

石川畜試研報
Bull.Ishikawa Pref.List.
Res.Center

ISSN 1347-913X

Bulletin
of the
Ishikawa Prefectural Agriculture And Forestry Research Center
Livestock Experiment Station
No. 47
December-2018

石川県農林総合研究センター 畜産試験場研究報告

第47号

平成30年12月

石川県農林総合研究センター 畜産試験場

石川県羽咋郡宝達志水町坪山

Ishikawa Prefectural Agriculture And Forestry Research Center
Livestock Experiment Station
Hodatsushimizu, Ishikawa, Japan

石川県農林総合研究センター畜産試験場研究報告

第47号

平成30年12月

目 次

1. 未利用資源を活用した免疫機能向上試験（第1報）
ワイン粕の給与が周産期のホルスタイン種および黒毛和種
繁殖雌牛の免疫動態に及ぼす影響・・・・・・・・・・・・・・・・ 1
2. 未利用資源を活用した免疫機能向上試験（第2報）
ワイン粕サイレージの調整技術・・・・・・・・・・・・・・・・ 6
3. 黒毛和種における胚生産能力予測技術および卵巣機能改善
技術の検討・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 9
4. 地域の未利用資源を活用した豚ふん堆肥化時に発生する
アンモニア低減技術・・・・・・・・・・・・・・・・ 15

未利用資源を活用した免疫機能向上試験（第1報） ワイン粕の給与が周産期のホルスタイン種および 黒毛和種繁殖雌牛の免疫動態に及ぼす影響

石田美保¹⁾・浅野佳吾²⁾・上地正英³⁾・山本宏⁴⁾・石田元彦²⁾

1)石川県農林総合研究センター畜産試験場能登畜産センター

2)石川県立大学

3)石川県南部家畜保健衛生所

4)石川県農林水産部農業政策課

Function improvement of cows using unused resources of immunity
Effect of Feeding Wine Residues on Immune Response of Japanese Black Cows and
Holstein Dairy Cows during Perinatal Stage

Miho Ishida, Keigo Asano, Masahide Uechi, Hiroshi Yamamoto, Motohiko Ishida

キーワード：ワイン粕，免疫機能，周産期

要 約

石川県内ワイン製造工場から排出された赤ワイン粕に含まれるポリフェノールの抗酸化作用について、分娩前後のホルスタイン雌牛および黒毛和種繁殖雌牛を用いて検討した。白血球サブポピュレーション分析では、ワイン粕を給与することで、免疫機能の亢進作用が示された。また、N/L比は、分娩後の子宮内炎症スケールの簡易測定に応用可能であることも示唆された。

I 緒 論

近年の乳用牛は泌乳能力の向上により、分娩前後には抗酸化物質やビタミン、ミネラル等が不足し、免疫機能の低下を引き起こし、ケトーシス、乳熱や乳房炎などの周産期病が多発することが知られている(久米2012)。この分娩前後における免疫能の低下は、乳房炎や産褥性子宮炎の発生と関連があり、また、妊娠末期の乳牛に対するセレンウムやビタミンEおよび種々の免疫賦活物質の投与は、分娩前後における免疫能の低下を軽減し、乳房炎や産褥性子宮炎などの周産期感染症を予防する効果がある(佐藤1998)とされている。

Kashiwazaki etc (1985) は、初産及び経産牛の分娩前後における末梢血リンパ球の幼若化反応を検討した結果、経産牛では、分娩後10日から30日前後に著しく低下した。また、分娩を契機としてリンパ球幼若化能、Tリンパ球数および血清IgG濃度は低下し、回復は分娩後約3週間であったとの報告(Ishikawa 1987)もある。Ohtsukaら(2004)も、牛において、分娩前後にみられる乳房炎や産褥熱などの炎症疾患の発生には、白血球機能低下が深く関与していることを指摘している。

一方で、生産者は、不足する栄養成分などを、添加

剤などで補っているが価格が高く、効果も限定的なことから、安価で広く汎用性のある添加物が望まれている。栗木ら(2004)は抗酸化作用等の機能性成分を含み、給与することにより畜産物の品質向上が期待できる副産物について検討した結果、ウーロン茶ガラ、緑茶ガラについて山ブドウワイン粕のポリフェノール量、抗酸化力が高いと報告している。

本研究は、県内でも生産拡大の可能性があり、ビタミンやポリフェノールなどの機能性成分を多く含有する赤ワインの製造残さ(以下「ワイン粕」)を、周産期のホルスタイン種雌牛および黒毛和種繁殖雌牛に給与することで、免疫機能に与える影響を検討した。

II 材料および方法

試験 I ワイン粕粉末給与と牛の分娩前後の白血球ポピュレーション

県内ワイナリーから2014年9月末から10月上旬にかけて排出されたワイン粕を用いた。

持ち帰ったワイン粕は常法(自給飼料品質評価研究会2001)にそって一般飼料分析を行った。

ワイン粕のポリフェノール量の測定は石川県工業試験場化学食品部食品加工技術研究室に依頼した。すなわち、粉碎した試料を 5g 採取し、約 30mL の 80(v/v)%エタノール溶液中で 2 時間振とう抽出を行った。5,000rpm で 5 分間遠心後、上清を 50mL 容メスフラスコに回収し、さらに沈殿に 80%エタノール溶液を少量ずつ加えて攪拌して同様の上清回収操作を繰り返した後、50mL にメスアップした。これを 0.45 μ m メンブランフィルター (Millipore 製マイクロレス SLHN033NB) でろ過した溶液について適宜希釈して測定用試料とし、FolinCiocalteu 法により測定を行った。標準試料は、没食子酸 (Wako 製特級試薬) を使用した。測定は各試料 3 回ずつ行った。

ワイン粕は、通風乾燥機 (RTF560 不二製作所 東京) を用い、40°C 24 時間以上加熱後、粉碎機 (ULTRA CENTRIFUGAL MILL 三田村理研工業 東京) を用いて粉末化 (1mm メッシュ) したものを供した。

供試牛は、県内酪農家繋養ホルスタイン種雌牛および県内和牛繋養農家繋養黒毛和種繁殖雌牛を試験区、対照区それぞれ 1 頭ずつとした。試験区は乾燥ワイン粕を分娩 4 週間前から分娩 4 週間後まで朝夕 1 kg ずつ、日量 2kg を給与した。

採血は、分娩前約 30 日 (-30d)、分娩前約 10 日 (-10d)、分娩直後 (0d)、分娩後約 10 日 (10d)、分娩後約 15 日 (15d)、分娩後約 30 日 (30d) に尾静脈より実施した。

血液は一般生化学検査、白血球数 (WBC) およびフローサイトメトリー法による白血球サブポピュレーションの分析に供した。白血球サブポピュレーションの分析では、血液 3mL を溶血して白血球を分離した後、細胞数濃度 10^6 cell/mL の白血球浮遊液を作成した。一次抗体には、抗 CD4 (MCA837GA; AbD Serotec)、抗 CD8 (MCA1653GA; AbD Serotec)、抗 CD335 (MCA5933GA; AbD Serotec)、抗 MHC classII (BOV-CAT2012; Monoclonal Antibody Center)、抗 CD14 (ab27545; Abcam) を用いた。二次抗体には FITC (562028; Becton Dickinson)、APC (560089; Becton Dickinson) を用いた。抗体による白血球の免疫染色の後、フローサイトメーター (FACS Aria; Becton Dickinson) を用いて、顆粒球とリンパ球・単球に分け、リンパ球・単球についてはサブタイプの陽性細胞率を解析した。各種白血球数 (10^2 cell/ μ L) はそれぞれのポピュレーションと総白血球数 (WBC) から算出した。

試験Ⅱ ワイン粕給与による免疫機能の簡易的確認

石川県農林総合研究センター畜産試験場 (以下、畜産試験場とする) 繋養ホルスタイン種 23 頭の分娩前後の N/L 比 (好中球/リンパ球) を測定した。採血は、尾静脈から朝の搾乳終了後の午前 10 時頃 (分娩直後を除く) に、分娩 4 週間前から分娩 4 週間後まで 1 週間おきにへパリン管で採取し、スライドガラスに塗抹し染色 (ディクック シスマック株式会社 兵庫県) し、N/L 比を算出した。

また、うち 1 頭について、ワイン粕サイレージ無給与時の分娩 (2013 年 2 産目) 前後の N/L 比と次産 (2014 年 3 産目) 時にワイン粕サイレージ (第 2 報: 水分 65%、ワイン粕原物に対して乳酸菌製剤 0.001%、グルコース 0.2% をそれぞれ添加) を分娩前後 4 週間朝、夕 4kg ずつ給与し、その N/L 比を比較するとともに抗酸化作

用についても抗酸化能測定キット「PAO」(日本老化学制御研究所 静岡県) を用いて検討した。

Ⅲ 結果および考察

ワイン粕の一般栄養成分は表-1 のとおりであった。ポリフェノール量は 558 ± 23.8 (mg-没食子酸相当量/100g) であり、ブルーベリー、ぶどう等を含む 32 種類の果実 (木村ら 2008) に比較して多かった。

表-1 ワイン粕成分 (%)

