

ISSN 2432-6658 (Print)
ISSN 2432-7867 (Online)

Bulletin of the NARO
Livestock and Grassland Science

農研機構研究報告

畜産研究部門

No.17
March, 2017
(平成29年3月)



農研機構は、みなさまと共に食と農の未来を創ります。

農研機構畜産研究部門編集委員会
Editorial Board

研究部門長
Director-General

島田和宏
Kazuhiro SHIMADA

畜産飼料作研究監
Director of Forage and
Livestock Research

大同久明
Hisaki DAIDO

編集委員長
Editor-in-Chief

阿部啓之
Hiroyuki ABE

副編集委員長
Deputy Editor

下田勝久
Katsuhisa SHIMODA

編集委員
Associate Editor

秋山典昭
Fumiaki AKIYAMA

間野吉郎
Yoshiro MANO

菅野勉
Tsutomu KANNO

手島茂樹
Shigeki TEJIMA

住田憲俊
Noritoshi SUMIDA

小林栄治
Eiji KOBAYASHI

荻野暁史
Akifumi OGINO

野村将
Masaru NOMURA

農研機構研究報告 畜産研究部門

第17号 (平成29年3月)

－ 目 次 －

－ 原著論文 －

- ラクトコッカス ラクティス H61 加熱死菌が子ブタの免疫系へ及ぼす影響
..... 兼松伸枝・木元広実・林征幸・小林洋介・田島清 1
- aNDFom, ADFom および ADL 連続分析の有用性
..... 甘利雅弘・田島清・大森英之 7
- 砂耕培養液中の窒素源の形態がエリアンサス (*Erianthus arundinaceus*) の生育に及ぼす影響
..... 高溝正・安藤象太郎・小林真 13

BULLETIN OF THE NARO,
LIVESTOCK AND GRASSLAND SCIENCE

No.17 (March2017)

CONTENTS

Research Papers

- Nobue KANEMATSU, Hiromi KIMOTO, Masayuki HAYASHI, Yosuke KOBAYASHI
and Kiyoshi TAJIMA :
Effect of Oral Administration of *Lactococcus lactis* H61 on the Immune System of Piglets··· 1
- Masahiro AMARI, Kiyoshi TAJIMA and Hideyuki OHMORI :
The Utility of the Continuous Method of aNDFom, ADFom and ADL ··········· 7
- Tadashi TAKAMIZO, Shotaro ANDO and Makoto KOBAYASHI :
Growth Response of *Erianthus arundinaceus* Grown in Sand Culture to the Form of N
Supplied in Nutrient Solution ··········· 13

ラクトコッカス ラクティス H61 加熱死菌が子ブタの免疫系へ及ぼす影響

兼松伸枝・木元広実¹・林征幸・小林洋介・田島清

農研機構畜産研究部門 家畜代謝栄養研究領域, つくば市, 305-0901

¹農研機構畜産研究部門 畜産物研究領域, つくば市, 305-0901

要 約

畜産研究部門保有の *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* H61 (H61) が免疫系へ与える影響を調べるため, 9 週齢の LWD 交雑種ブタへ加熱処理菌体 (体重 25kg あたり 4×10^{10} 個) を毎朝 1 回, 通常量の抗生剤を含む飼料の給餌時に与えた。投与開始前日 (Day0) と 2 週間後 (Day14) の午前 10 時に採血し, 分離した末梢血中単核球 (PBMC) から CD3, CD4, CD8, CD16, CD21, WC1 抗体に対する細胞表面抗原マーカー陽性細胞とリンパ球サブセットの比率, およびナチュラルキラー細胞障害活性 (NK 活性) をフローサイトメーターにて測定した。血漿コレステロール濃度と血漿中の免疫グロブリン (IgA と IgG) 濃度の測定を行った。

H61 投与による効果は $\gamma\delta$ T 細胞を含むサブセットである CD3+CD4-CD8- 細胞で有意な増加が認められ, CD3-CD8+ 細胞については低下する傾向が見られた。CD3+CD4-CD8- 細胞では H61 投与区のみ Day0 より Day14 の値が増加した。免疫グロブリン濃度に効果は認められなかった。また, 14 日間の増体量, 飼料摂取量および飼料効率にも有意差は認められなかった。

H61 死菌体の 2 週間投与はブタの血中免疫細胞に対し影響を与える可能性が示唆された。

キーワード: 乳酸菌 H61, ブタ, $\gamma\delta$ T 細胞, リンパ球サブセット

緒 言

養豚現場においては, 子豚の損耗防止のため各種抗菌剤の添加が長く行われてきた。しかし食の安全・安心や製品の高付加価値化の観点から, 抗菌剤の使用量抑制や免疫増強を目的に, 乳酸菌製剤や発酵リキッド飼料の実用化が進んでいる。当研究部門の発酵リキッド研究もブタの健康状態に対する成果を挙げてきたが^{7,10,16)}, 乳酸菌の給与効果は, 菌種や給与量, 飼養環境等で差異があり, 作用機序には未だ不明な点が多い。一方, 多頭飼育において恒常的な生産性を維持するためには, 抗菌剤の全廃, あるいは生菌剤や天然素材のみでの飼養へ移行することは難しい。

ラクトコッカス・ラクティス H61 (以下 H61) は畜産研究部門が保有する乳酸菌でプロバイオティック機能を

もち, 死菌体においてもマウス表皮やヒト皮膚の状態の改善や免疫賦活作用等の有用性が確認されている⁴⁻⁶⁾。近年の研究では^{13,14)}, 死菌を含め乳酸菌が直接, 免疫系へ影響を与えることが明らかとなってきた。本研究は, ブタに対する免疫力増強物質の候補として, 飼料として調製が容易な死菌体において効果が期待できる H61 に着目し, 2 週間の連続投与前後について免疫学的指標の変化から評価を行った。

材料および方法

本実験は国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構動物実験等実施規程および畜産研究部門動物実験等実施要領に従い実施した。

1. 供試動物

当研究部門で生産したLWD交雑種10頭(一腹きょうだいの雌および去勢雄)を用いた。当研究部門における慣行的な飼養に基づき、4週齢で離乳し、8週齢における実験豚舎への移動まで子豚はつらつ(全農・くみあい飼料(株))にて飼養した。移動後の半開放豚舎では他個体を認識可能な平床豚房(4.7m²)に個別飼養し、実験開始までの1週間で徐々にブタ試験用標準飼料SDS No.3(日本配合飼料(株))へ飼料を切り替えた。9週齢の実験開始時にH61投与区と対照区の2区に分け、平均体重と性別が等しくなるよう5頭ずつ配分した。平均体重は実験開始時に25kg、終了時は35kgであった。試験用飼料へは通常量のリンコミックス44(ゾエティスジャパン(株);飼料1kgあたりリンコマイシン110mg力価)およびCTC散(フジタ製薬(株);飼料1kgあたりクロルテトラサイクリン440mg力価)を加え、午前9時に定量を給餌し、飲水は自由とした。体重は実験開始前日より週に1回測定し、日本飼養標準・豚の期待増体日量に基づき、1日の給餌量は体重の5%重量から開始し、Day5から体重の6%重量、Day11からは7%重量とした。

2. H61 給与および試料採取

Lactococcus lactis subsp. *cremoris* H61はMRS培地(Becton, Dickinson and Company)にて30℃で約24時間培養した。培養終了後の菌体は0.85%食塩水で1回洗浄し、1mLあたり 4×10^{10} 個となるよう蒸留水に懸濁した状態で121℃、15分間の加熱処理を行い、-20℃にて保存した。H61投与区にのみ実験開始日から14日間、体重25kgあたり 4×10^{10} 個の割合で加熱処理死菌体懸濁液を飼料へ混ぜて与え、完食を確認した。

採血は投与開始前日(Day0)と2週間後(Day14)の朝10時に鼻保定にて頸静脈から行った。EDTA-2Na含有の真空採血管(テルモ(株))に2本採取した。

3. 血液の分析と統計解析

単核球(peripheral blood mononuclear cell; PBMC)は常温でリンホプレップ(Axis-Shield PoC AS)により密度勾配遠心分離し、CD3, CD4, CD8, CD16, CD21, WC1に対する蛍光標識抗体(表1)にて細胞表面抗原マーカーの多重染色を行った。ナチュラルキラー細胞障害活性(NK活性)は, carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE; Enzo Life Sciences, Inc.)で染色したK562細胞を、分離した単核球と共培養にて4時間反応させた後、7-Aminoactinomycin D (7-AAD; Beckman Coulter)を用いて測定した⁹⁾。マーカー陽性細胞比率およびNK活性の測定にはフローサイトメーター(Gallios, Beckman Coulter)を用い、測定データとサブセットの解析にはFlowJo (FlowJo, LLC)を使用した。

血漿は4℃、2200Gで遠心分離して得て、その後、測定まで-30℃にて保存した。血漿中コルチゾール濃度は化学発光を用いたEIA法で測定した。血漿中免疫グロブリン(IgAおよびIgG)濃度はブタ用のELISA Quantitation Set (Bethyl Laboratories)を用いて測定した。

体重と増体についての統計処理は、両区間で対応のないt検定を行った。また、免疫指標についてはSAS Add-In for Microsoft Office 6.1の混合モデルを使用した。すなわち採血日と実験区を固定効果、個体を変量効果として個体差を考慮に入れた分散分析を行い、固定効果とその交互作用について検討した。多重比較は

表1. 使用した蛍光抗体

Specificity	Clone	Fluor	Source
CD3e	BB23-8E6-8C8	Alexa Fluor 647	BD Biosciences
CD4a	MIL17	FITC	AbD serotec
CD8a	76-2-11	PE	Beckman Coulter
CD16	FCRIII	FITC	AbD serotec
CD21	BB6-11C9.6	PE	Beckman Coulter
WC1	CC101	FITC	AbD serotec

The specificity and clone of antibodies used for flowcytometric phenotyping of lymphocyte subpopulations.

