は、茶の風味に影響するだけでなく、茶の成分の中では最も多様な健康機能性（抗酸化、脂質代謝改善、免疫賦活等）がこれまでに報告され、エビデンスも充実している¹⁰⁾。機能性を示すにはやや多量を摂取する必要があるが（機能性表示食品では茶カテキンとして 1 日 400~540 mg）¹¹⁾、茶葉で緑茶飲料を調製した際に、相当する成分量が含まれば、機能性表示の可能性もある。また、テアニンも抗ストレス、脳機能改善等の機能性があり¹⁰⁾、機能性表示食品の関与成分とし

て多く利用されている。こちらも機能性表示食品では 1 日 200~400 mg⁽¹¹⁾とやや多量に摂取する必要があるが、村上産茶葉でも栽培方法（遮光栽培によるかぶせ茶）や品種によりテアニンが多く含まれ、機能性が期待できると考えられる。

謝辞

本研究に供試された村上産及び県外産の茶葉は、村上市茶業組合よりご提供いただきました。村上地域振興局農林振興部より試料や試薬、消耗品の手配などご協力いただきました。諸氏に深く感謝申し上げます。

引用文献

- (1) 立山ら，新潟県の“茶の食文化”考，県立女子短期大学研究紀要，38，207-213 (2001).
- (2) 中川ら，緑茶飲料中に含まれるポリフェノールの定量と茶葉の種類によるポリフェノール含量の違い，BUNSEKI KAGAKU，62，51-55 (2013).
- (3) 高柳ら，高速液体クロマトグラフィーによる茶のアミノ酸類の定量，茶業研究報告，69，29-34(1989).
- (4) 松永ら，直がけ被覆における遮光率の違いが一番茶新芽内化学成分に及ぼす影響，茶業研究報告，122，1-7 (2016).

- (5) 山本(前田)ら，茶の品種，摘採期と製造法によるエピガロカテキン 3-O-(3-O-メチル)ガレート含量の変動，日食科工会誌，48，64-68 (2001).
- (6) 小林ら，光強度がチャ新芽の葉色および成分に及ぼす影響，茶業研究報告，111，39-49 (2011).
- (7) 山川智子，「北限の茶」村上茶 400 年，物語を紡ぐ茶処の「不撓不屈」，長岡大学研究論叢，19，59-71 (2021).
- (8) 廣野ら，蒸し度の異なる煎茶(荒茶)における水溶性ペクチンとカテキン類の含量分析，日食科工会誌，67，264-270 (2020).
- (9) Hattori S et al., A Comparison of the Volatile Compounds in Several Green Teas, *Food Sci. Technol. Res.*, 11, 82-86 (2005).
- (10) 日本茶業体制強化推進協議会，茶の健康効果 20 選 (2020).
- (11) 届出食品の科学的根拠等に関する基本情報（消費者庁機能性表示食品の届出情報検索）
<https://www.fld.caa.go.jp/caaks/cssc01/>

JOURNAL OF THE NIIGATA AGRICULTURAL RESEARCH INSTITUTE
No.20
CONTENTS

[ORIGINAL PAPERS]

1. **Rice cultivation in reducing chemical fertilizer alternating all of basal fertilizer with high-nitrogen chicken manure**
Yuichiro FURUKAWA, Yasutaka IMAI, Toru TSUCHIDA, Makoto HATTORI and Toru SATO..... 1
 2. **Evaluation of effect of soil temperature on development of carrot (*Daucus carota* L. subsp. *sativus* (Hoffm.) Archang.) root**
Koji KISHI and Yoshitaka TAZAKI..... 9
 3. **Effects of different harvesting times on yield, feed composition, etc. of Sudan type sorghum "Suzukaze" and quality evaluation through livestock**
Shota SHIMIZU, Wataru OYANAGI, Kenichi HIRAO and Yuri KOBASHI..... 17
 4. **Effect of cleavage state after in vitro fertilization in embryos derived from bovine vitrified oocytes on blastocyst development and fertility after embryo transfer**
Takashi YAMAGA, Yuki ICHIKAWA, Shinji FUKUDOME and Hiroshi NAKAGAWA..... 23
-

[NOTE]

5. **Reduction of Paddy Field Weed Emergence Quantity by Interrow Space Weeding after Heading Stage in Organic Rice Production**
Hirotomo OHBA 31
 6. **A Simple Method for Measuring Exchanged Soil Potassium by Using Sodium Acetate Solution Extraction and A Compact Potassium Ion Meter**
Wataru OYANAGI and Shota SHIMIZU 35
 7. **β -Cryptoxanthin content of 'Okesa-gaki' persimmon**
Mayumi TAIYOJI, Taeko KOBAYASHI, Kazuhito SATOH, Kaichi SATOH and Masaharu NAKAJIMA..... 38
 8. **Study on simplified analysis of useful components in Kagurananban**
Masaharu NAKAJIMA, Ryuho MATSUOKA, Mayumi TAIYOJI, Reiko NAKAO and Kotaro AIHARA..... 42
 9. **Characteristics of the brown rice flour of the new rice line "Niigata 129" and that processed noodles**
Wataru NORO, Noriyuki HOMMA, Tomoko SASAKI, Junko MATSUKI and Kouichi SHISHIDO..... 47
 10. **Study in the amount of tea catechins and free amino acids of the green tea leaves cultivated in the Murakami region, Niigata prefecture**
Kotaro AIHARA, Mayumi TAIYOJI, Masaharu NAKAJIMA, Taeko KOBAYASHI, Yu TAKIZAWA, Masaaki DAIGEN and Toshikazu NISHIWAKI..... 52
-

新潟県農業総合研究所研究報告 第20号

令和5年3月31日印刷

令和5年3月31日発行

新潟県農業総合研究所

所長 眞島 操

〒940-0826 新潟県長岡市長倉町 857

TEL 0258(35)0823

FAX 0258(39)8498