DM	CP	EE	CF	ASH	Ca	P	K	Mg
49.3	11.4	5.4	19.0	14.8	0.48	0.20	6.62	0.03

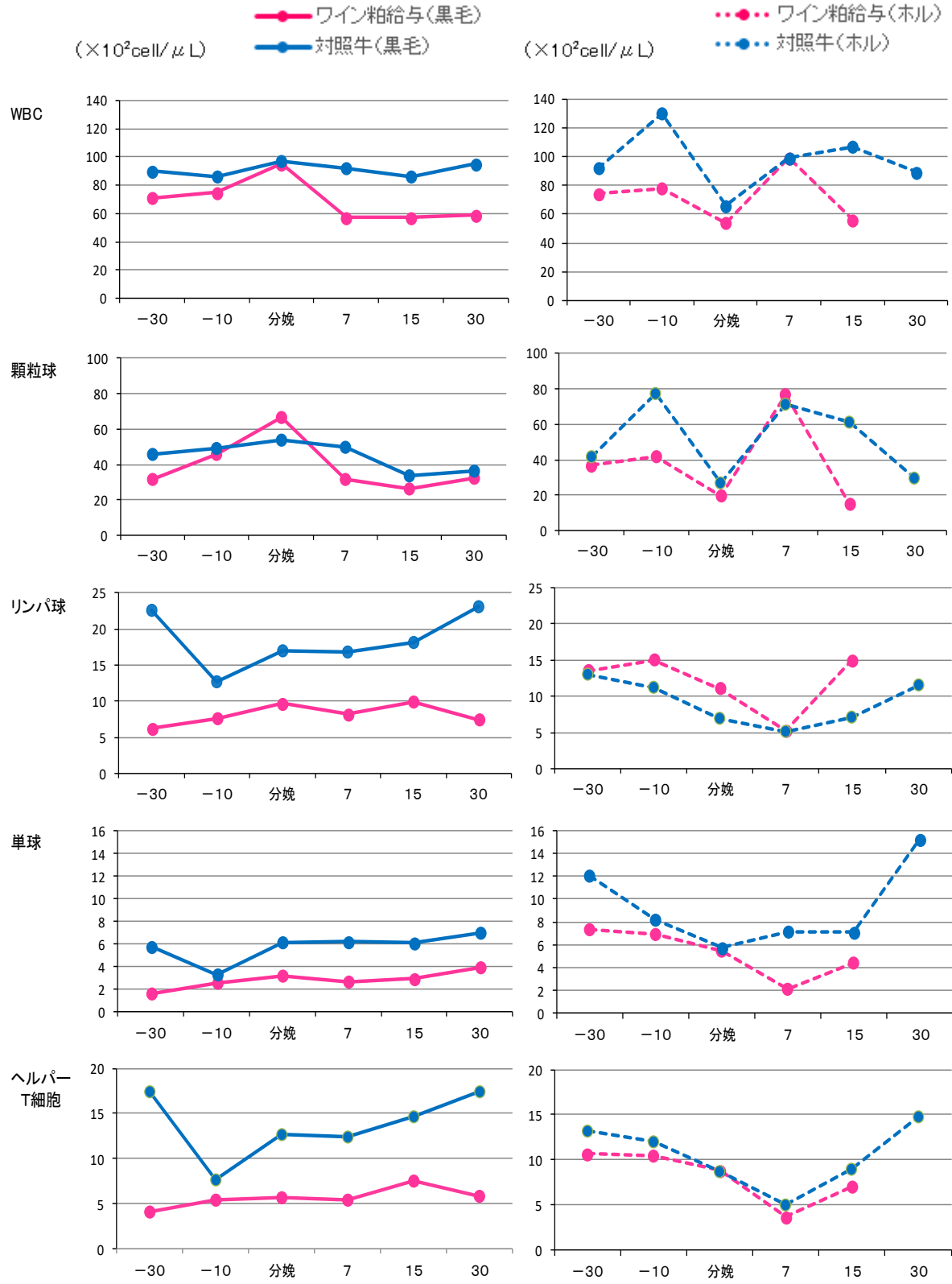
黒毛和種繁殖雌牛において、対照区の WBC は分娩前後に大きな変化はなく、ワイン粕区と比べて高い細胞数を維持している (図-1)。一方、ワイン粕区では分娩に合わせて細胞数が上昇して分娩後に下降し、30 日目まで低い値で推移した。この WBC と同様の動態を示したのは顆粒球であった。顆粒球の大半を占めるのは好中球であることから、ワイン粕区では母体の分娩前後に生じる傷害や感染症に対して多くの好中球が遊走され、炎症反応が分娩後速やかに抑制されると推察される。また、こうした好中球の迅速な免疫応答による生体防御には、好中球自体の機能向上も考えられ、ワイン粕給与による好中球の活性化についての検証は今後の課題としたい。ワイン粕区と比較して対照区の WBC が高水準であるのは、リンパ球、単球 (マクロファージ)、NK 細胞が、試験期間を通して高水準であるためだと考えられ、対照区ではワイン粕区と比べて分娩後の炎症反応が長期化していると推察する。リンパ球のうち対照区の CD4+ヘルパー T 細胞および CD8+キラー T 細胞は、分娩前約 30 日と分娩後にワイン粕区に比べ高水準となっているが、分娩前の CD4+/CD8+比 (低値は免疫不全を示す) は対照区で低い傾向があった。このことから、対照区では分娩前からヘルパー T 細胞に起因する獲得免疫系の機能が低下しており、これが分娩後の炎症反応の長期化の一因となっていたことが考えられた。一方で、ワイン粕区のリンパ球やヘルパー T 細胞、キラー T 細胞数は試験期間を通して大きな増減はなく、獲得免疫系における免疫バランスを一定に保つ効果が示唆された。

ホルスタイン種においても、分娩時まで維持された WBC や顆粒球の、分娩後の上昇下降という迅速な炎症反応の抑制が見られた (図-2)。ホルスタイン種のような高泌乳牛の場合、分娩直後からの乳量の急増に伴い、母体のエネルギーや栄養素のロスが大きくなる。エネルギーやタンパク質、ミネラル、ビタミンなどの不足は免疫機能を低下させることが知られており、本試験においても両区のリンパ球 (ヘルパー・キラー T 細胞)、単球、NK 細胞は分娩前後にかけて下降し、分娩直後や分娩後 10 日には試験期間中最低水準となった。これは上述の生理機能・体内代謝の急激な変動によるものと推察される。一方、ワイン粕区の分娩までリンパ球は対照区に比較して高水準であり、対照区が分娩後約 30 日で元の細胞数に戻ったのに対し、ワイ

ン粕区は分娩後約 15 日には戻った。この細胞数の差は、リンパ球のうちの B 細胞数の増加に起因していることが示された。ワイン粕区の B 細胞は分娩直後まで高水準であり、生理・代謝に由来する下降の後、再び上昇していた。B 細胞は骨髄で産生され、抗原提示を受けて IgG や IgA といった抗体産生を行う液性免疫細胞であるが、その増殖はヘルパー T 細胞の抗原提示や放出するサイトカインの補助によっても促進される。本研究のワイン粕区における分娩前のヘルパー T 細胞減少に反する B 細胞の増加は、B 細胞の産生分化能が

高まった、あるいはヘルパー T 細胞の補助的機能の高まったことが理由として考えられるが、詳細の解明にはさらなる調査が必要である。

本研究では、ワイン粕の給与によって黒毛和種とホルスタイン種の両種で、顆粒球（好中球）による炎症反応の抑制作用の亢進が認められた。また、黒毛和種繁殖雌牛ではヘルパー・キラー T 細胞の免疫バランスの維持調整能、ホルスタイン種乳牛では B 細胞の増加促進といった獲得免疫系における免疫機能の亢進作用も示された。