PE: phycoerythrin, FITC: fluorescein isothiocyanate

Tukey-Kramer 法により行い、 $P < 0.05$ を有意差があるとし、 $P < 0.1$ を傾向があるとした。

結 果

14 日間の H61 給与試験期間中、両区とも下痢や食滞などの発生は認められず順調に経過した。その間の増体成績と飼料効率について両区間に差は認められなかった(表 2)。

測定した免疫指標のうち、実験区、採血日、および両者の交互作用において有意差が出た項目について表 3 に示した。採血日 (Day) の有意差は実験区分け (Group) と関係なく Day0 と Day14 の値に差があることを示し、Group における有意差は単に 2 つの区間で値が異なることを示し Day と無関係である。Day × Group で示す

2 つの固定効果に交互作用があるということは、H61 投与区と対照区で Day0 と Day14 の値の変動パターンが異なることを意味する。その変動の違いが投与効果であり、交互作用の有意差として表される。本実験における測定値解析の結果、交互作用は CD3+CD4-CD8- 細胞で認められ、CD3-CD8+ 細胞については傾向が得られた ($P = 0.07$)。他のサブセットや個別の抗体に対する陽性細胞、血中のコルチゾールおよび IgA 濃度の結果に有意差はなかった。

交互作用がみられた CD3+CD4-CD8- 細胞と CD3-CD8+ 細胞の P 値を表 4 に示した。CD3+CD4-CD8- 細胞では、H61 投与区のみ Day0 の値より Day14 の値が増加し両区間に有意な差が得られた。CD3-CD8+ 細胞においては H61 投与区の Day14 の平均値は減少したが両区間差は認められなかった。

表 2. 増体成績、飼料摂取量および飼料効率

	Weight gain (kg)	Daily gain (g / day)	Feed intake (g / day)	Feed efficiency
H61 group	9.8 ± 0.3	702.9 ± 19.8	1629.1 ± 49.4	0.43 ± 0.02
Control	10.3 ± 0.4	738.6 ± 25.3	1673.0 ± 50.5	0.44 ± 0.01

Growth performance in 2 weeks. Data represent mean ± standard error (n=5).

表 3. 免疫学的指標に対する H61 投与の影響

	Group			Day			P value		
	H61 (n=5)	Control (n=5)	SEM	Day 0	Day14	SEM	Group	Day	Group × Day
CD4	19.7	24.1	1.0	23.5	20.3	0.9	0.02	0.03	0.20
CD3-CD8+	9.2	9.0	1.3	9.6	8.6	1.1	0.90	0.43	0.07
CD3+CD4-CD8-	9.5	32.2	3.2	28.0	33.7	2.5	0.56	0.03	0.04
NK activity	46.3	39.2	5.4	17.2	68.3	5.1	0.38	$P < 0.01$	0.71
IgG	7.0	7.9	0.5	6.1	8.8	0.5	0.24	$P < 0.01$	0.57

Effects of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strain H61 on immunological indices.

表 4. CD3+CD4-CD8- 細胞と CD3-CD8+ 細胞に対する H61 投与の影響

	CD3+CD4-CD8-			CD3-CD8+		
	H61	Control	SEM	H61	Control	SEM
Day 0	24.1 ^a	31.9	3.5	10.9	8.2	1.5
Day 14	34.9 ^b	32.6	3.5	7.5	9.7	1.5

Effects of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strain H61 on lymphocyte subsets. Different subscript letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

考 察

乳酸菌 *L. lactis* subsp. *cremoris* H61 はプロバイオティック機能をもち、免疫応答への効果も期待されている。食品のみならず犬猫用健康補助食品としても既に商品化されているが、免疫系への影響や機序について詳細は不明であった。ブタは生理学的、解剖学的にヒトへの類似性が高いためヒトに近い知見を得られる実験動物として医学的研究への利用が進み、リンパ球の CD 分類や表面マーカーの同定が急速に発展している^{2,3,11,15)}。CD マーカーに対する市販抗体で各種の血中細胞を計測することが可能となり、その数値や変動は臓器移植に関する研究や薬品開発において重要な免疫学的指標として用いられている。本実験では、従来からの免疫指標測定に加えリンパ球サブセット解析を行うことにより、H61 の経口投与がブタ免疫系へ与える影響について検討した。

2 週間の H61 投与の結果、末梢血中 CD3+CD4+CD8- 細胞の比率が有意な増加を示した。このサブセットには、NK 細胞と同様に、ウイルスや細菌に対する初期感染防御を担う $\gamma\delta$ T 細胞が含まれる¹¹⁾。 $\alpha\beta$ 鎖の T 細胞受容体を持ち、CD3+CD4+ あるいは CD3+CD8+ と表される $\alpha\beta$ T 細胞に対し、 $\gamma\delta$ 鎖の受容体を持つ $\gamma\delta$ T 細胞は若齢のブタやウシに多いことが報告されている^{3,12,15)}。特にブタについては各種病原微生物に対する有効性を確認した既報も多く¹¹⁾、NK 細胞が未発達な幼弱時から成長期においては重要な自然免疫細胞である^{12,15)}。CD3+CD4+CD8- 細胞に $\gamma\delta$ T 細胞以外の細胞も含まれることは考えられるが、今回の解析で得られた血中比率は既報²⁾と同レベルであり、H61 の 2 週間投与により末梢血中における $\gamma\delta$ T 細胞の比率が増加した可能性がある。 $\gamma\delta$ T 細胞はウシにおいてはほとんどが WC1 抗原を発現する WC1+ 細胞であるのに対し、ブタでは WC1+ と WC1- の $\gamma\delta$ T 細胞に分類されている¹²⁾。WC1 抗原発現の有無による機能性の違いについてはまだ不明であるが²⁾、WC1+ 細胞の結果には差がなかったため、H61 投与により増加した可能性があるのは CD3+CD4+CD8-WC1- サブセットと推測される。

一方、H61 投与により減少傾向を示した CD3-CD8+ 細胞には NK 細胞も含まれる^{3,15)}。しかし NK 細胞に発現する CD16 が陽性である細胞や別の NK 細胞サブセットである CD3-CD16+ 細胞¹¹⁾の結果に有意差や変化はなかった。従って、本実験において減少傾向を示した CD3-CD8+ 細胞は NK 細胞ではない可能性がある。

本実験では、女性の皮膚の状態（水分量など）を対象とした研究において、肌状態を表す指数へ H61 の効

果が出た摂取量⁵⁾を基に、体重換算で 2 倍となる量の H61 を投与した。肌と免疫系の関連については、紫外線曝露マウスでの細胞性免疫抑制や¹⁾、紫外線により誘起された免疫応答の変化が皮膚がんの要因となること⁸⁾等の報告がある。本実験では、動物種の違いに加え成長が著しい時期でもあったため、免疫系への明瞭な影響や変化を及ぼすには必要十分な投与量ではなかった可能性がある。

今回の飼料は、当研究部門における通常の子豚飼育と同量の抗菌剤を加えて使用した。抗菌剤は免疫系へ大きな影響を与える殺菌作用を持ち、ワクチンやプロバイオティクスへの抑制効果もあることから、それらとの併用は臨床的に推奨されない薬品である。しかし、抗菌剤と H61 とを同時に与えた本実験においては、血中免疫細胞の割合へ対する H61 の投与効果が示唆される結果が得られた。抵抗力の弱い個体は飼養条件に関わらず存在するため、抗菌剤を用いた飼養中でも、細かい健康管理を必要とする個体や区へのみ随時投与できる補助飼料として H61 を利用できる可能性がある。ただし、臨床的な効果が得られる投与量や方法については今後の検討が必要と考えられる。

謝 辞

本研究の統計解析には農林水産研究情報総合センターのシステムを利用しました。解析についての説明方法は家畜育種繁殖研究領域の石井和雄上級研究員ならびに佐々木修ユニット長にご教授いただきました。厚く御礼申し上げます。

引用文献

- 1) Araneo, B.A., Dowel, T., Moon, H.B., and Daynes, R.A. (1989). Regulation of murine lymphokine production in vivo. Ultraviolet radiation exposure depresses IL-2 and enhances IL-4 production by T cells through an IL-1 dependent mechanism, *J. Immunol.*, 146, 1737-1744.
- 2) Carr, M.M., Howard, C.J., Sopp, P., Manser, J.M., and Parsons, K.R. (1994). Expression on porcine gamma delta lymphocytes of a phylogenetically conserved surface antigen previously restricted in expression to ruminant gamma delta T lymphocytes, *Immunology*, 81, 36-40.
- 3) Gerner, W., Käser, T., and Saalmüller, A. (2009).

- Porcine T lymphocytes and NK cells – An update, *Dev. Comp. Immunol.*, 33, 310–320.
- 4) Kimoto-Nira, H., Suzuki, C., Kobayashi, M., Sasaki, K., Kurisaki, J., and Mizumachi, K. (2007). Anti-aging effect of a lactococcal strain: analysis using senescence-accelerated mice, *Br. J. Nutr.*, 98, 1178–1186.
 - 5) 木元広実・青木 玲二・佐々木 啓介・鈴木 チセ・水町 功子 (2012). ヒトの肌の状態に対する, H61 の摂取効果 – 年齢層別解析 –, *日本畜産学会報*, 83, 307–313.
 - 6) Kimoto-Nira, H., Nagakura, Y., Kodama, C., Shimizu, T., Okuta, M., Sasaki, K., Koikawa, N., Sakuraba, K., Suzuki, C., and Suzuki, Y. (2014). Effects of ingesting fermented milk by using *Lactococcus lactis* H61 on skin health in young women: A randomized double-blind study, *J. Dairy Sci.*, 97, 5898–5903.
 - 7) Kobashi, Y., Ohmori, H., Tajima, K., Kawashima, T., and Uchiyama, H. (2008). Reduction of chlortetracycline-resistant *Escherichia coli* in weaned piglets fed fermented liquid feed, *Anaerobe*, 14, 201–204.
 - 8) Kripke, M.L. (1981). Immunologic mechanisms in UV-radiation carcinogenesis. *Adv. Cancer Res.*, 34, 69–106.
 - 9) Lecoeur, H., Fevrier, M., Garcia S, Riviere. Y., and Gougeon, M.L. (2001). A novel flow cytometric assay for quantitation and multiparametric characterization of cell-mediated cytotoxicity, *J. Immunol. Methods*, 253, 177–187.
 - 10) Mizumachi, K., Aoki, R., Ohmori, H., Saeki M., and Kawashima T. (2009). Effect of fermented liquid diet prepared with *Lactobacillus plantarum* LQ80 on the immune response in weaning pigs, *Animal*, 3, 670–676.
 - 11) Piriou-Guzylack, L., and Salmon, H. (2008). Membrane markers of the immune cells in swine: an update, *Vet. Res.*, 39, 54.
 - 12) Pollock, J.M. and Welsh, M.D. (2002). The WC1+ $\gamma\delta$ T-cell population in cattle: a possible role in resistance to intracellular infection, *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 89, 105–114.
 - 13) Reuter, G. (1998). 腸内フローラとプロバイオティクス (光岡知足編), 学会出版センター, 東京, 17–39.
 - 14) Salminen, S., Ouwehand, A., Benno, Y., and Lee, Y.-K. (1999). Probiotics: How should they be defined?, *Trends Food Sci. Technol.*, 10, 107–110.
 - 15) Sipos, W., Duvigneau, C.J., Hartl, R.T., and Schwendenwein, I. (2011). Exploratory reference intervals on hematology and cellular immune system of multiparous Large White sows, *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 141, 307–311.
 - 16) Tajima, K., Ohmori, H., Aminov, R.I., Kobashi, Y., and Kawashima, T. (2010). Fermented liquid feed enhances bacterial diversity in piglet intestine, *Anaerobe*, 16, 6–11.