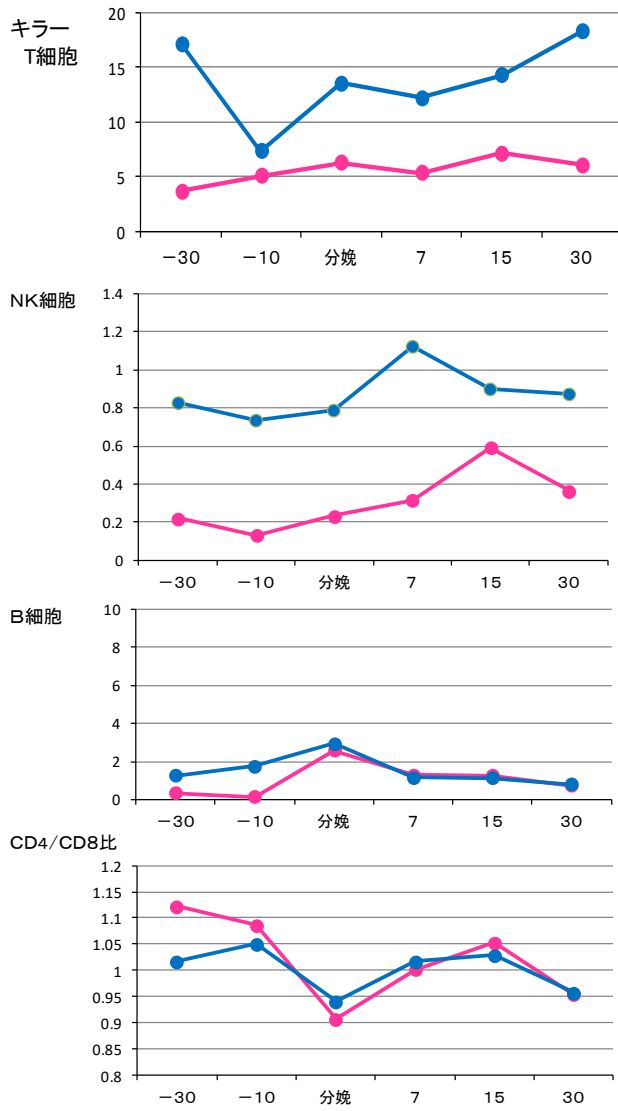


図-1 黒毛和種の免疫機能動態

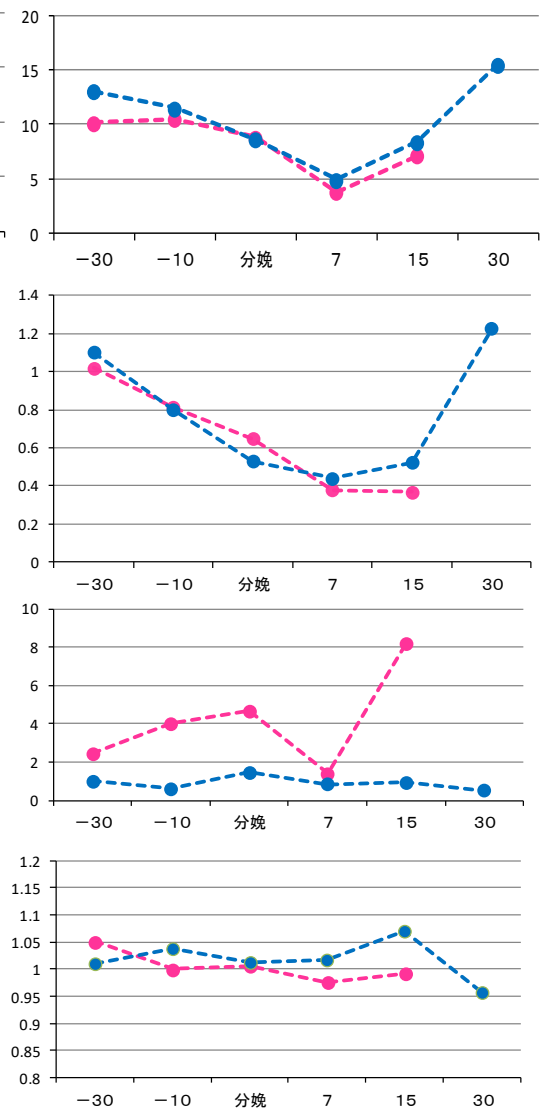


図-2 ホルスタイン種の免疫機能動態

N/L比と顆粒球数の相関については(図-3) $R^2=0.6$ と正の相関があることが示された。

分娩前後のN/L比の推移(図-4)を見ると、ワイン粕サイレージ給与では分娩直後の抗炎症反応が強く

表れ、好中球が急増し、その後は低く推移した。無給与では、分娩前後の変動はないが、分娩後3週目まで漸増した。

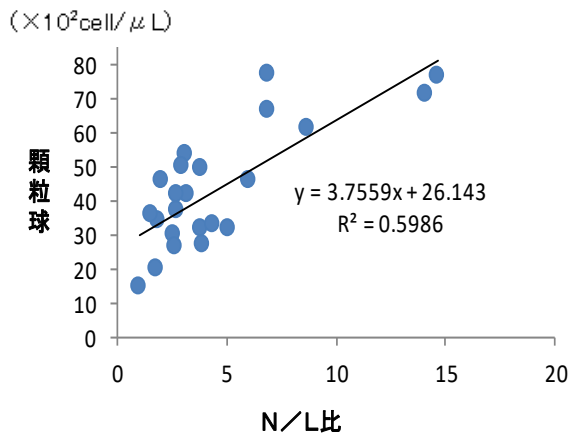


図-3 N/L比と顆粒球の相関

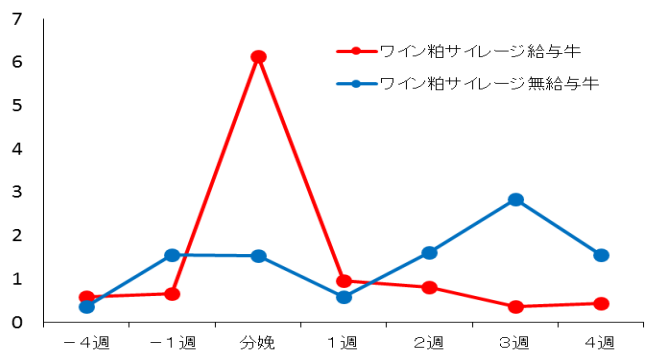


図-4 N/L比の推移

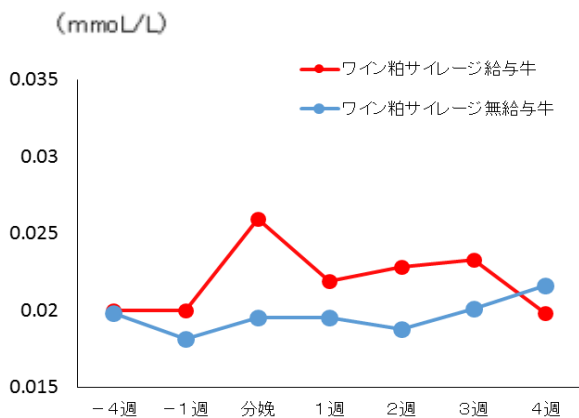


図-5 抗酸化の推移

以上のことから、ワイン粕サイレージ給与では、無給与と比較して、分娩時の炎症に迅速に反応し、早期に沈静化する傾向が見られた。また血中抗酸化能が、ワイン粕サイレージ給与で分娩後3週まで無給与を上回っていた(図-5)ことから、ワイン粕給与による抗酸化効果が期待できると考える。N/L比はヒトでは褥瘡発症予測(山口ら2015)に用いられているが、本試験の結果から、ウシにおいては分娩後の子宮内の炎症スケールの簡易的測定に応用できる可能性があると考ええる。ワイン粕は夏季にワイン用ぶどうを収穫し、アルコール発酵を施してから絞る工程で発生するため、年間通して定時定量排出されことはない。また、赤ワイン粕は、ぶどうを皮ごと発酵させてから搾る工程を経るため、アルコールを多く含み、そのままでも製造された秋口から春へかけての保存は可能であるが、気温が上昇する春先から夏にかけては腐敗が進み保存できない。そのため年間通しての保存方法の検討については第2報で述べる。

V 謝辞

ワイン粕サイレージ等のポリフェノール含有量測定を実施していただいた石川県工業試験場化学食品部食品加工技術研究室、辻篤史主任技師に深謝致します。

VI 引用文献

- Ishikawa, H. 1987. Observation of Lymphocyte Function in Perinatal Cows and Neonatal Calves. *Jpn. J. Vet. Sci.* 49:469-475
- 木村英生・長沼孝多・小嶋匡人・小松正和・恩田 匠・辻政雄. 2008. 山梨県産果実の総ポリフェノール含量とそのDPPHラジカル消去活性. 山梨県工業技術センター研究報告. 22:59-63
- 久米新一. 2012. 高泌乳牛の周産期病の発生要因と栄養管理によるその予防. *畜産の研究.* 66:247-254
- 栗木隆吉, 黒岩力也. 2008. 地域食品製造副産物を利用した高機能畜産物の生産技術の開発—地域食品製造副産物に含まれる機能性成分と飼料特性について—. *岡山総畜セ研報* 15:6-10
- Ohtsuka, H., Koiwa, M., Fukuda, S., Hayashi, T., Hoshi, F., Yoshino, T. and Kawamura, S. 2004. Changes in peripheral leukocyte subsets in dairy cows with inflammatory diseases after calving. *J. Vet. Med. Sci.* 66:905-909.
- 佐藤繁. 1998. 乳牛の分娩前後における免疫能の変化および免疫賦活物質の影響. *東北家畜臨床研誌.* 21:61-70
- 山口孝一, 大畑雅彦. 2015. 褥瘡発症を予防するOHスケールとN-L比の比較. *医学検査.* 1-6
- 自給飼料品質評価研究会編, 三訂版. 2009. 粗飼料の品質評価ガイドブック. 日本草地畜産種子協会. 東京

未利用資源を活用した免疫機能向上試験（第2報） ワイン粕サイレージの調製技術

石田美保¹⁾・浅野佳吾²⁾・干場宏樹³⁾・山本宏⁴⁾ 石田元彦²⁾

- 1) 石川県農林総合研究センター畜産試験場能登畜産センター
- 2) 石川県立大学
- 3) 石川県農林業公社富来放牧場
- 4) 石川県農林水産部農業政策課

Function improvement of cows using unused resources of immunity
Development of Preparation Technique of Grape Wine Residue silage

Miho Ishida, Keigo Asano, Hiroki Hoshiba, Hiroshi Yamoo, Motohiko Ishida

キーワード：ワイン粕，サイレージ

要 約

石川県内ワイン製造工場から排出された赤ワイン粕の保存方法として、サイレージ調製方法の検討をした。水分調整とグルコース、乳酸菌の添加について効果をみたが、添加による効果は認められなかった。乳酸菌を添加したワイン粕サイレージの嗜好性については、問題がなかった。

I 緒 論

本研究は、県内でも生産拡大の可能性があり、ビタミンやポリフェノールなどの機能性成分を多く含有する赤ワインの製造残さ（以下「ワイン粕」）を、周産期のホルスタイン種雌牛に給与することで、免疫機能の向上を目的としている。

赤ワイン粕は夏季にワイン用ぶどうを収穫し、アルコール発酵を施してから絞る工程で発生するため、年間を通して定時定量排出されることはない。また、アルコールを多く含むため、そのままでも製造された秋口から低温期である冬季へかけての保存は可能であるが、気温が上昇する春先から夏にかけては腐敗が進み保存不可能となる。そのため年間通しての保存方法の検討が必要である。

今回は、ワイン粕の長期保存性を、小規模サイレージ発酵試験であるパウチ法を用いて、水分、乳酸菌、糖類を添加して検討するとともに、嗜好性についても検討した。

II 材料及び方法

試験 I ワイン粕サイレージ化試験

ワイン粕は、県内のワイナリー工場から 2015 年 10 月上旬に排出されたものを用いた。

乳酸菌はラクトバシラス・プランタム（以下 ANP7-1）を、糖類は D-グルコースを用いた。

ワイン粕サイレージの発酵品質は、1 袋当たり 150

g のワイン粕を水分 65% に調整、ワイン粕原物重に対して ANP7-1 を 0.001%、グルコースを 0.2%、それぞれ添加し、フィルム袋内で混合したものを試験区 1 とした。その他の試験区分は、水分、ANP7-1、グルコースの調整を表-1 のとおり組み合わせて合計 8 区を設置した。それぞれの資材を混合後、直ちに家庭用卓上密封包装機によって脱気密封した。各試験区 5 反復し、貯蔵期間は約 8 週間、空調のない室内で遮光して保存した。

ワイン粕サイレージは粗飼料の品質ガイドブック（自給飼料品質評価研究会 2009）に基づき抽出した液で、pH 測定後、液体クロマトグラフィーでアンモニア態窒素、有機酸を測定するとともに、その他一般成分分析を行った。ワイン粕サイレージのポリフェノール量の測定は石川県工業試験場化学食品部食品加工技術研究室に依頼した（手法は第 1 報と同法）。

表-1 試験区分

試験区	1	2	3	4	5	6	7	8
水分調整	+	+	+	+	-	-	-	-
グルコース	+	+	-	-	+	+	-	-
ANP7-1	+	-	+	-	+	-	+	-