Effect of Oral Administration of *Lactococcus lactis* H61 on the Immune System of Piglets

Nobue KANEMATSU, Hiromi KIMOTO¹, Masayuki HAYASHI, Yosuke KOBAYASHI and Kiyoshi TAJIMA

Division of Animal Metabolism and Nutrition,
Institute of Livestock and Grassland Science, NARO,
Tsukuba, 305-0901 Japan

¹Division of Animal Products Research,
Institute of Livestock and Grassland Science, NARO,
Tsukuba, 305-0901 Japan

Summary

In order to investigate the immunological effect of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* H61 that we have developed, it was administered to LWD crossbred pigs (9-week-old) with a feeding of every morning (4×10^{10} heat-killed cells per 25kg in weight). Blood samples were taken at 10:00 a.m. of the day before the administration start (Day0) and two weeks later (Day14). CD3, CD4, CD8, CD16, CD21, and WC1 antigens on isolated peripheral blood mononuclear cells (PBMC), and Natural killer cell activity (NK activity) were measured by flow cytometry. Additionally, plasma concentration of IgA, IgG and cortisol were measured.

The effect of H61 on lymphocyte subsets expressing selected differentiation antigens were shown in CD3+CD4-CD8-cell significantly, and CD3-CD8+cell showed a tendency. CD3+CD4-CD8-cell subset that includes $\gamma\delta$ T cell increased at Day14. Other indices did not show any change. Neither body weight gain nor feed intake showed the significant difference. Strain H61 has the possibility as immunoenhancement additive to pig, even in the feeding contained normal amount of antibiotic.

Key words: *Lactococcus lactis* H61, pig, $\gamma\delta$ T cell, lymphocyte subset

aNDFom, ADFom および ADL 連続分析の有用性

甘利雅弘・田島清・大森英之¹

農研機構畜産研究部門 家畜代謝栄養研究領域, つくば市, 305-0901

¹農林水産省農林水産技術会議事務局, 東京, 100-8950

要 約

反芻家畜において、粗飼料中の繊維成分は重要な栄養素であり、それらの飼料成分としてデタージェント分析法（常法）による中性デタージェント繊維（aNDFom）、酸性デタージェント繊維（ADFom）および酸性デタージェントリグニン（ADL）が世界的に広く利用されている。ADFom は結晶性セルロースとリグニンを示す指標とされているが、飼料中のペクチン質が含まれているため過大に評価されている。ADFom をより正確な飼料評価の指標とするため、aNDFom, ADFom および ADL を連続して分析（連続分析）し、その有用性について検討した。供試試料は、オーチャードグラス混播乾草（OG）、アルファルファ乾草（ALF）、アルファルファヘイキューブ（Cube）、牧草サイレージ（GS）、とうもろこしサイレージ（CS）、ソルガムサイレージ（SORS）、稲発酵粗飼料（稲 WCS）、大麦ホールクロップ（BWC）であった。aNDFom および ADL では、常法と連続分析との分析値の差は、それぞれ -1.5 ~ 1.3 パーセントポイント（% P）、-0.2 ~ 0.1% P であり、大きな差は認められず、連続分析による分析値は、常法の aNDFom および ADL と同等に扱うことができるものと考えられた。常法による ADFom 分析値と連続法による ADFom 分析値（n-ADFom）では、すべての飼料種で n-ADFom が低い値を示した。Cube および稲 WCS では、7.4% P の差がみられ、他の飼料でも 2.2 ~ 4.0% P の差が認められた。これはペクチン質が酸性デタージェント溶液（AD 溶液）による加熱処理過程で過し難い物質の生成に寄与しているものと推察され、ADFom を過大に評価していることになる。また、飼料中の総繊維量を可消化部分と難消化部分とに分類する観点からも aNDFom 中の n-ADFom とヘミセルロースに分類する方が理論的に適切であり、連続分析による n-ADFom は総繊維中の難消化性繊維質を示す飼料の消化特性や栄養評価に有効な指標となりうるものと考えられた。

キーワード：デタージェント分析, aNDFom, n-ADFom, ADL, 連続分析

緒 言

乳牛の飼養管理においては、その能力を最大限に引き出して安定的な乳生産を図るため、成長や生産量に応じた栄養要求量の適正給与が必要である。また、酪農経営での生産費の 50% を超える飼料費¹⁰⁾の節減は経営の安定・強化を図る上で重要な課題である。特に、飼料価格が高騰している近年では、飼料の合理的な給与に向けた取り組みはさらに重要性を増している。反芻家畜に給与する粗飼料を有効利用するためには、飼料成分含量を正

確に把握する必要がある。反芻家畜において、粗飼料中の繊維成分は重要な栄養素であり、刈り取りステージや調製方法等により変動幅が大きい。飼料中の繊維成分の評価手法としてデタージェント分析法^{11,12)}による中性デタージェント繊維（aNDFom）、酸性デタージェント繊維（ADFom）および酸性デタージェントリグニン（ADL）、並びに酵素分析法²⁾による総繊維（OCW）、低消化性繊維（Ob）等が提案され利用されてきている。近年では、aNDFom, ADFom および ADL が飼料の栄養評価および給与診断の指標として世界的に広く利用され

てきている。

デタージェント分析法は、それまで飼料の繊維質の指標として使われてきた粗繊維の持つ欠陥を補い、反芻家畜の消化性をより適切に評価するため、1963年にVan SOEST^{11,12)}によって提案された。以後、NDFは α -アミラーゼの前処理または耐熱性 α -アミラーゼ添加によるデンプン質除去⁷⁾、たんぱく質除去のための亜硫酸ナトリウム添加の有無¹⁷⁾および灰分補正¹⁸⁾などの改良が加えられ、現行のaNDFomで利用されることが一般的となった。

一方、ADFomは、試料を酸処理することで総繊維中の易消化性のヘミセルロース部分を除去し、結晶性セルロースとリグニンを示す指標とされているが、飼料の種類によってNDFomよりADFomの分析値の方が大きくなるなどの事例^{8,9)}がみられる。本来、飼料中の総繊維量として定義されるNDFom中の結晶性セルロースとリグニンがADFomであることから、明らかに矛盾することであり、適正な分析値として評価されていないと考えられる。その原因は、飼料中のペクチン質の存在によるものとされている^{3,9)}。野菜類や果実粕等では顕著な差がみられ、牧草類等の粗飼料でもペクチン質に由来する差が認められる報告³⁾がある。さらに、この解決策として、中性デタージェント溶液(ND溶液)処理残渣についてADFom分析(n-ADFom)を実施する方法が提案³⁾されている。飼料中のペクチン質は易消化性物質でありADFom中に含まれていることは結晶性セルロースとリグニンを示すADFomが過大に評価されていることになる。また、ADFomは粗繊維のように単独で分析する手法が使われているが、総繊維中の結晶性セルロースとリグニンとして評価するためには、NDFom中のADFomを定量する方が理論的にも適合した方法であり、ADFomの過大評価の問題も解決できるものと考えられる。また、最近では、自動化された繊維分析装置が普及し、硫酸を含むAD溶液を取り扱う上で安全な操作でaNDFom, n-ADFom, ADLを連続して分析することが可能になった。

そこでaNDFom, n-ADFom, ADLを連続分析で定量し、ペクチン質を除去した定量値を従来の方法で定量した分析値と比較し、デタージェント分析法の連続法による分析値の飼料評価への有用性を検討した。

材料と方法

1. 供試試料

供試試料は、オーチャードグラス混播乾草(アキミド

り、1番草、出穂期、OG)、アルファルファ乾草(2番草、開花前期ALF)、市販のアルファルファハイキューブ(Cube)、牧草サイレージ(イタリアンライグラス、いなずま、GS)、とうもろこしサイレージ(デントコーン、黄熟後期、CS)、ソルガムサイレージ(糊熟期、SORS)、稲発酵粗飼料(夢あおば、稲WCS)、大麦ホールクロップ(シュンライ、BWC)であった。供試試料は熱乾法により60℃で18時間乾燥させ、室温で1日間放置した後、1mmのメッシュを通過する粒度で粉碎し、飼料分析に供した。

2. 飼料成分分析

飼料成分分析は、一般分析法⁶⁾による水分、デタージェント分析法^{7,11,12)}に基づくaNDFomおよびADFomとADLを分析する方法(常法)であり、それらに加えてNDF処理残渣をAD溶液で煮沸し、それ以降は常法に準じた分析操作でn-ADFom, ADLを連続させて定量した。これらのデタージェント分析には、同一の試薬を用い、アクタックファイバーテスト(VELP SCIENTIFICA FIWE6)を用いて定量した。得られた各成分値について、それらの差を比較することにより検討した。本試験において、デタージェント分析に供した試料量は、a-ADFomの分析法⁷⁾に従い0.5gとした。aNDFom, n-ADFom, ADLを連続で分析する手順を図1に示した。

結果と考察

供試試料について、それぞれのデタージェント分析法で分析した結果を表1に示した。aNDFomでは、常法と連続法の分析値は-1.5~1.3%Pの差が認められた。常法と連続分析におけるaNDFom分析値では、異なる要因が補正する灰分量の違いによるもののみであり、それらの違いが反映されていると考えられる。ALF, Cubeではそれぞれ1.3, 1.1%Pと連続法が大きい値を示したが、CS, 稲WCSは、それぞれ-1.5, -1.4%Pと連続法が小さい値を示した。OG, GS, SORSでも灰分補正量が少ないにもかかわらず連続法の方が低い値を示した。aNDFomにおける常法での灰分量と連続法でのADL中の灰分量との差は、0.5~3.6mgであり、0.5gのサンプル量に対し0.1~0.7%の範囲にあり、通常分析で二反復分析の相対誤差を $\pm 5\%$ の範囲で許容していることを考えると、これらの分析誤差は軽微な差であると考えられる。

このことから連続法によるaNDFomにおいて、ADL

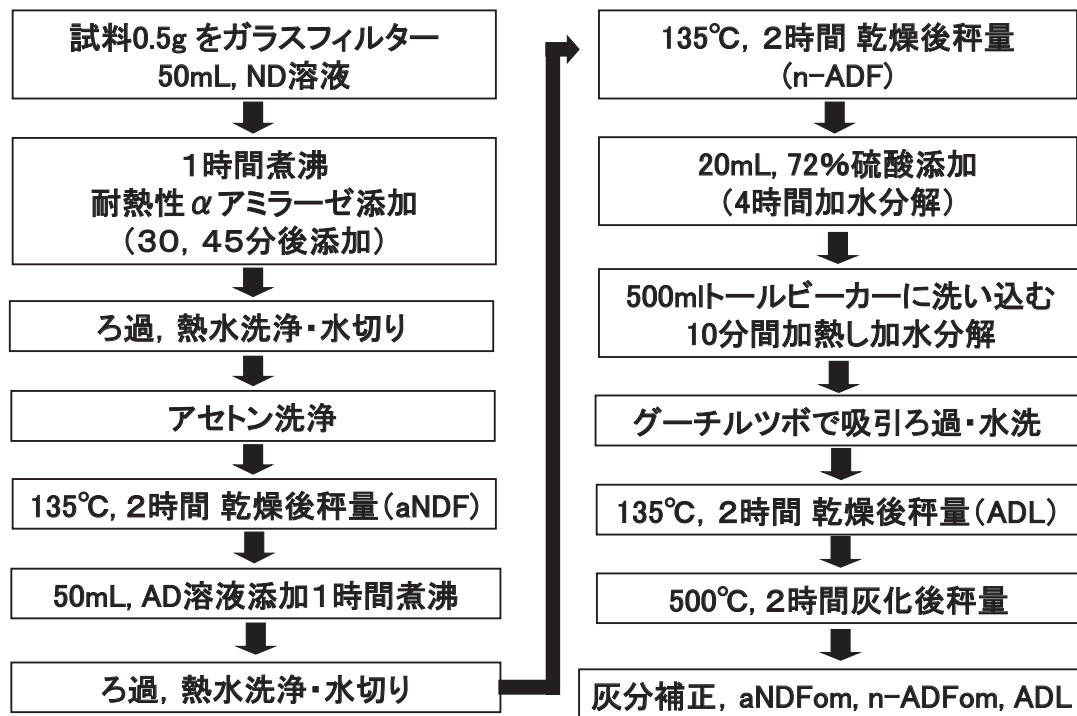


図 1. aNDFom, n-ADFom, ADL の連続分析の手順

表 1. 各種飼料のデタージェント分析による飼料成分

	aNDFom			ADFom				ADL		
	常法	連続法	差	常法	連続法	差	相対比	常法	連続法	差
OG	59.3	59.2	-0.1	38.9	36.4	-2.5	6.7	4.0	3.9	-0.1
ALF	42.1	43.2	1.1	33.2	31.0	-2.2	7.1	7.2	7.3	0.1
Cube	33.8	35.1	1.3	32.8	25.4	-7.4	29.4	6.0	5.8	-0.2
GS	53.9	53.1	-0.8	32.5	29.7	-2.8	9.4	2.8	2.9	0.1
CS	51.0	49.5	-1.5	32.5	29.7	-2.8	9.4	3.5	3.5	0.0
稲 WCS	38.4	37.3	-1.1	29.8	22.4	-7.4	32.7	4.2	4.2	0.0
SORS	64.1	63.4	-0.7	42.1	38.1	-4.0	10.5	4.2	4.1	-0.1
BWC	56.4	56.5	0.1	28.9	26.6	-2.3	8.3	2.8	2.8	0.0

aNDFom：中性デタージェント繊維，ADFom：酸性デタージェント繊維，ADL：酸性デタージェントリグニン，OG：オーチャードグラス混播乾草，ALF：アルファルファ乾草，Cube：アルファルファヘイキューブ，GS：牧草サイレージ，CS：トウモロコシサイレージ，稲 WCS：稲発酵粗飼料，SORS：ソルガムサイレージ，BWC：大麦ホールクロップ

中の粗灰分を代用することは、今回の結果をみる限り各種飼料における aNDFom 分析値に大きな影響を与えるものではなく常法の aNDFom と同等に扱うことができるものと考えられる。なお、ADL の分析を行わず n-ADFom のみの分析では、aNDFom 分析値は、n-ADFom 分析における灰分量が ADL における灰分量を下回ることがないことから、n-ADFom 分析の灰分量を用いて補正し、aNDFom 分析値として用いることも可能と考えられる。

ADFom における常法と連続法との分析値では、すべ

での飼料の種類で連続法の方が低い値を示した。Cube および稲 WCS ではどちらも 7.4% P と大きな差がみられ、他の飼料でも 2.2 ~ 4.0% P の差が認められた。これは、常法における ADFom 分析値の中にコロイド状多糖類を主要画分とするペクチン質が含まれているためである^{4,5)}。この結果から Cube および稲 WCS は、他の粗飼料よりペクチン質を多く含有することが示された。アルファルファはイネ科牧草に比べペクチン質が多く含まれる報告³⁾があり、Cube にも多く含まれることが本試験の結果からも確認できた。なお、ALF は 2 番草の

開花前期のものであったためペクチン質含量が低かったものと考えられた。稲 WCS は本試験の結果からペクチン質含量が高いものと推察されるが、今後、分析データを集積して明らかにしていく必要がある。これらペクチン質は、糖と酸の存在下でゼリー状になる性質を持つが、ペクチン質の多糖体はその構造が複雑でその定量法も確立されていないことから含有量を示すことができ得ないが、ペクチン質が AD 溶液による加熱処理過程でろ過し難い物質の生成に寄与しているものと推察され、ADFom 中に残留し過大にその含量を評価してしまうものと考えられる。一方、連続処理では aNDFom 分析の過程で ND 溶液による煮沸処理によりペクチン質が流出し、ADFom 分析に影響を及ぼさないことから結晶性セルロースとリグニンのより真値に近い分析値が得られるものと考えられる。ADFom 分析値に対する n-ADFom 分析値との比率についてみると OG, ALF, BWC, CS, SORS では 6.7 ~ 10.5%, Cube, 稲 WCS はそれぞれ 29.4, 32.7% の違いが認められ、飼料の種類によっては ADFom を大きく過大評価することになり、飼料の栄養的な価値を過小評価してしまうことになる。また、反芻家畜における繊維成分の消化性区分をよりの確に表示するために提案され、粗繊維と可溶無窒素物との化学的な不合理を解決するために、粗繊維分析から派生した ADFom 分析法であるが、飼料中の総繊維量を可消化部分であるヘミセルロースと結晶性セルロースとリグニンとに分類するためにも aNDFom と n-ADFom との差をヘミセルロースとする方がよりの確に飼料の栄養価を示す指標として利用できるものと期待される。特に、野菜残渣、果実粕および食品残渣等のペクチン質が多く含まれると考えられる飼料、並びに ADFom 分析値が aNDFom 分析値より大きい値を示す飼料では、連続法による n-ADFom 分析が推奨される。

ADL については、常法と連続法との分析値の差は、すべての飼料で -0.1 ~ 0.2% P の範囲にあり、aNDFom の場合と同様に、常法の分析値と同等に扱えるものと考えられた。

先に述べたように aNDFom 並びに ADFom が持つ飼料中の総繊維、総繊維中の結晶性セルロースとリグニンという観点からその差をヘミセルロースとするならば、aNDFom 残渣について ADFom 分析する n-ADFom は、理論的には適切な方法と言える。今回の分析結果が示すように ADFom と n-ADFom 分析値との間には大きな差が認められることから、n-ADFom 分析値を従来の ADFom 分析値と同一に扱うことはできない。したがって、n-ADFom 分析値を使用する際には、これら画分の

化学的な性質を理解し、分析法を明記した上で用いるべきであると考え。今後、n-ADF 分画の栄養学的な意義を家畜試験等によりその有効性を検証し、データ蓄積を図っていく必要があると考える。

引用文献

- 1) 阿部亮 (1988). 炭水化物を中心とした飼料分析法とその飼料栄養価評価法への応用, 畜産試験場研究資料, 2.
- 2) 阿部亮・堀井聡 (1979). 細胞壁物質の定量における中性デタージェント法と酵素分析法との比較, 日本草地学会誌, 25, 70-75.
- 3) 甘利雅拓・永西修・寺田文典・野中和久 (2009). 野菜におけるデタージェント分析法適用上の問題点, 畜産草地研究所研究報告, 10, 9-13
- 4) 浅岡久俊 (1986). 化学セミナー 14 糖質, 丸善株式会社, 東京, 149-151.
- 5) Cassida, K.A., Turner, K.E., Foster, J.G. and Hesterman, O.B. (2007). Comparison of detergent fiber analysis methods for forages high in pectin, *Anim. Feed Sci. & Tech.*, 135, 283-295.
- 6) 石橋晃監修 (2001). 動物栄養試験法, 養賢堂, 東京, 642p.
- 7) 自給飼料利用研究会編 (2008). 粗飼料の品質評価ガイドブック, 三訂版, 社団法人日本草地畜産種子協会, 東京, 195p.
- 8) 梶川博 (1998). 乳牛用飼料における有効繊維とは, ルーメン 5, デーリイ・ジャパン, 東京, 74.
- 9) 野中和久・名久井忠・篠田満 (1994). ニンジンサイレージの調製と飼料価値, 北海道農業試験場研究報告, 159, 73-85.
- 10) 農林水産省大臣官房統計部 (2016). 農業経営統計調査 平成 27 年度牛乳生産費 (全国), http://www.maff.go.jp/j/tokei/sokuhou/noukei/seisanhi_tikusan/gyunyu/h27/index.html [2016 年 9 月 15 日参照].
- 11) Van Soest, P.J. (1963). Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. I. Preparation of fiber residues of low nitrogen contents, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 46, 825-829.
- 12) Van Soest, P.J. (1963). Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. Determination of Plant cell wall constituents, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 50, 50-55.