試験 II ワイン粕サイレージ嗜好性の確認

嗜好性試験には、大型ポリ袋で 25kg ずつ試験 1 区（水

分+, グルコース+, 乳酸菌 ANP7-1+) と7区(水分-, グルコース-, 乳酸菌 ANP7-1+) のサイレージを調製し, ホルスタイン経産牛4頭を用い, 自家産混播グラスサイレージと試験1区試験7区のワイン粕サイレージの3種類の中から, 1回に2種類2kgずつ朝, 昼, 夕の1日3回, 3日間繰り返し給与し(表-2), 喰いつきと採食量を比較した。(図-1)

表-2 嗜好試験

給与区分	朝	昼	夕
1日目	GS×W1	W7×GS	W1×W7
2日目	W1×W7	GS×W1	W7×GS
3日目	W7×GS	W1×W7	GS×W1

GS:自家産グラスサイレージ

W1:ワイン粕サイレージ(水分+, グルコース+, ANP7-1+)

W7:ワイン粕サイレージ(水分-, グルコース-, ANP7-1+)

III 結果および考察

サイレージ化によって, ポリフェノール量は減った(図-2)が, プルーン, ぶどう等を含む32種類の果実(木村ら2008)の含有率に比較して十分高く, これは, 果皮にポリフェノールの大部分が残存していることで説明できる。

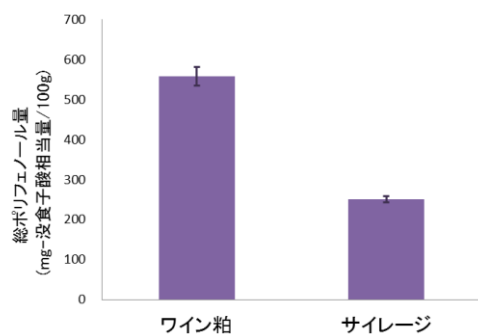


図-2 ワイン粕サイレージの総ポリフェノール量

試験区間に, 一般成分の差はなかった。(表-3)

ワイン粕のpHは3.7と低く, 乳酸菌 ANP7-1, グルコースあるいは水の添加によりサイレージ化を試みたが, 品質向上には至らなかった。むしろ, 水分調整することでpHが上昇し, 酢酸の増加(酢酸菌活性化)を促した。(表-4)。



試験区1: Mo+ ANP7-1+ Glu+ 試験区7: Mo- ANP7-1+ Glu-

図-1 嗜好性試験で給与したワイン粕サイレージ

有機酸については, 添加物の相互作用はあった(表-5)が, 効果は明らかにはならず, 無添加区と差異がないことから, 試験に用いられた水分含量であればワイン粕は添加物を使用する必要はなく, 脱気し嫌気状態を保つことで十分な貯蔵性が確保できることが示唆された。

嗜好性試験の結果では, 喰いつきは4頭とも, グラスサイレージ, 試験1区, 7区の順であったが, グラスサイレージを採食しながらワイン粕サイレージを食べるなどし, 採食性は, いずれも残しはなく, 嗜好性に問題はないと思われた。しかし, 試みに未經産牛を含む畜産試験場繋養牛に給与したところ, 個体差が大きく, 経産牛では嗜好性が高く, 未經産牛では嗜好性が低い傾向にあった。しかし, 徐々に馴らすことでいずれも喰いつきは良くなり, 給与に関しては問題がないと考えられた。

阿部(2000)は副産物の飼料利用における課題として, 1) 輸送及び貯蔵, ハンドリング性の改善, 2) 質と量の安定供給, 3) 飼料化コストの低減を挙げている。石川県内には, 2018年現在ワイナリーは1か所のみで, ワイン粕は年間4tと少ないが, 販売が好調であることから生産量拡大の予定であること, 県内に新たなワイナリー建設計画があること, ぶどうを使用したワインだけでなく奥能登地域を主産地とするブルーベリーを原材料とするブルーベリーワインや, 加賀茶の茶殻等の利用も効果的であることから, こうした食品製造副産物の活用は期待できる。

水分とpH調整による安定した保存方法については検討の必要がある。赤ワイン粕は圧縮されているため, 大きな塊となっていることから吸水性が悪く, 水分を添加しても, 全体にいきわたることがないことから, 副資材(ビートパルプ, ふすま等)の利用も考慮しなくてはならないと考える。

また, ワイン粕サイレージには3~6%のアルコールが残存しているとされているが, 保存中に揮発してしまうと考えられる。今後は, サレージ化によるアルコール残存量の変化, また, 搾乳牛に給与した場合の乳質への影響, 妊娠牛に給与した場合の胎仔への影響等の調査が必要であると考えられる。

V 謝辞

ワイン粕サイレージ等のポリフェノール含有量測定をしていただいた石川県工業試験場化学食品部食品加工技術研究室, 辻篤史主任技師に深謝するとともに, 成分分析をしていただいた畜産試験場北出真弓囑託に謝意を表します。

表-3 一般成分

試験区分	1	2	3	4	5	6	7	8
DM	40.17	39.44	40.14	36.23	51.96	51.87	50.92	52.15
CP	9.83	10.98	10.96	11.35	10.00	10.05	9.94	9.80
EE	6.05	6.83	7.36	6.96	6.04	5.69	6.01	6.67
CF	35.13	34.95	38.77	34.25	35.41	32.24	32.27	30.80
乾物中 % ASH	7.54	7.10	7.45	8.30	7.50	7.94	7.60	7.85
Ca	0.61	0.65	0.65	0.68	0.60	0.63	0.62	0.64
P	0.24	0.24	0.27	0.26	0.24	0.23	0.22	0.24
Mg	0.12	0.13	0.14	0.14	0.13	0.12	0.11	0.13

表-4 発酵品質

試験区	1	2	3	4	5	6	7	8
pH	3.83	4.18	4.69	4.51	3.69	3.62	3.62	3.65
アンモニア態窒素 (mg/100g)	4.18	5.13	1.67	5.50	2.52	7.07	4.96	6.46
有機酸(%)								
乳酸	0.13	0.16	0.32	0.27	ND	0.01	0.03	0.01
酢酸	1.57	0.91	1.18	1.42	0.01	0.05	0.08	0.05
プロピオン酸	0.00	ND	ND	ND	0.00	0.00	ND	ND
イソ酪酸	ND	0.00	0.00	ND	ND	0.00	0.00	0.00
酪酸	ND	ND	0.00	ND	ND	ND	ND	ND
イソ吉草酸	ND	ND	0.00	ND	ND	ND	0.00	0.00
吉草酸	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.00	ND

表-5 添加物の相互作用

	ANP	Gul	Mois	ANP × Glu	ANP × Mois	Glu × Mois	ANP × Glu × Mois
pH	NS	**	***	NS	NS	**	NS
アンモニア態窒素 (mg/100g)	***	NS	*	NS	NS	NS	**
有機酸(%)							
乳酸	NS	***	***	NS	NS	**	NS
酢酸	NS	NS	***	*	NS	NS	*
プロピオン酸	**	**	***	NS	**	**	NS
イソ酪酸	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
酪酸	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
イソ吉草酸	*	NS	**	NS	*	NS	NS
吉草酸	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

*, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$, NS; $P > 0.05$

VI 引用文献

阿部亮. 2000. 飼料利用の形態と課題. 未利用有機物資源の飼料利用ハンドブック. サイエンスフォーラム, 65-66

木村英生・長沼孝多・小嶋匡人・小松正和・恩田 匠・辻政雄. 2008. 山梨県産果実の総ポリフェノール含量

とその DPPH ラジカル消去活性. 山梨県工業技術センター研究報告. 22 : 59-63

自給飼料品質評価研究会編, 三訂版. 2009. 粗飼料の品質評価ガイドブック. 日本草地畜産種子協会. 東京

黒毛和種における胚生産能力予測技術および 卵巣機能改善技術の検討

北元香菜子、内尾陽子、林みち子、堀 登

Examinations of Improvement methods for Ovarian function and prediction method for Embryo
production capacity in Japanese Black Cattle

Kanako Kitamoto, Youko Uchio, Michiko Hayashi, Noboru Hori

キーワード：AMH、卵巣機能評価、卵巣機能改善、黒毛和種

要 約

牛胚移植は付加価値の高い子牛の効率的な生産に欠かせない技術となっているが、供胚牛の過剰排卵処理に対する卵巣の反応性には個体差があり、採卵数に大きく影響を及ぼす。そのため胚を効率的に生産するためには供胚牛の卵巣の反応性を事前に評価し、さらに高品質な胚を数多く得ることが重要である。また、若齢期に評価することで繁殖性に優れた個体の早期選抜も可能となる。

そこで近年、卵胞数の指標として有用であると報告されている抗ミュラー管ホルモン（AMH）が、(1)胚生産能力の高い供胚牛の育成段階での早期選抜の指標、(2)現有供胚牛の採胚実施の可否の指標となるか検討するとともに、(3)採胚成績の向上を目的に補助飼料給与による卵巣機能改善効果について検討した。

その結果、AMH 値と採胚成績との間に相関がみられたことから、AMH 値は、(1)育成段階での供胚牛の選抜指標として、(2)現供胚牛の採胚回数の適正化の指標として活用できる可能性が示唆された。また、(3)補助飼料給与により供給可能胚率の低下を抑えることができたことから、補助飼料は卵質の維持に効果があると考えられ、卵巣機能改善方法として有効であると示唆された。

I 緒 論

牛における胚移植は育種改良への効果が大きく、付加価値の高い子牛の効率的な生産に欠かせない技術となっている。しかし、供胚牛の過剰排卵処理に対する卵巣の反応性、採胚成績には個体差があり、安定して胚を生産できない問題がある。そのため胚を効率的に生産するためには供胚牛の卵巣の反応性を事前に評価する必要がある。また、若齢期に評価することができれば、繁殖性に優れた個体の早期選抜が可能となり、より効率的に生産を行うことができる。

近年、卵巣内の発育卵胞の顆粒膜細胞から分泌される抗ミュラー管ホルモン（AMH）が卵胞数の指標として有用であることが報告されている¹⁻³⁾。河合らもこ

れまでに、体内胚の生産において、供胚牛の採胚前の血中 AMH 濃度（AMH 値）が過剰排卵処置後の推定黄体数や回収胚数、正常胚数を反映しており、供胚牛の卵巣の反応性の指標となり得ることを報告した⁴⁾。血中 AMH 濃度は発情周期中にほとんど変化しないため⁵⁾、他の性ホルモンに比べバイオマーカーとして優れている。

また、供胚牛は採胚回数を重ねるごとに胚の数や質が悪くなる傾向にあり、胚移植による子牛生産効率向上には高品質の胚を多数得ることが重要である。

肝臓に障害のある牛では卵巣内の卵の品質が低いと報告されている⁶⁾。肝臓から分泌されるインスリン様成長因子（IGF-1）は卵胞の発育に重要な因子のひとつ

であり、肝障害により分泌量が低下すると正常な卵巣周期が阻害され、繁殖障害の原因になることから⁷⁾、胚の高品質化には肝機能の改善が必要である。また、飼養環境からのストレスにより発生する活性酸素が初期胚の発生を阻害しているといわれている。高橋らは高温時のストレスにより細胞内活性酸素が蓄積され初期胚の発生が低下し、同時に卵管子宮内環境が悪化することを明らかにしている⁸⁾。

今回、AMH が胚生産能力の高い供胚牛の早期選抜の指標、現有供胚牛の採胚実施の可否の指標となるか検討するとともに、補助飼料給与による卵巣機能改善効果についても検討した。

II 材料および方法

1. 供試牛

供胚牛として当場で飼養している黒毛和種を供試した。

2. 試験内容

試験 1. AMH 値による供胚牛選抜の検討

育成牛 11 頭について、3、8、12 ヶ月齢の AMH 値と初産後初回採胚時の採胚成績との関連性を調査した。月齢設定は当場の飼養形態に合わせて行った。当場では育成牛譲渡を 8~10 ヶ月齢で行っているため、譲渡前に供胚牛選抜ができるよう 3 ヶ月齢と 8 ヶ月齢で設定した。また、12 ヶ月齢は通常の性成熟期として参考に設定した。

試験 2. AMH 値による個体の胚生産能力に応じた採胚回数の検討

供卵牛 10 頭（平均年齢 6.2±3.0 歳、平均産次 3.4±1.7 産）について、分娩 3 ヶ月後から 3 ヶ月間隔で 3 回採卵を行い、採胚 1 ヶ月前、過剰排卵処置 (SOV) 前、採胚日の AMH 値と同周期採胚成績との関連性を調査した。同様に、採胚日の AMH 値と次周期採胚成績との関連性を調査した。

試験 3. 卵巣機能改善方法の検討

供胚牛 33 頭について、2 および 3 回目の採胚約 1 ヶ月前から補助飼料として①*Rhizopus oryzae* 水抽出物

含有飼料 (11 頭、平均年齢 9.1±2.8 歳、平均産次 4.8±1.6 産)、②*Rhizopus oryzae* 水抽出物含有飼料と不飽和脂肪酸含有飼料 (5 頭、平均年齢 5.8±1.9 歳、平均産次 3.0±0.9 産)、③アスタキサンチン含有飼料 (3 頭、平均年齢 12.3±3.8 歳、平均産次 7.0±2.0 産) を給与し、対照区 (14 頭、平均年齢 7.2±3.6 歳、平均産次 3.9±2.0 産) と給与区の採胚成績を比較した。①*Rhizopus oryzae* 水抽出物含有飼料は採胚予定日 30 日前から採胚日まで 20g/日 (含有量 100g/kg) で給与、②*Rhizopus oryzae* 水抽出物含有飼料は発情予定日 9 日前から発情日まで 10g/日、不飽和脂肪酸含有飼料は発情予定日 14 日前から発情日まで 50g/日 (リノール酸含有量 54.7g/kg、リノレン酸含有量 123.5g/kg) で給与、③アスタキサンチン含有飼料は採胚予定日 40 日前から採胚日まで 50g/日 (含有量 720mg/kg) で給与した。

3. 体内胚の採胚方法

臍内留置型プロジェステロン製剤 (P) を留置し、エストラジオール (E2) による卵泡波初期化後、卵泡刺激ホルモン (FSH)、プロスタグランジン (PG) 投与および P の抜去、性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) 投与による SOV を行い、人工授精後に子宮内灌流法により、発情後 7 日目に採胚を実施した。

4. AMH 値の測定

EDTA 真空採血管により頸静脈より血液を採取し、遠心分離 (3,000rpm、30 分間、4°C) を行い血漿を分離した。血漿は AMH 値の測定まで -25°C で保存した。保存血漿は室温で融解後、Bovine AMH ELISA kit (Ansh Labs) を用いて AMH 値を測定した。

5. 調査項目

採胚成績として採胚実施時の反応数 (卵泡数+黄体数)、採卵数、供給可能胚数、および供給可能胚率 (供給可能胚数/採卵数×100) を調査した。供給可能胚は採胚時に家畜人工授精講習会テキスト (平成 8 年 3 月改訂版) に沿ってランク付けし、B ランク以上のものとした。

6. 統計処理

得られたデータについて、採胚成績とAMH値の相関関係を調査した。また、比率の比較は、 χ^2 検定により有意差検定を行い、危険率5%未満を有意差ありとした。

III 結果

1. 試験1

3、12ヶ月齢のAMH値と採胚成績の相関は低い、もしくは見られなかった。8ヶ月齢のAMH値と反応数、採卵数との間には有意な正の相関がみられ（それぞれ

$r=0.66$ 、 $r=0.64$ 、 $p<0.05$ 、図1)、供給可能胚数との間には相関傾向がみられた（ $r=0.60$ 、 $p=0.05$ 、図1）。

2. 試験2

採胚1ヵ月前、SOV前、採胚日のAMH値と同周期採胚成績に有意な正の相関がみられた。中でも、SOV前のAMH値と反応数、採卵数、供給可能胚数との間には有意な正の相関がみられた（それぞれ $r=0.64$ 、 $r=0.72$ 、 $r=0.56$ 、 $p<0.01$ 、図2）。また、採胚日のAMH値と次回採胚での反応数、採卵数との間にも有意な正の相関がみられた（それぞれ $r=0.65$ 、 $r=0.75$ 、 $p<0.01$ 、図3）。

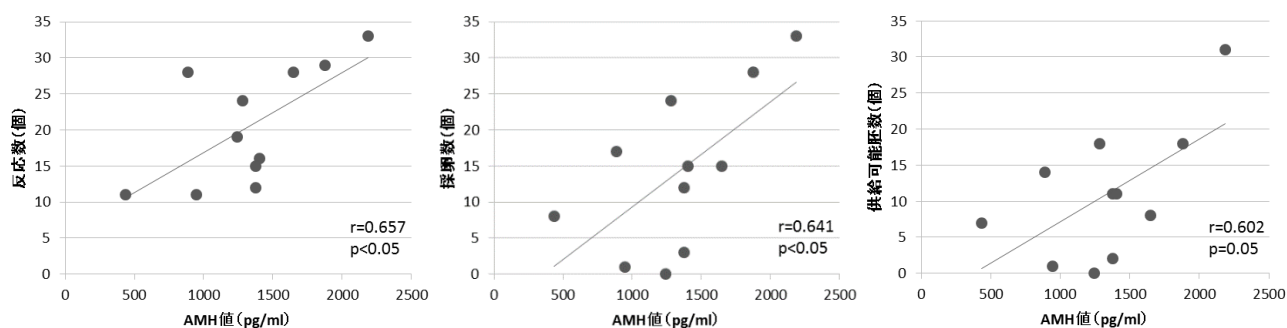


図1. 8ヶ月齢育成牛のAMH値と採胚成績

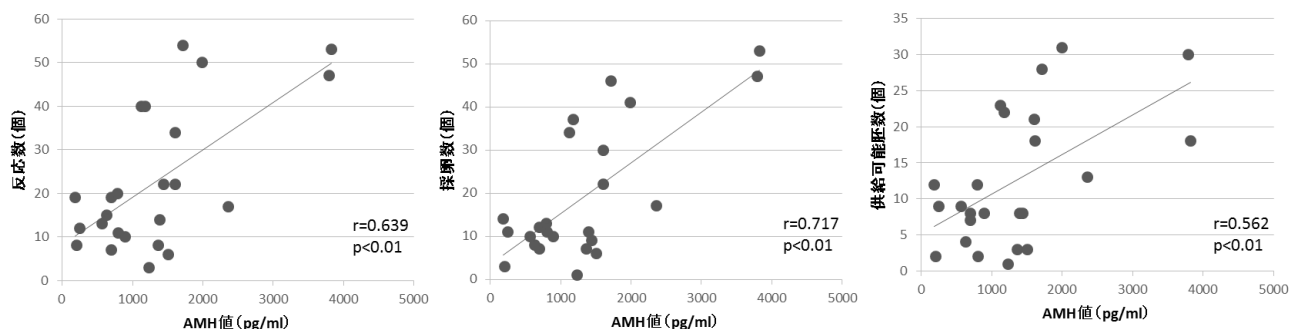


図2. SOV前のAMH値と同周期採胚成績

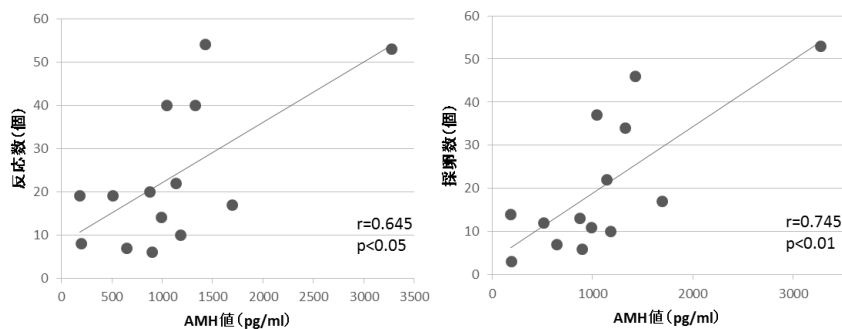


図3. 採胚日のAMH値と次回採胚成績

3. 試験3

対照区、給与区ともに採胚回数を重ねるごとに反応数、採卵数、供給可能胚数が減少した。対照区では採胚3回目に供給可能胚率が有意に低下したが、補助飼料給与区では採胚3回を通じて低下しなかった(図4、5、6)