The Utility of the Continuous Method of aNDFom, ADFom and ADL

Masahiro AMARI, Kiyoshi TAJIMA and Hideyuki OHMORI¹

Division of Animal Metabolism and Nutrition,
Institute of Livestock and Grassland Science, NARO,
Tsukuba, 305-0901 Japan

¹Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council,
Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries,
Tokyo, 100-8950 Japan

Summary

A fibrous contents included in the forage is important nutriment in ruminant, and neutral detergent fiber (aNDFom), acid detergent fiber (ADFom) and acid detergent lignin (ADL) by a conventional method are used worldwide for evaluation of the nutritive value of a forage. However, ADFom content is overestimated by the existence of pectin in some forage. To solve this problem, we developed new method (continuous method) to determine aNDFom, ADFom (n-ADFom) and ADL content. The samples of Orchard grass mixed hay (OG), alfalfa hay (ALF), alfalfa hay cube (Cube), a grass silage (GS), a corn silage (CS), a sorghum silage (SORS), forage paddy rice silage (RWCS) and a barley whole crop (BWC) was examined in this study. The differences analytical amount of aNDFom and ADL contents between conventional and the continuous method were -1.5–1.3 percent point (%P) and -0.2–0.1 %P, respectively. Thus aNDFom and ADL contents by continuous method were mostly equal to that by onventional method.

The n-ADFom content showed lower than the ADFom content by conventional method in all forage. The differences between ADFom and n-ADFom were 7.4 %P in Cube and RWCS, and 2.2–4.0 %P in other forage. It is thought that the pectin in forage contributes to the generation of substance that is difficult to filter at the heating treatment process by the acid detergent solution. ADFom will be estimated excessively. This will be also to underestimate the nutritious value of the feed.

From the point of view that shares total fiber into digestible and indigestible fiber in forage, it is theoretically appropriate to separate aNDFom to n-ADFom and hemicellulose. It is considered that n-ADFom can be an effective index for the evaluation of the digestibility and the nutritive value of forage.

Key words: detergent analysis, aNDFom, n-ADFom, ADL, continuous method

砂耕培養液中の窒素源の形態がエリアンサス (*Erianthus arundinaceus*) の生育に及ぼす影響

高溝正・安藤象太郎¹・小林真

農研機構畜産研究部門 飼料作物研究領域, 那須塩原市, 329-2793

¹国際農林水産業研究センター熱帯島嶼研究拠点, 石垣市, 907-0002

要 約

培養液中の窒素源の形態 (NH_4 , NH_4+NO_3 , および NO_3) がエリアンサス (*Erianthus arundinaceus*) の生育に及ぼす影響を調べるため, JW4 および JW630 を用いて培養液中の窒素濃度を 140ppm, pH を 5.5 とした砂耕実験を行った。両系統とも, 地上部と根の乾物重が最大になったのは窒素源として NH_4+NO_3 を与えた場合であったが, NH_4+NO_3 区における生育促進の程度は JW630 の方が JW4 よりも顕著であった。両系統とも, NH_4 区では葉焼けが発生し, 一方 NO_3 区では葉色が薄くなったが, 葉および根の全窒素濃度に及ぼす窒素源の影響はみられなかった。地上部, 根ともにいずれの系統でも $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度は NO_3 区, NH_4+NO_3 区, NH_4 区の順に高く, また JW4 の方が JW630 よりも高かった。JW4 の NO_3 区の地上部 $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度が最も高く 0.25% にまで達したが, NH_4 区では系統や部位に係らず殆ど蓄積がみられなかった。 NH_4+NO_3 区の地上部の $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度は, JW4 では NO_3 区の約 1/4 に, JW630 では約 1/10 に低下したが, 根ではそれぞれ約半分, 約 1/10 に減少した。以上のことから, エリアンサスの生育初期 4 か月間に最も適した窒素源は NH_4+NO_3 であり, NO_3 のみを与えると体内に $\text{NO}_3\text{-N}$ を高濃度に蓄積することが明らかとなった。

キーワード: エリアンサス, *Erianthus arundinaceus*, 窒素源, 砂耕, 硝酸態窒素

緒 言

エリアンサス (*Erianthus arundinaceus*) はサトウキビの近縁植物で, サトウキビに深根性や耐干性等のストレス耐性に関する形質を導入するための遺伝資源として, 我が国や東南アジアにおいて調査・収集がなされている^{6,11,14,19}。さらに, イネ科 C_4 植物で生産力が高いことから近年はバイオマス資源作物としても注目されており, 品種として「JES1」が最近育成された¹²。

バイオマス資源作物に限らず, 作物の収量を最大化するには施用する窒素源の選択が重要である。畑地に施用されたアンモニア態窒素 ($\text{NH}_4\text{-N}$) は硝酸化成菌により硝酸態窒素 ($\text{NO}_3\text{-N}$) に変換されるので, 一般に畑作物

の多くは $\text{NO}_3\text{-N}$ を主たる窒素栄養として土壤から吸収・同化する。しかしながら, 低温時や土壤深く施肥された $\text{NH}_4\text{-N}$ は硝酸化成の影響を受けにくいことや, 硝酸化成を抑制する成分が含まれた肥料も利用される場合があることから, 土壤中で両者が混在した状態にあることも考えられる。また, 最近の研究でエリアンサスの根の皮層には一般の畑作物ではみられない通気組織とみられる空隙が形成されているなど, ユニークな根の特性を持つことが知られている¹⁵。通気組織は一般に湛水条件や低酸素条件で形成されることが知られているが, 窒素欠乏によっても誘導される。このような観点から, 栽培化の浅いエリアンサスが如何なる窒素源を与えた場合に最も生育が良いか検討するのは意義深いことと考えられ

る。そこで本研究では、砂耕栽培により培養液中の窒素源がエリアンサスの生育および植物体の窒素成分に及ぼす影響を調べた。

材料および方法

実験には2つのエリアンサス栄養繁殖系統, JW4 (JP168053) および JW630 (JP173957) を供試した。JW4⁶⁾ は沖縄県, JW630¹⁴⁾ は静岡県で収集された我が国自生のエリアンサス系統であり, 前者は *Ripidium kanashiroi*, 後者は *Cortaderia argenticola* (パンパスグラスの類) として当該文献に記録され, 前者は *Erianthus* 属 (種は未同定), 後者は *Saccharum spontaneum* として農業生物資源ジーンバンクに登録されている。収集当時はエリアンサス属に関する知見が少なく, DNA解析による分類手法もなかったが, その後の Tsuruta らによる *Saccharum* 属と *Erianthus arundinaceus* の AFLP 解析の結果²³⁾ と, Amalraj らによる形態特性の比較の結果¹⁾ から, 両者ともに *Erianthus arundinaceus* だと考えられる。

実験は自然光のガラス室内で行い, 温度条件は外気追従としたが, 夏季には日中の温度が 40℃ 近くまで達した。培養液中の窒素源は NH_4 , NH_4+NO_3 , および NO_3 の3種類とし, NH_4 源として硫酸アンモニウム, NO_3 源として硝酸ナトリウムを用いた²²⁾。施用濃度は窒素として 140ppm (NH_4+NO_3 区では NH_4 と NO_3 をそれぞれ 70ppm ずつ), pH は 5.5 とした。2011年5月13日に石英砂を詰めた 1/5000a ワグナーポットに1ポット当たり1個体の株分け苗 (草丈約 10~15cm) を 10cm の高さで葉を切りそろえて移植した。なお分けつ数は 1~2本であった。反復数は 3として5月20日まで水道水をかけ流しで与えた。

5月20日より 10L の培養液が入った 1/2000a ワグナーポットから 1日2回, 人力による下底灌漑²⁰⁾ を行った。培養液は窒素の他に水 1L 当たり P:31, K:78, Ca:80, Mg:24, Fe:3, B:0.5, Mn:0.5, Cu:0.02, Zn:0.05, Mo:0.01mg を加えて調製した。培養液の減少した水分は 10L になるように適宜補給, pH は毎日調節し, 7日ごとに培養液を更新した。8月9日に培養液を交換した後, 3日後と6日後に NH_4+NO_3 区の培養液中の $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度と $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度をそれぞれ, 簡易型イオンメータとネスラー法により測定した。

7月29日に草丈を測定後, 地上部 (新植地上部) を地際から 3cm のところで刈り取り収穫した。8月11日には再生してきた地上部 (再生地上部) 葉身の中央部分

の SPAD (葉緑素含量の指標値) を測定し, 9月3日に再生地上部と根を収穫した。7月29日に収穫した植物体と, 9月3日に収穫した地上部と根を 70℃ で通風乾燥した。乾燥した植物体は乾物重を測定後, 粉碎して分析に用いた。7月29日に収穫した植物体は植物体の全窒素含量をケルダール法によって測定し, さらに乾燥試料 40mg を 40mL の純水で 20分間振とうした抽出液の $\text{NO}_3\text{-N}$ をイオンクロマトグラフによって測定した。9月3日に収穫した植物体は, 根のみ全窒素含量と $\text{NO}_3\text{-N}$ を同様に測定した。

供試した株分け苗の大きさにより 3ブロックを設定し, 系統と窒素源の 2因子の乱塊法によりデータを解析した。系統間, 処理区の平均値の比較は Tukey 法 (5%, 1% レベル) で行った。

結 果

砂耕培養液の pH は, 生育初期にはいずれの窒素源区でも作成直後の 5.5 から 6.0 近くまで上昇したが, 生育が進むにつれ, NH_4 区と NH_4+NO_3 区では 1日で 4.0 付近まで低下, NO_3 区では 6.5 付近まで上昇した。

表 1 に, 分散分析の結果を示す。草丈を除く乾物重等の形質に窒素源の処理効果が 1% レベルで有意であった。また, 再生地上部乾物重と SPAD では窒素源と系統間の交互作用が 5% レベルでみられた。一方, 体内の窒素成分については, $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度について窒素源の影響が 1% レベルで, また地上部の $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度については系統間差も 5% レベルで有意にみられたが, いずれも交互作用はみられなかった。体内の全窒素濃度については窒素源, 系統ともに影響がみられなかった。

地上部の草丈は, JW4 の方が JW630 よりも大きかったが (表 2), 乾物重については新植, 再生地上部乾物重のいずれも JW630 の方が JW4 よりも大きかった (表 3, 4)。両系統とも新植, 再生地上部乾物重のいずれも NH_4+NO_3 区が有意に最大となったが, NH_4 区と NO_3 区の間には差はみられなかった。一方, 根の乾物重は, 両系統とも地上部乾物重同様に NH_4+NO_3 区で最も高かったが, NH_4 区は NO_3 区に比べて有意に低かった (表 5)。 NH_4+NO_3 区における生育促進の程度は JW630 の方が JW4 よりも大きい傾向があった。

両系統とも, NH_4 区では葉焼けを生じた個体が発生したため SPAD 測定の際にはそれらを除外した。2系統のいずれにおいても NO_3 区における SPAD 値は他の処理区よりも有意に低く, 葉の退色がみられた (表 6)。地上部と根の全窒素濃度は両系統とも, すべての区間

Table 1. Results of analysis of variance for measures of growth and N content in tissue of two *Erianthus arundinaceus* genotypes (JW4, JW630) supplied with nitrogen in three forms (NH₄, NH₄+NO₃, NO₃).

Form of variation	df	Shoot length	Shoot dry weight of first growth	Shoot dry weight of regrowth after first harvest	Root dry weight	SPAD	Total N % in shoot	Total N % in root	Total NO ₃ -N % in shoot	Total NO ₃ -N % in root
Genotypes	1	*	**	**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.
N forms	2	n.s.	**	**	**	**	n.s.	n.s.	**	**
block	2	n.s.	**	n.s.	**	**	n.s.	**	n.s.	n.s.
G × N	2	n.s.	n.s.	*	n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

* $P \leq 0.05$, ** $P < 0.01$, n.s. $P > 0.05$

SPAD: Soil-Plant Analyses Development (chlorophyll content of leaves)

Table 2. Effect of N form on shoot length (cm) of the first harvest of two genotypes (JW4, JW630) of *Erianthus arundinaceus* grown in sand culture.

Genotype	Nitrogen form			Average
	NH ₄	NH ₄ +NO ₃	NO ₃	
JW4	91.3	94.0	88.7	91.3 w
JW630	88.7	81.7	80.7	83.7 x
Average	90.0	87.5	84.7	

Values followed by different letters within a column or row differ significantly ($P \leq 0.05$) by Tukey's multiple comparison test.Table 3. Effect of N form on shoot dry weight (g) of the first harvest of two genotypes (JW4, JW630) of *Erianthus arundinaceus* grown in sand culture.

Genotype	Nitrogen form			Average
	NH ₄	NH ₄ +NO ₃	NO ₃	
JW4	20.7	34.3	26.4	27.1 w
JW630	28.9	55.7	30.3	38.3 x
Average	24.8 b	45.0 a	28.4 b	

Values followed by different letters within a column or row differ significantly ($P \leq 0.05$) by Tukey's multiple comparison test.Table 4. Effect of N form on dry weight (g) of shoot second harvest (regrowth after the first harvest) of two genotypes (JW4, JW630) of *Erianthus arundinaceus*.

Genotype	Nitrogen form			Average
	NH ₄	NH ₄ +NO ₃	NO ₃	
JW4	0.70	1.48	1.33	1.17 w
JW630	1.24	3.62	1.89	2.25 x
Average	0.97 b	2.55 a	1.62 b	

Interaction between genotype and N form significant at $P \leq 0.05$.Values followed by different letters within a column or row differ significantly ($P \leq 0.05$) by Tukey's multiple comparison test.

Table 5. Effect of N form on root dry weight (g) of two genotypes (JW4, JW630) of *Erianthus arundinaceus*.

Genotype	Nitrogen form			Average
	NH ₄	NH ₄ +NO ₃	NO ₃	
JW4	4.3	8.9	6.3	6.4 w
JW630	4.2	11.5	6.4	7.4 x
Average	4.2 c	10.2 a	6.4 b	

Values followed by different letters within a column or row differ significantly ($P \leq 0.05$) by Tukey's multiple comparison test.

Table 6. Effect of N form on leaf SPAD readings (index of chlorophyll content) of two genotypes (JW4, JW630) of *Erianthus arundinaceus* (foliage regrown after the first harvest).

Genotype	Nitrogen form			Average
	NH ₄	NH ₄ +NO ₃	NO ₃	
JW4	43.2	42.2	35.6	40.4
JW630	43.7	44.9	32.6	40.4
Average	43.5 a	43.6 a	34.1 b	

Interaction between genotype and N form significant at $P \leq 0.05$.

Values followed by different letters within a column or row differ significantly ($P \leq 0.05$) by Tukey's multiple comparison test.

Table 7. Effect of N form on NO₃-N level (%) in first harvest shoots of two genotypes (JW4, JW630) of *Erianthus arundinaceus*.

Genotype	Nitrogen form			Average
	NH ₄	NH ₄ +NO ₃	NO ₃	
JW4	0.005	0.061	0.253	0.107 w
JW630	0.005	0.017	0.169	0.063 x
Average	0.005 b	0.039 b	0.211 a	

Values followed by different letters within a column or row differ significantly ($P \leq 0.05$) by Tukey's multiple comparison test.

Table 8. Effect of N form on root NO₃-N level (%) in two genotypes (JW4, JW630) of *Erianthus arundinaceus*.

Genotype	Nitrogen form			Average
	NH ₄	NH ₄ +NO ₃	NO ₃	
JW4	0.004	0.109	0.231	0.115
JW630	0.006	0.020	0.186	0.071
Average	0.005 b	0.065 b	0.209 a	

Values followed by different letters within a column or row differ significantly ($P \leq 0.05$) by Tukey's multiple comparison test.

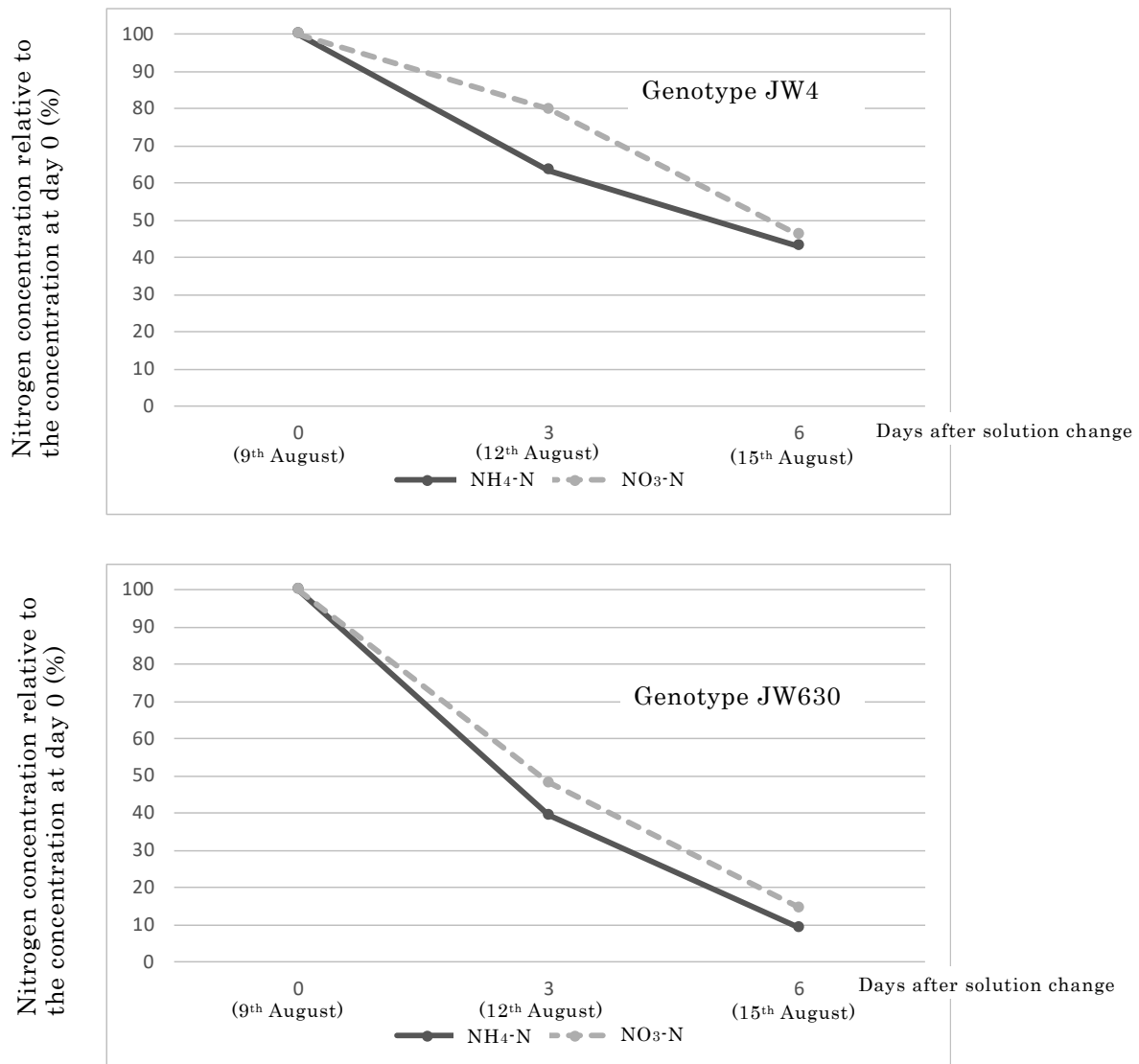


Figure 1. Change in N concentration in nutrient solution over time for two genotypes of *Erianthus arundinaceus* in a sand culture experiment. Inferred cause of diminishing N content is plant root uptake.