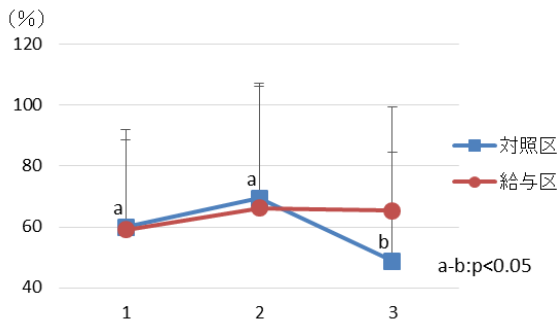


図4. 採胚回数と供給可能胚率
—*Rhizopus oryzae* 水抽出物給与—

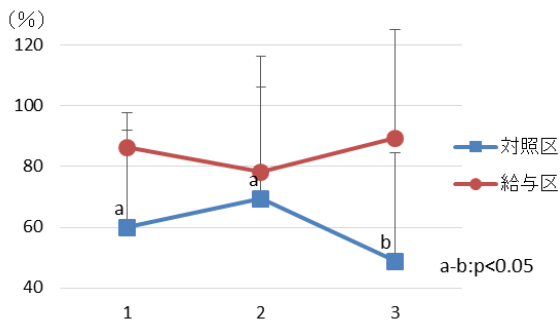


図5. 採胚回数と供給可能胚率
—*Rhizopus oryzae* 水抽出物と不飽和脂肪酸給与—

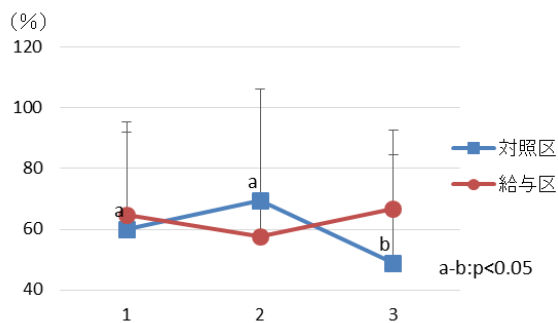


図6. 採胚回数と供給可能胚率
—アスタキサンチン給与—

IV まとめおよび考察

育成牛譲渡前である8ヶ月齢のAMH値と採胚成績に相関があることから、AMH値は育成段階での供卵牛の選抜指標として活用できる可能性が示唆された。しかし、育成牛のAMH値は生後13週齢に最高濃度となり、その後低下することや⁹⁾、春機発動が早期にみられる牛は晩期にみられる牛に比べ出生時から24週までのAMH値が高く推移する¹⁰⁾など、成長に伴う変動が大きく、値の安定する10ヶ月齢以降に測定すべきという報告もあるため¹¹⁾、さらなる月齢の検討が必要である。

また、採胚前のAMH値と採胚成績に相関があることから、採胚を実施するか否かの判断に利用でき、採胚回数の適正化の指標としても活用できると考えられる。これは、黒毛和種において血液中のAMHレベルが過剰排卵処置の反応性や体内胚の作出量を予測するバイオマーカーとして用いられている¹²⁾とする報告と同様である。

補助飼料給与により反応数、採卵数、供給可能胚数の減少を抑えることはできなかったが、供給可能胚率の低下を抑えることができたことから、補助飼料は胚質の維持に効果があると考えられ、卵巢機能改善方法として有効であると示唆された。*Rhizopus oryzae* 水抽出物は肝障害モデルラットで肝再生を促進し、分娩直後の乳牛における肝機能改善効果が認められており^{13,14)}、本研究でも肝機能改善によりIGF-1分泌が促進され、その結果繁殖成績向上に繋がったと考えられる。

アスタキサンチンは活性酸素を抑制する抗酸化力が強く、細胞膜保護作用があるため、SOV時のストレスによって生ずる血中抗酸化能の低下を防ぎ、活性酸素による卵巢での卵の生産阻害や受精卵への直接的な障害の低減、卵管子宮内環境の劣化を防止することで卵質の向上が見られた¹⁵⁾とする報告と同様の結果が得られた。

不飽和脂肪酸は卵母細胞や胚の質の改善に効果があるとされており、本研究でも質の改善効果がみられたが、採卵数、移植可能胚数増加の効果がある^{16,17)}とした報告とは異なった。また、不飽和脂肪酸は給与期間によっては採卵数、胚質に悪影響を与える¹⁸⁾との報告

もあるため、今後適切な給与期間を検討する必要がある。

V 謝辞

本研究の実施にあたり、*Rhizopus oryzae* 水抽出物を提供いただいた牛越生理学研究所、アスタキサンチンを提供いただいたあすかアニマルヘルス株式会社、*Rhizopus oryzae* 水抽出物給与試験にご助言いただいた麻布大学の鈴木武人准教授に深謝いたします。

VI 引用文献

- 1) Ireland JL, et al. (2008), Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle, *Biol Reprod* 79(6), 1219-1225
- 2) Rico C, et al. (2009), Anti-Mullerian hormone is an endocrine marker of ovarian gonadotropin-responsive follicles and can help to predict superovulatory responses in the cow, *Biol Reprod*. 80(1), 50-59
- 3) Rico C, et al. (2012), Determination of anti-mullerian hormone concentrations in blood as a tool to select Holstein donor cows for embryo production: from the laboratory to farm, *Reprod Fertil Dev*. 24(7), 932-944
- 4) 河合愛美ら (2013)、黒毛和種供卵牛の血中抗ミュラー管ホルモン濃度と採卵成績との関係、北信越畜産学会報第 107 号, 17
- 5) El-Sheikh Ali H, et al. (2013), Plasma anti-Mullerian hormone as a biomarker for bovine bovine granulosa-theca cell tumors: comparison with immunoreactive inhibin and ovarian steroid concentrations, *Theriogenology*, 80, 940-949
- 6) 田中裕志ら (2009)、ウシ肝臓の状態と卵子形成および卵子の発育能力について、*日本胚移植学雑誌*, 31, 61
- 7) Kawashima. C, et al. (2007), Relationship between metabolic hormones and ovulation of dominant follicle during the first follicular wave post-partum in high-producing dairy cows, *Reproduction*, 133, 155-163
- 8) 高橋昌志ら (2007)、暑熱・酸化ストレス-牛妊娠初期胚への影響一、*臨床獣医*, 25(4), 19-23
- 9) El-Sheikh, et al. (2017), Plasma anti-Mullerian hormone profile in heifers from birth through puberty and relationship with puberty onset, *Biol Reprod*, 97, 153-161
- 10) 北原豪ら (2016)、抗ミュラー管ホルモンを用いた新しい繁殖管理技術の開発、*科学研究費助成事業研究成果報告書*, <https://kaken.nii.ac.jp/file/KAKENHI-PROJECT-25850209/25850209seika.pdf> [2018 年 8 月 1 日参照]
- 11) 平山博樹ら (2016)、黒毛和種育成雌牛における血漿抗ミュラー管ホルモン濃度推移、第 108 回日本繁殖生物学会大会
- 12) Nabenishi H, et al. (2017), Relationship between plasma anti-Mullerian hormone concentrations during the rearing period and subsequent embryo productivity in Japanese black cattle, *Dom Anim Endocrinol*, 60, 19-24
- 13) 北田菜津美 (2013)、*Rhizopusoryzae* 水抽出物投与によるウシ血中 IGF-1 および性ホルモン濃度の変化が繁殖成績に与える影響、第 155 回日本獣医学会学術集会
- 14) Suzuki. T, et al. (2015), Protective effect of aqueous extracts from *Rhizopus oryzae* on liver injury induced by carbon tetrachloride in rats, *AnimSci J*, 86, 532-540
- 15) 向野逸郎ら (2009)、アスタキサンチン混合飼料給与が黒毛和種供卵牛の採卵成績におよぼす影響、*石川県畜産総合センター研究報告* 41, 6-8
- 16) 高橋正弘ら (2010)、黒毛和種繁殖牛の過剰排卵反応および採取胚の受胎性におよぼすバイパス不飽和脂肪酸の効果、第 41 回日本家畜臨床学会学術集会
- 17) masahiro TAKAHASHI, et al. (2013), Improvement of Superovulatory Response and Pregnancy Pate after

Transfer of Embryos Recovered from Japanese Black
Cow Fed Rumen Bypass Polyunsaturated Fatty Acids,
J Vet Med Sci, 75, 1485-1490

18)Staigmiller R, et al. (1979), Effect of nutrition
on response to exogenous FSH in beef cattle, J Anim
Sci, 48, 1182-1190

地域の未利用資源を活用した豚ふん堆肥化時に発生するアンモニア 低減技術

上田泰明、金川博行、土屋いづみ

Reduction of ammonia emission from composting of pig by utilizing unused resources

Yasuaki Ueda, Hiroyuki Kanagawa, Idumi Tsuchiya

キーワード：悪臭、脱臭、アンモニア、ロックウール、カキ殻、廃菌床、竹、循環水

要 約

畜産経営ではアンモニア主体の臭気が堆肥化施設等から常時発生しており、養豚経営では特に濃度が高いため、対策を適切に行うことが求められている。

脱臭方法には様々な方法があるが、畜産業では微生物の持つ特性を利用した生物脱臭が有効であるとされている。しかし、生物脱臭装置は、脱臭資材として一般的に利用されている「ロックウール」が非常に高価であること、脱臭資材には散水に伴う排水処理が必要であることから、導入が進んでいない。

そこで、ロックウールに代わる資材として、県内に豊富にある未利用資源「椎茸廃菌床」「カキ殻」「竹」を選定し、資材の性状、アンモニア除去能力について検討した。なお、資材への散水については循環利用することとし、循環水の性状変化及び液肥利用の可能性について検討した。