で有意差はみられず、それぞれ 2.15 ~ 2.30%, 1.31 ~ 1.44% の範囲の値を示した。

新植地上部、根ともにいずれの系統でも NO₃-N 濃度は NO₃, NH₄+NO₃, NH₄ 区の順に高かったが (表 7, 8), NH₄ 区では殆ど蓄積がみられなかった。新植地上部では JW4 の方が JW630 よりも NO₃-N 濃度が高く、JW4 の NO₃ 区の NO₃-N 濃度は 0.25% に達した。NH₄+NO₃ 区の新植地上部の濃度は、JW4 では NO₃ 区の約 1/4 に、JW630 では約 1/10 に減少したが、根ではそれぞれ約半分、約 1/10 に減少した。NH₄+NO₃ 区における生育に伴う培養液中の両窒素源の吸収量を比べると、JW4 では始めに NH₄-N をより多く吸収する傾向があったが、最終的には両系統とも NH₄-N と NO₃-N の双方がほぼ

同程度吸収されていた (図 1)。

考 察

本実験では新植地上部乾物重、再生地上部乾物重、および根の乾物重は窒素源として NH₄-N あるいは NO₃-N を単独で与えるよりも両者を併用した場合に最も大きくなった。一方、草丈に関しては窒素源の効果は有意でなかった。これは、収量 (乾物重) を構成している要素としては、草丈だけでなく茎 (分けつ) 数、葉や茎の密度、茎が中空であるか否か等様々な因子が関与しているためと思われる。

畑土壌に施用された NH₄-N 肥料は硝酸化成菌の働き

により $\text{NO}_3\text{-N}$ に変換される。従って一般に畑作物は窒素を主として $\text{NO}_3\text{-N}$ の形態で吸収していると考えられるが、イネやチャのように $\text{NO}_3\text{-N}$ よりも $\text{NH}_4\text{-N}$ を与えた方が高い収量を得られる作物もある²¹⁾。また、多くの作物で窒素源として $\text{NO}_3\text{-N}$ のみではなく $\text{NH}_4\text{-N}$ も加えた場合に生育がよくなることも知られている^{3,5)}。本研究における培養液中の両窒素形態の吸収についてみると、系統により若干の差はあるものの、最終的に $\text{NH}_4\text{-N}$ と $\text{NO}_3\text{-N}$ のいずれも同程度吸収されており、エリアンサスは両窒素形態ともほぼ同様に吸収・同化できるものと考えられる。

一方、作物の生育に及ぼす窒素源の影響は窒素源そのものではなく、窒素吸収、とりわけ $\text{NH}_4\text{-N}$ の吸収による根圏 pH の大幅な低下が原因であるという説もある。即ち、森次ら¹⁰⁾は従来 NH_4 区での生育が不良とされていたキュウリに、培養液の pH を厳密に制御できる自動 pH 調整水耕栽培装置により低濃度の $\text{NH}_4\text{-N}$ を間断なく与えることにより、 NH_4 区においても NO_3 区と同様に生育させることに成功した。本研究において、 NH_4 区と NH_4+NO_3 区における培養液の pH は前日に 5.5 に調整しても翌日の調整時には 4 付近まで低下したので、 NH_4 区における生育低下が $\text{NH}_4\text{-N}$ そのものによるのではなく pH の低下による可能性も否定できない。しかしながら、同様に pH が低下した NH_4+NO_3 区の生育が旺盛だったことは、 $\text{NH}_4\text{-N}$ と $\text{NO}_3\text{-N}$ の両方を与えることによる何らかの相乗効果を示している。

即ち、 NH_4+NO_3 区の体内の $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度についてみると、 NO_3 区の半分の濃度の NO_3 を施用しているにもかかわらず、地上部、根ともに大幅に低下しているので、 NH_4 と NO_3 を併せて施用することにより、 $\text{NO}_3\text{-N}$ の同化が順調に進んだ可能性が考えられる。その傾向は JW630 でより顕著であり、 NH_4+NO_3 区の $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度が地上部、根のいずれにおいても JW4 の 18 ~ 28% に低下した結果、地上部乾物重が JW4 より大きくなった可能性が示唆される。再生地上部乾物重ではさらにその傾向が進み、窒素源と系統間に交互作用が生じたものと考えられる。再生地上部の SPAD 値においても同様に交互作用が認められていることがこれを裏付ける。

なお、作物に $\text{NH}_4\text{-N}$ のみを高濃度で与えると、アンモニア障害が発生することが知られ⁴⁾、本実験の NH_4 区でみられた葉焼けはアンモニア障害によるものと考えられる。また、植物によっては $\text{NO}_3\text{-N}$ のみを与えて培地の pH が上昇したため鉄欠乏によるクロロシスが発生する事例が知られ¹⁶⁾、本実験の NO_3 区における葉色の退色もこれを示唆する。これらのことから NH_4+NO_3

区の優位性が支持される。

植物が吸収した $\text{NO}_3\text{-N}$ は硝酸還元酵素により $\text{NO}_2\text{-N}$ (亜硝酸) を経て最終的に $\text{NH}_4\text{-N}$ まで還元されたのち、グルタミンやアスパラギンなどのアミノ酸を経てタンパク質に同化される。硝酸還元酵素の活性は種や系統により大きく異なることが知られ、自然状態での土壤中の $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度が植物種の分布に影響を与えることが知られている⁸⁾。本実験でみられた採集地の異なる両系統の $\text{NO}_3\text{-N}$ に対する反応の差異も、自生地の土壤の窒素栄養状態を反映しているのかもしれない。

サトウキビ、サツマイモ、パイナップル、熱帯牧草ブラキアリア等では植物内生菌による窒素固定が知られ、窒素施肥の節約の観点から研究が進んでいる²⁾。できるだけ肥料を投入せずにバイオマス資源作物の収量を確保するという意義から、サトウキビに近縁のエリアンサスでも今後微生物による窒素固定について研究する必要がある。またブラキアリアでは、窒素固定のみならず根からの分泌物が土壤中の硝酸化成を抑制するという報告もある¹⁷⁾。今後は窒素栄養に関する有用形質を持つこれら作物の遺伝子情報をエリアンサスのゲノム育種に活用することで窒素固定と窒素栄養環境の改善が実現可能なエリアンサスの育成が望まれる。

Ishikawa ら⁷⁾は、窒素施肥量がエリアンサス系統「IJ76-349」とサトウキビの生育および体内 $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度に及ぼす影響を調べた結果、窒素多施用区 ($60\text{g}/\text{m}^2$) でもサトウキビは $\text{NO}_3\text{-N}$ を高濃度に蓄積しない (0.01%) のに対し、エリアンサスでは 0.3% と高濃度の $\text{NO}_3\text{-N}$ が蓄積することを見出している。また、Robinson ら¹³⁾はサトウキビ 3 遺伝子型、ワセオバナ 3 遺伝子型、サトウキビとエリアンサスの雑種第 3 世代 3 遺伝子型、およびエリアンサス (*E. procerus*, *E. arundinaceus* 2 遺伝子型) の合計 12 遺伝子型を用いた類似の実験を行い、地上部の $\text{NO}_3\text{-N}$ の蓄積はエリアンサスのみで顕著 (約 0.37%) であり、サトウキビが土壤中の多量の $\text{NO}_3\text{-N}$ を吸収・蓄積しないという性質は、多施肥条件下において土壤中の $\text{NO}_3\text{-N}$ が流亡して地下水を汚染するおそれがあるので問題だとしている。この観点から、家畜糞尿を圃場に多量に還元するような栽培体系では、エリアンサスはサトウキビと異なり $\text{NO}_3\text{-N}$ を体内に多量に貯蔵できるので、地下水汚染を防ぐ意味から望ましいと考えられる。

一方、飼料作物中の高濃度の $\text{NO}_3\text{-N}$ は、それを摂取した家畜の健康被害につながることが知られている¹⁸⁾。もしエリアンサスを窒素多肥条件下で飼料利用するならば、体内の硝酸態窒素濃度が高まり過ぎないように注意が

必要である。

エリアンサスは圃場では定植後約3年間収量が増加し、以後は定常状態になる⁹⁾。また、長期間栽培した場合の窒素源の違いによる生育や収量についてはさらなる検討が必要であるものの、本研究の結果から生育初期4か月間において最も適した窒素源は NH_4+NO_3 であり、この知見はエリアンサスの苗生産の効率化に資する。また NO_3 のみを与えると体内に $\text{NO}_3\text{-N}$ を高濃度に蓄積することが明らかとなった。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、貴重な御助言、御助力を頂いた川地太兵、須永義人両上級研究員に厚くお礼申し上げます。