結果、アンモニア除去能力については、いずれの資材も 8 割以上の除去率を達成し、ロックウールと同程度の高い脱臭効果が得られた。また、循環水の性状については、いずれの資材も硝酸亜硝酸態窒素濃度が徐々に高まる結果となり、アンモニア酸化細菌によりアンモニアが硝化され、生物脱臭機能が働いていることがうかがえた。その無機態窒素が蓄積される循環水の有効活用について、コマツナを用いた幼植物試験を行ったところ、発芽率及び初期生育は市販液肥と遜色ない結果となり、窒素肥料として有効であることが示された。

I 緒 論

畜産経営では、畜舎や堆肥化施設等から常に臭気が発生しており、特に堆肥化施設においては糞の発酵過程で大量のアンモニアが発生する。中でも養豚経営はアンモニア濃度が特に高く、適切な対策を行わないと敷地外に臭気が漏れ、地域住民からの苦情に繋がる。

農林水産省によると、平成 29 年における畜産経営に起因する苦情発生戸数は 1,559 戸で、起因する苦情のうち、悪臭関連が過半数を占めており¹⁾、対策

は必須である。

県内の養豚経営の堆肥化処理施設には、脱臭装置が設置されているものもあるが、いずれも木材チップ等を脱臭資材とし、資材に臭気を取り込ませる吸着法である。吸着法の場合、資材の吸着能力が飽和すると脱臭機能が低下するため、定期的に資材を交換する必要がある。しかし、交換にあたっては多額の費用を要することから、交換せずを使い続け、脱臭機能が十分に働いていない事例も見られる。

脱臭方法には様々な仕組みがあるが、養豚経営のようにアンモニアを主体とした臭気が常時発生するような条件下では、断続的に脱臭する必要があるため、脱臭装置の運用コストをいかに低く抑えるかが重要であり、日々の散水だけで脱臭効果が長期間持続する生物脱臭法が、一般的に有効であるとされている。生物脱臭法とは、臭気を脱臭資材に通気させ、脱臭資材中の微生物が臭気成分を分解する仕組みであり、微生物の活性を維持すれば脱臭効果は持続する。アンモニアを分解する細菌としては、アンモニア酸化細菌等が知られており、これらの菌は、自然界に普遍的に存在する。畜産では1967年に農業機械化研究所が土壌を使った仕組み²⁾を検討して以降、研究が進んでいる。

現在、生物脱臭装置に用いる脱臭資材には、土壌よりも設置面積が少なく済むロックウールが一般的に適しているとされているが、同資材は5.5万円/m³と非常に高価であること、微生物の活性維持のための循環水の処理が必要であることから、一部の大規模経営を除き導入が進んでいない。

そこで、本試験では、ロックウールに代わる低コスト脱臭資材、具体的には県内に豊富にある未利用資源の脱臭能力について検討するとともに、脱臭過程で発生する循環水を液肥として利用できないか検討した。

II 材料および方法

1 試験期間

1回目（循環水量：10L）

平成29年7月12日～8月31日（51日間）

2回目（循環水量：20L）

平成29年9月6日～12月28日（113日間）

1回目の試験では循環水量を10Lとしたが、蒸発により水量が減少し、51日目で試験を終了した。その後、脱臭資材を入れ替えることなく、循環水を20Lとし、2回目の試験を実施した。

2 供試材料

ロックウールに代わる脱臭資材として、椎茸廃菌床、カキ殻及び竹（2～3cmのチップ状のもの）を使用した。（図1）



図1 各資材（左上：ロックウール、右上：廃菌床、左下：カキ殻、右下：竹チップ）

3 試験内容

1) ロックウールに代わる低コスト資材について

新鮮豚ふん 3,500g にオガ粉を混合して水分62%に調整したものを小型堆肥化試験装置に充填し、発生する臭気を送風機により脱臭槽に送り込むようにした。（図2）

供試する豚ふんについては、実際の畜産現場における一般的な堆肥化処理に則して、週に1回切り返しを行った。堆肥舎を利用した堆肥化処理の場合、堆肥の完成までに3～4か月程度要するが、発酵が進むにつれアンモニア発生量が減少することから、本試験では、アンモニア発生量を維持するために、3～4週間毎に新鮮豚ふんに入れ替えた。

脱臭槽については、10Lのポリ容器に脱臭資材を8L充填した。脱臭槽内にアンモニア酸化細菌を取り入れるため、試験開始前に、槽内に豚ふん堆肥30gと2%硝酸アンモニウム溶液を投入し、2日間の馴養期間を設けた。試験開始後も細菌の活性を維持するため、循環水槽に水道水を入れ、タイマー制御したポンプにより、2時間毎に30秒間、脱臭槽に散水した。

なお、循環水量については、1回目の試験開始時（平成29年7月12日）には10Lとし、2回目の試験開始時（平成29年9月6日）には20Lとし、試験

期間中、補充は行わないこととした。

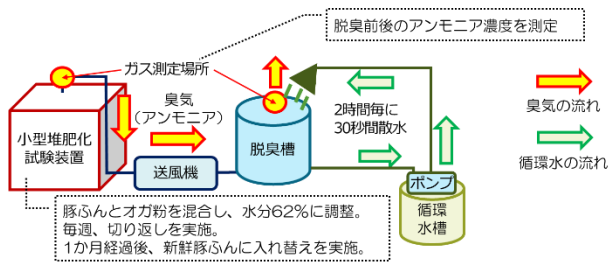


図2 試験装置の概要

(1) 脱臭槽通過前後のアンモニアの測定

脱臭槽通過前、通過後のアンモニア濃度を検知管 (GV-100S、(株) ガステック) により測定し、除去率を求めた。

(2) 循環水の性状、無機態窒素濃度の測定

循環水の pH、EC 及び無機態窒素 (アンモニア態窒素 (NH₄-N) 及び硝酸亜硝酸態窒素 (NO_x-N)) 濃度を測定し、経時的変化について調査した。

(3) 脱臭資材の性状調査

脱臭資材の供試前後のかさ比重及び空隙率、試験期間中の pH について調査した。

2) 循環水の利用方法について

液肥としての利用可能性を調査するため、(独) 農林水産消費安全技術センター「植物に対する害に関する栽培試験の方法・解説 (2017)」³⁾ に基づくコマツナ幼植物を用いた植害試験を実施した。

試験区として脱臭資材にカキ殻の循環水を施用した循環水施用区、対照区として市販の有機質液肥 (有機 100%液肥 (N : 3 - P₂O₅ : 3 - K₂O : 2)) を施用した市販液肥施用区、そして化成肥料区 (標準区) を設けた。循環水施用区及び市販液肥施用区については、標準量施用区、2 倍区、3 倍区及び 4 倍区を設け、各試験区の施肥量は表 1 の通りとし、それぞれ 2 反復行った。

平成 30 年 5 月 10 日に播種後 3 週間育成し、発芽率、葉柄長及び試験終了時の地上部重量について調査した。

表 1 各区の施肥量

		土壌中の肥料成分量 (mg/ポット)			
		液肥による供給分		化成肥料による供給分	
		N		N	P2O5 K2O
循環水施用区	標準量施用区	100		25	25 25
	2倍区	200		25	25 25
	3倍区	300		25	25 25
	4倍区	400		25	25 25
市販液肥施用区	標準量施用区	100		25	25 25
	2倍区	200		25	25 25
	3倍区	300		25	25 25
	4倍区	400		25	25 25
標準区			25	25 25	

III 結果

1 ロックウールに代わる低コスト資材の検討

1) アンモニアの除去率

いずれの資材もほとんどの期間において 8 割以上のアンモニアを除去する結果となった。なお、1 回目 (循環水 10L) のカキ殻の後半のみ 62% と他と比べて低い値となった。

表 2 アンモニア除去率 (%)

脱臭資材	1回目 (7/12~8/31)		2回目 (9/6~12/28)	
	1~28日目	29~51日目	1~57日目	58~113日目
ロックウール	98	83	93	87
椎茸廃菌床	100	80	98	90
カキ殻	97	62	97	88
竹チップ	99	86	95	84

2) 循環水の性状 (2 回目 : 9 月 6 日 ~ 12 月 28 日)

循環水中に含まれる NH₄-N 及び NO_x-N の濃度は、いずれも日数の経過とともに徐々に上昇した。

NH₄-N 濃度については、ロックウールの循環水が最も高く 2,380mg/L となった。椎茸廃菌床は 1,278mg/L、竹チップは 630mg/L、カキ殻は 543mg/L が最高値であった。

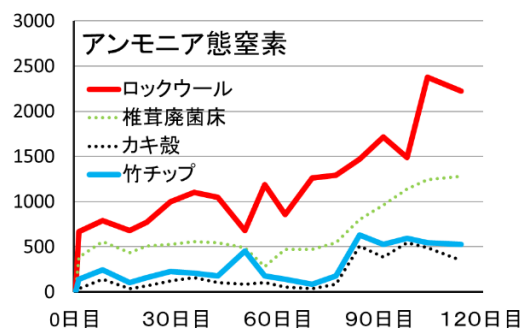


図3 循環水中の NH₄-N 濃度の推移

(mg/L)

NO_x-N 濃度については、カキ殻の循環水が最も高く 2,958mg/L となった。ロックウールは 2,503mg/L、

椎茸廃菌床は 1,715mg/L、竹チップは 700mg/L が最高値であった。

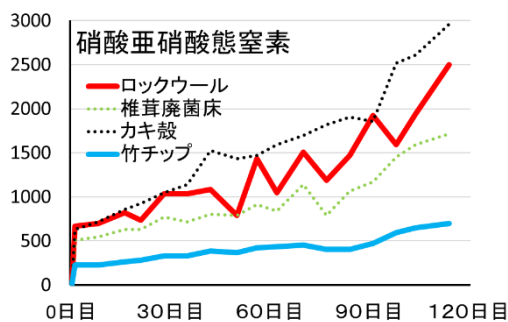


図4 循環水中のNO_x-N濃度の推移 (mg/L)

pHについては、いずれの資材も5~9の間で推移した。ECについては、いずれの資材も徐々に増加する結果となったが、竹チップの循環水については、他と比べて上昇が緩やかで、120日目でも7.2mS/cmに留まった。