引用文献

- Amalraj, V.A. and Balasundaram, N. (2006). On the taxonomy of the members of 'Saccharum Complex', Genet. Resour. Crop Evol., 53, 35–41.
- 安藤象太郎・大脇良成・後藤匡裕・米山忠克 (2005). エンドファイテック窒素固定, 化学と生物, 43(12), 788–794.
- Cox, W.J. and Reisenauer, H.M. (1973). Growth and ion uptake by wheat supplied nitrogen as nitrate, or ammonium, or both, Plant Soil, 38, 363–380.
- Esteban, R., Ariz, I., Cruz, C. and Moran, JF. (2016). Mechanisms of ammonium toxicity and the quest for tolerance, Plant Sci., 248, 91–101.
- 池田英男・大沢孝也 (1979). 施用窒素形態とそ菜の適応性 (第1報) 水耕栽培において硝酸、アンモニア、亜硝酸を窒素源とした果菜の生育並びに窒素同化, 園学雑, 47, 454–462.
- 伊禮信・福原誠司・寺島義文・境垣内岳雄・松岡誠・杉本明 (2008). 沖縄本島地域におけるエリアンサス属植物 (*Erianthus* spp.) の探索と収集, 植探報, 24, 47–53.
- Ishikawa, S., Ando, S., Sakaigaichi, T., Terajima, Y. and Matsuoka, M. (2009). Effects of high nitrogen application on the dry matter yield, nitrogen content and nitrate-N concentration of sugarcane, Soil Sci. Plant Nutr., 55, 485–495.
- 小山里奈 (2004). 樹木-土壌系の窒素循環 - 樹木による土壌中の窒素の吸収と同化 -, 地球環境, 9, 11–18.
- 松波寿弥・小林真・安藤象太郎・寺島義文・霍田真一・佐藤広子 (2016). 栽植密度および施肥水準がエリアンサス (*Erianthus arundinaceus* (L.) Beauv.) の乾物収量に及ぼす影響, 日草誌, 61, 224–233.
- 森次益三・河崎利夫 (1977). 自動 pH 調整水耕栽培装置の製作 - 自動制御水耕栽培装置の応用 (その1) -, 日土肥誌, 48, 243–247.
- 永富成紀・大城良計・仲宗根盛徳 (1984). 南西諸島におけるサトウキビ遺伝質の探索, 沖縄県農業試験場研究報告, 9, 1–27.
- 農林水産省食料産業局知的財産課 (2016). 農林水産省品種登録ホームページ, <http://www.hinsyu.maff.go.jp/> [2016年12月7日参照]
- Robinson, N., Brackin, R., Vinall, K., Soper, F., Holst, J., Gamage, H., Paungfoo-Lonhienne, C., Rennenberg, H., Lakshmanan, P. and Schmidt, S. (2011). Nitrate paradigm does not hold up for sugarcane, PLoS ONE, 6, e19045. doi:10.1371/journal.pone.0019045
- 生物研・放育場・照射法研 (1987). II 国内収集における現地記録表3. 雑穀・特用作物, 植探報, 昭和61年度, 90
- 関谷信人・塩津文隆・阿部淳・森田茂紀 (2015). 原料作物のエリアンサスとネピアグラスの根, 根の研究, 24, 11–22.
- Smolders, AJP., Hendriks, RJJ., Campschreur, HM., Roelofs. and JGM. (1997). Nitrate induced iron deficiency chlorosis in *Juncus acutiflorus*, Plant Soil, 196, 37–45.
- Subbarao, GV., Nakahara, K., Hurtado, MP., Ono, H., Moreta, DE., Salcedo, AF., Yoshihashi, AT., Ishikawa, T., Ishitani, M. and Ohnishi-Kameyama, M. (2009). Evidence for biological nitrification inhibition in *Brachiaria* pastures, PNAS, 106, 17302–17307.
- 須永義人 (2009). 硝酸態窒素, 粗飼料の品質評価ガイドブック (自給飼料利用研究会編), 三訂版, 日本草地畜産種子協会, 東京, 123–124.
- 田金秀一郎・杉本明・寺島義文・江川宜伸・伊敷弘俊・佐藤光徳・伊禮信・Werapon Ponragdee・Taksina Sansayawichai・Amarawan Tippayawat (2010). タイ国で収集したエリアンサス属植物遺伝資源の特性評価と分類, 国際農林水産業研究成果情報, 18,

39-40

- 20) 高橋保夫 (1956). 下底灌漑法, 作物試験法 (戸莉義次 [ほか] 編集), 農業技術協会, 東京, 180-181.
- 21) 高橋英一 (1984). 好アンモニア性と好硝酸性, 施肥農業の基礎, 養賢堂, 東京, 68-73.
- 22) 高溝正・杉山信男 (1990). 施用窒素形態がブルーベリーの生育並びに葉中窒素成分濃度に及ぼす影響, 園学雑, 58, 865-869.
- 23) Tsuruta, S., Ebina, M., Kobayashi, M., Hattori, T. and Terauchi, T. (2012). Analysis of genetic diversity in the bioenergy plant *Erianthus arundinaceus* (Poaceae: Andropogoneae) using amplified fragment length polymorphism markers, Grassl. Sci., 58, 174-177.

Growth Response of *Erianthus arundinaceus* Grown in Sand Culture to the Form of N Supplied in Nutrient Solution

Tadashi TAKAMIZO, Shotaro ANDO¹ and Makoto KOBAYASHI

Division of Forage Crop Research,
Institute of Livestock and Grassland Science, NARO,
Nasushiobara, 329-2793 Japan

¹Japan International Research Center for Agricultural Science,
Tropical Agriculture Research Front,
Ishigaki, 907-0002 Japan

Summary

We investigated the effect of nitrogen (N) form (NH_4 , NH_4+NO_3 , and NO_3) on the growth of *Erianthus arundinaceus* in a sand culture experiment with nutrient solution containing 140 ppm N at a pH of 5.5. For the experiment, two genotypes of *E. arundinaceus*, JW4 and JW630, were obtained from the NIAS gene bank. The dry weights of shoots and roots of both genotypes were highest when N was supplied as NH_4+NO_3 , but the difference in growth between plants grown with NH_4+NO_3 and those with NH_4 or NO_3 was greater for JW630 than for JW4. Plants supplied with NH_4 alone had scorched leaves and those supplied with NO_3 alone had pale colored leaves, but N form did not significantly affect the total N concentration of either shoots or roots of both genotypes. The NO_3 -N concentration of shoots and roots was highest in the NO_3 treatment and higher in JW4 than in JW630. The NO_3 -N concentration of shoots of JW4 supplied with NO_3 alone was 0.25% g^{-1} dry weight, but only a trace of NO_3 -N was present in shoots and roots of both genotypes when supplied with NH_4 alone. The NO_3 -N concentration of both shoots and roots in plants supplied with NH_4+NO_3 was a fraction of that found in plants supplied with NO_3 alone. In conclusion, the results suggest that the best form for supplying N to *Erianthus arundinaceus* during the initial 4 months of growth is NH_4+NO_3 , and that a high level of NO_3 will accumulate in plant tissue if NO_3 alone is applied.

Key words: *Erianthus arundinaceus*, N form, sand culture, nitrate

© 2017 Institute of Livestock and Grassland Science, NARO

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced without the permission of the copyright holder.

Published by Institute of Livestock and Grassland Science,
National Agriculture and Food Research Organization (NARO)
Ikenodai 2, Tsukuba, Ibaraki 305-0901 Japan

編集委員会事務局

企画管理部企画連携室

渡邊伸也

森岡理紀

飛鳥井可奈子

那須企画管理室企画連携チーム

和田努

本研究報告から転載，複製を行う場合は，農研機構畜産研部門の許可を得てください。

※農研機構は，国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構のコミュニケーションネーム（略称）です。

平成 29 年 3 月 印刷

平成 29 年 3 月 発行

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 畜産研究部門

〒305-0901 茨城県つくば市池の台2

TEL 029-838-8600(代)

FAX 029-838-8606

印刷所 筑波印刷情報サービスセンター協同組合

(目的)

第1条 農研機構研究報告 畜産研究部門及び畜産研究部門研究資料への投稿については、刊行物著作権取扱規程（14規程第56号）に定めるもののほか、この要領の定めるところによる。

(投稿者の資格)

第2条 投稿者は、農研機構職員（以下「職員」という。）、流動研究員、依頼研究員、日本学術振興会特別研究員及び日本学術振興会外国人特別研究員（以下「他の研究員」という。）等とする。

- 一 職員が投稿する内容は、主として畜産研究部門（以下「部門」という。）で行った研究とする。
- 二 他の研究員等が投稿する内容は、部門で行った研究とする。

(投稿原稿の内容)

第3条 投稿原稿の内容は、次のとおりとする。

- 1 農研機構研究報告 畜産研究部門 (Bulletin of the NARO, Livestock and Grassland Science / 略誌名：(和文) 農研機構報告 畜産部門 (英文) Bull. NARO, Livest. & Grassl. Sci.)
 - 一 原著論文：部門において行った試験研究及び部門以外の者に委託して行った試験研究の成果に関わる論文とする。
 - 二 短報：一以外の研究の予報、速報などの短報とする。
 - 三 技術論文：新しい技術や技術の組立、実証などを主体とする報告。
 - 四 総説：畜産草地研究に関わるものとする。総説は投稿のほか、編集委員会が依頼したものを含む。
 - 五 学位取得論文：部門において主として行った試験研究による学位取得論文とする。
- 2 畜産研究部門研究資料 (Memoirs of Institute of Livestock and Grassland Science, NARO / 略誌名：(和文) 畜産部門研資 (英文) Mem. Inst. Livest. Grassl. Sci., NARO)

調査資料・技術資料・研究資料：部門において行った試験研究及び部門が部門以外の者に委託して行った試験研究のうち、学術的・産業的に有用な未発表の資料とする。

(原稿の執筆)

第4条 原稿の執筆に当たっては、別に定める農研機構研究報告 畜産研究部門及び畜産研究部門研究資料執筆要領（13畜草B第44号）に基づくものとする。使用する言語は日本語又は英語とする。

(原稿の提出)

第5条 次の手続により原稿及び原稿提出票を事務局に提出する。

- 一 職員は、原稿提出票に必要事項を記載し、所属研究領域長等の校閲を受ける。
- 二 他の研究員等は、原稿提出票に必要事項を記載し、所属研究領域長等の校閲を受ける。

(受付)

第6条 受付日は、原稿及び原稿提出票を事務局が受取った日とする。受理日は、編集委員会の審査の結果、掲載が妥当と認められた日とする。

(審査)

第7条 編集委員会は、次の手続により論文を審査する。ただし、学位取得論文については審査を省略することができる。

- 一 編集委員会は、論文の内容により審査員正副をそれぞれ1名決定し、論文審査を依頼する。審査員は、部門内及び部門外の研究者等とし、その氏名は公表しない。
- 二 審査員は、論文審査票により審査を行う。また必要に応じて指摘事項を書出し提出する。
- 三 事務局は、審査員と著者の間のやり取りの対応に当たる。
- 四 編集委員会は、審査員の審査結果を参考にして掲載の可否を判断する。

審査の内容によっては、著者に原稿の訂正を求めることができる。
- 五 著者は、審査結果を受領後、編集委員会が指定する期日までに修正原稿を事務局に提出する。

(校正)

第8条 著者による校正は原則として初校のみとする。校正は、誤植の訂正程度にとどめる。なお、やむを得ず大きな変更等を行う場合には、編集委員会の承認を得なければならない。

附 則

この規定は、平成14年4月1日から施行する。

附 則

この規定は、平成15年10月1日から施行する。

附 則

この規定は、平成18年4月1日から施行する。

附 則

この要領は、平成20年4月1日から施行する。

附 則

この要領は、平成23年4月1日から施行する。

附 則

この要領は、平成23年8月8日から施行する。

附 則

この要領は、平成27年4月1日から施行する。

附 則

この要領は、平成28年4月1日から施行する。

附 則

この要領は、平成29年3月14日から施行する。

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構
畜産研究部門

Institute of Livestock and Grassland Science,
National Agriculture and Food Research Organization (NARO)