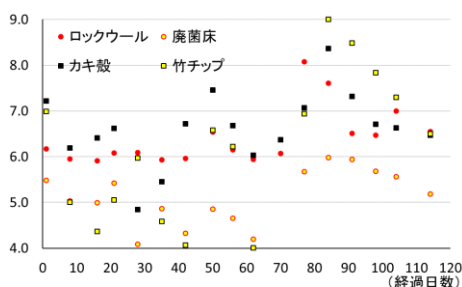


図5 循環水のpHの推移

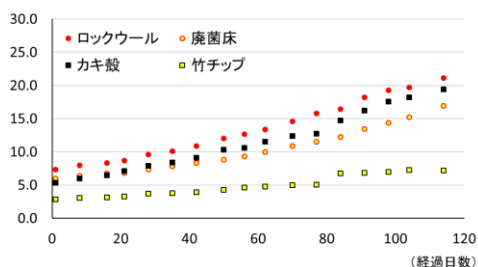


図6 循環水のECの推移 (mS/cm)

3) 試験開始前の資材の性状

各資材の試験前後の性状は、表2のとおりであった。カキ殻及び竹チップについては、かさ比重、空隙率ともに大きな変化はみられなかったが、ロックウール及び椎茸廃菌床については、試験後、かさ比重が増加し、空隙率が減少した。

表2 かさ比重と空隙率 (試験開始前)

	かさ比重※1		空隙率※2	
	試験前	試験後	試験前	試験後
ロックウール	0.14	0.51	82	46
椎茸廃菌床	0.17	0.57	66	44
カキ殻	0.42	0.53	71	67
竹チップ	0.42	0.42	62	59

※1 1000ml のメスシリンダーに資材を充填して重量を測定

※2 1000ml のメスシリンダーに資材を充填し、1000ml まで加えた水量を測定

pHについては、竹チップが最も高く7程度、その他の資材は4~5程度でほぼ横ばいで推移する結果となった。

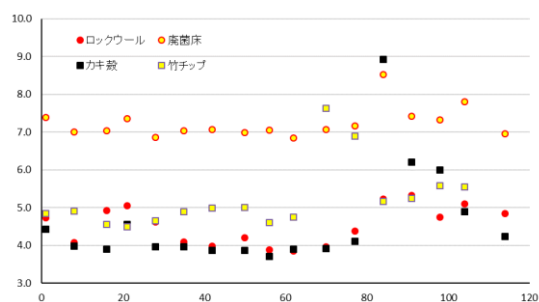


図7 脱臭資材のpH

2 循環水の利用方法の検討

循環水については、今回、ロックウールを除く資材のうち2回目試験終了時に窒素含量が最も多かったカキ殻のものを利用した。

発芽率については、コマツナ播種後2日目で半数以上が発芽し、21日目の試験終了時には循環水施用区、市販液肥施用区ともに9割以上が発芽する結果となった。

葉柄長と収穫後の生体重については、播種後21日目に測定し、いずれも、市販液肥施用区よりも循環水施用区の方が高い値となった。なお、葉柄長については、施用量との関連性は確認できなかったが、生体重については、3倍区までは施用量が多いほど高くなり、4倍区は3倍区よりも若干低い結果となった。なお、葉や茎の変色や枯死といった異常は確認されなかった。

表3 循環水の肥料成分（市販液肥との比較）

脱臭資材	全窒素		無機態窒素		ミネラル		
	(%)	NH ₄ -N (%)	NO _x -N (%)	CaO (%)	MgO (%)	K ₂ O (%)	P ₂ O ₅ (%)
循環水	0.35	0.05	0.32	0.35	0.02	0.01	0.00
市販液肥	0.30	0.02	0.00	0.00	0.03	0.31	0.36

表4 発芽率

	標準量施用区	2倍区	3倍区	4倍区
標準区	96	—	—	—
循環水施用区	98	100	96	90
市販液肥施用区	94	90	98	96

表5 試験終了時（播種後21日目）の葉柄長

	標準量施用区	2倍区	3倍区	4倍区
標準区	12.9			
循環水施用区	14.3	15.3	14.5	13.4
市販液肥施用区	12.5	12.6	12.7	12.7

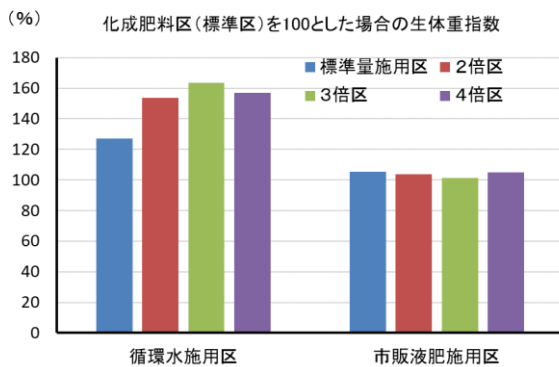


図8 循環水施用区及び市販液肥施用区のコマツナ生体重（化成肥料区との比較）

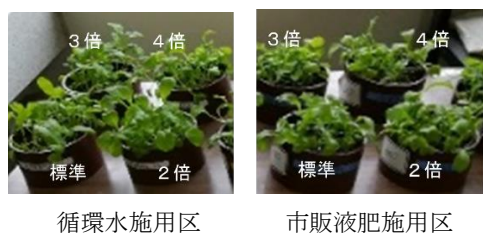


図9 コマツナの生育状況

IV まとめおよび考察

1 ロックウールに代わる低コスト資材の検討

アンモニアの除去率は、循環水を交換せずに113日間稼働してもほとんど低下は見られず、8割以上を維持し、原臭が1,000ppmを超えるような高濃度の場合であっても脱臭後の濃度はほとんどが10ppmを下回る結果が得られた。

循環水の無機態窒素濃度の推移をみてみると、

NO_x-N が徐々に増加しており、脱臭槽内で水溶したアンモニアがNH₄-Nとなった後、アンモニア酸化細菌の働きによって硝化が行われ、生物脱臭の仕組みが正常に機能していることが窺える。

Yasudaら⁵⁾は、ロックウール生物脱臭装置の循環水中の無機態窒素濃度が2%、ECは約85mS/cmまで上昇しても、アンモニアの処理は良好に行われることを報告している。本試験においては、ロックウール循環水の無機態窒素濃度が最も高く推移し、113日間で約4,725mg/L(0.4725%)であった。これ以降も少なくとも半年以上は、循環水の交換をしなくても高い脱臭能力が得られると考えられる。

なお、生物脱臭装置では、硝化が進むことで循環水のpHが徐々に低下し、硝化が阻害されることとなる。本試験における循環水のpHは、大きく増減することはあったが低下し続けることはなく、資材のpHについてもあまり大きな変化は見られなかった。アンモニアの水溶と硝化がバランス良く働いていたと推察される。

また、ロックウール以外の資材については、ロックウールよりも無機態窒素濃度が低く推移していることから、ロックウールよりも長期間に渡って脱臭能力が維持されるものと思われる。特に竹チップについては、無機態窒素濃度が他よりもかなり少なく推移していることから、長期利用が見込まれる。竹粉由来の微生物群には脱窒作用があるとの報告⁵⁾があり、循環水中のNO_x-Nが脱窒により、空气中に窒素ガスとして放散されている可能性がある。

今回の試験では、循環水の無機態窒素濃度が上限に達する前に循環水の量が蒸発により減少してしまい、不足する事態となった。このため、長期間運用する場合には、循環水量を多めにしておくか、運用中に循環水を適宜追加する必要がある。

以上のことから、今回試験を行った椎茸廃菌床、カキ殻及び竹については、いずれも脱臭能力についてはロックウールと遜色なく、代替資材としての利用が期待できる結果となった。

しかし、試験終了時、廃菌床については泥濁化に

より密度が増して空隙率が大きく低下していた。また、竹チップについては軟化しており、今後、各資材の耐久性について、更なる検討が求められる。

2 循環水の利用方法の検討

コマツナ幼植物を利用した植害試験の結果、いずれの区も9割以上が発芽し、循環水施用による悪影響はみられなかった。

発芽後の生育については、化成肥料区と比べて、市販液肥施用区は同等、循環水施用区は上回る結果となった。今回利用した市販液肥は有機質のものであることから、窒素成分が植物体に吸収されるまでに時間を要するため、3週間の試験では、施肥効果が十分に現れなかったものと思われる。一方、循環水の場合、ほとんどが無機態窒素であるため、短期間で施肥効果が現れたものと思われる。

なお、循環水施用区の4倍区の葉柄長及び生体重については、3倍区よりも低い結果となったことについては、過肥により効果が現れなかった可能性があるが、葉や茎に異状がなかったことから、問題はないと思われる。

以上のことから、生物脱臭装置から排出される循環水については、液肥としての利用が可能であることが明らかとなった。循環水中の無機態窒素は脱窒により減少することが考えられるが、関上⁶⁾によると、軽石を利用した生物脱臭装置から発生した循環水の窒素成分は、6か月経過しても全く減少せず、pH及びECの変化もないとのことであり、すぐに圃場散布できない場合であっても、タンク等に充填し、保管しておくことも可能であり、高い利便性が見込まれる。

V 引用文献

- 1) 農林水産省生産局畜産部畜産振興課環境計画班, 畜産経営に起因する苦情発生状況(平成30年2月)
- 2) 農業機械化研究所(1984), 土壌脱臭法の研究と応用
- 3) 農林水産消費安全技術センター, 肥料登録申請手

続き, 植物に対する害に関する栽培試験の方法(抄)
(昭和59年4月18日付け59農蚕第1943号農林水産省農蚕園芸局長通知)

4) Yasuda T. et al. (2013) J. Appl. Microbiol. 114: 746-761

5) 溝添ら(2006), 県内未利用資源を活用した脱窒に関する研究, 宮崎県工業技術センター・宮崎県食品開発センター研究報告No. 51, 3-7

6) 関上直幸(2013), 軽石脱臭槽から得られる「循環水」の肥料としての可能性, 群馬県畜産試験場研究報告No. 20, 51-56