

## II. 研究

### 1. 主な研究内容の紹介

#### (1) 湯浅農場

##### 1) マンゴーに関する研究

###### i) 台木の育成

担当：志水恒介

効率的な苗木生産技術の確立のために、土壌容積や温度処理が実生台木の初期生育に及ぼす影響を検討した。

###### ① 土壌容量の影響

台湾在来種の‘柴芒果’、‘香芒果’を用いて行った。2008年6月に両品種を播種し、発芽1か月後の7月に、4種の異なる容器に移植した。容量と形状の異なるポットを用い、山土のみを用いたA区、山土と堆肥を2：1の割合で混合したB区、B区に籾殻くん炭を10%混合したC区を設けた。移植後1か月ごとの生長を測定した。

その結果、全ての区において気温の低下する冬季は生育が抑制されたが、気温が上昇する5月から7月にかけて生長が促進された。栽培容器と土壌の種類による生育の差は見られなかったが、C区において、黒ビニルと黒ビニルロングの容器では生長が抑制された。‘柴芒果’が‘香芒果’に比べ若干生育が良かった。

###### ② 温度処理の影響

2008年8月から‘柴芒果’の実生苗を移植し、最低温度が17℃、12℃、5℃となるよう設定したハウス内で管理し、1か月ごとに伸長長と茎径を調査した。

その結果、17℃区と12℃区では冬季においても成長したが、5℃区ではほとんど成長が見られなかった。17℃区は特に優れた生長を示した。

以上の結果から、栽培容器と土壌は台木の生育に大きな影響を与えないが、冬季の加温は生育促進に有効であることが示唆された。

###### ii) 取り木繁殖法の開発

担当：文室政彦

マンゴー苗の育苗期間の短縮と自根苗によるポット栽培の可能性を検討するため、平成19年より取り木繁殖法の開発を検討してきたが、発根量を確保するために、‘愛紅’を供試し、カットバック処理の影響、発根培地の影響を検討した。さらに、取り木発根に及ぼす品種間差異を検討した。

###### ① カットバック処理の影響

せん定時に主枝までカットバックすると主枝より強い新梢が発生することから、これを材料にして取り木を行った。

その結果、発根率および発根量は慣行のせん定樹を材料とした場合と差異がなかった。

###### ② 発根培地の影響

取り木時に発根培地としてバーミキュライトを使用しているが、その水分含量として、20%区、30%区、40%区を設け、発根率および発根量を検討した。

その結果、20～40%の範囲では発根率および発根量とも差異がなかった。

###### ③ 品種間差異の影響

材料は小型プラスチックハウスに植栽された14品種のポット植え4年生樹と大型プラスチックハウ



写真 マンゴーの取り木

スに植栽されたポット植え‘アーウィン’と‘愛紅’を供試した。

その結果、‘スプリット’が最も発根率が高く、次いで‘愛紅’、‘アーウィン’、‘グレン’であった。‘センセーション’、‘ゴールデンリペンス’、‘ドット’、‘リペンス’、‘トミーアトキンス’、‘パレンシャブライド’、‘フロリジェン’は発根率が低く、‘エドワード’、‘ナムドクマイ’、‘アルフォンソー’、‘フロリゴン’、‘チョサワイ’は発根しなかった。

### iii) 自根苗による果実生産システムの開発

担当：文室政彦

自根苗によるポット栽培システムの開発を目的に、取り木繁殖した‘愛紅’を供試し、土壌容量および培土組成の違いが樹体の生育に及ぼす影響を検討した。

#### ① 土壌容量の影響

2007年9月8日に取り木をして、11月11日に鉢上げした‘愛紅’自根苗を供試した。培土量は15リットル区、30リットル区、45リットル区を設け、大きさの異なる不織布製ポットに2008年8月7日に移植した。

鉢上げ2年後の結果では、樹体生長として、幹径、着葉数、総新梢長とも培土量による有意な差がなかった。

#### ② 土壌組成の影響

2008年5月18日に取り木をして、2008年7月23日に鉢上げをした‘愛紅’自根樹を供試し、2009年5月11日に不織布製ポット（土壌容量20リットル）に移植した。

培土組成としては、山土80：堆肥20区、山土40：パーライト40：堆肥20区、山土40：バーミキュライト40、堆肥20区、山土30：パーライト30：ピートモス30：堆肥20区、山土30：バーミキュライト30：ピートモス30：堆肥20区を設けた。

鉢上げ1年後の結果では、樹体成長は各区とも有意な差がなかった。

#### ③ 自根苗と接ぎ木苗との樹体成長の差異

2007年9月9日に台湾在来種に取り木を行い、発根個体を同年11月12日に鉢上げし、翌2008年6月4日に‘アーウィン’と‘愛紅’を接ぎ木して、同年9月20日に不織布製ポットに定植した。慣行の台湾在来種実生台は2008年6月9日に不織布製ポットに移植し、翌2009年6月15日に‘アーウィン’と‘愛紅’を接ぎ木を行った。

今後、両者の樹体成長と収量および果実品質の差異を検討する。

### iv) ‘愛紅’の栽培特性の解明

担当：文室政彦

#### ① 葉果比の影響

平成20年に不織布製ポット植え‘アーウィン’と‘愛紅’を供試し、葉果比が収量および果実品質に及ぼす影響を検討したが、翌年の収量および果実品質に及ぼす影響についても検討した。

‘アーウィン’は葉果比40、60、80、‘愛紅’では20、40、60に調節した4年生樹を供試し、6月に不着果の‘愛紅’葉果比20区の2樹を除いて、葉果比が60となるように摘果により調節した。

その結果、‘アーウィン’では、樹当たりの花穂数、有種子果穂数と有種子果実数とも各区差異がなく、収量、平均果重および果実品質とも前年の葉果比の影響はなかった。‘愛紅’では、樹当たりの花穂数は有意な差がなかったが、有種子果穂数と有種子果実数は葉果比が低いほど減少した。収量は葉果比20区で減少したが、他の2区では差



写真 ポット植え‘愛紅’

がなかった。平均果重と果実品質は葉果比の影響がなかった。

2年間の調査の結果、好適葉果比は、目標果重により異なるが、おおむね‘アーウィン’では60、‘愛紅’では40程度であると考えられた。

## ②温度と生育との関係

平成20年に取り木繁殖の‘愛紅’自根樹を供試し、5月13日に20℃、25℃、30℃に設定したインキュベーター内にそれぞれ4ポットを搬入し、6月25日に樹体成長を調査した。

その結果、温度が高いほど新梢長は長く、新梢葉数も多く、新梢成長が促進された。

### 2) ドラゴンフルーツに関する研究

担当：文室政彦

#### i) 優良な赤皮赤肉系統の選抜

今後、消費拡大が期待される赤皮赤肉の優良系統を選抜するために、京都市在住の福岡正行氏より分譲いただいたニカラグア原産の3品種（Rosa, Cebra, Orejona）の実生をポット栽培している。

今後、収量と果実品質を調査し、優れた系統を選抜する。



写真 赤皮赤肉系統のドラゴンフルーツ

### 3) カキに関する研究

担当：文室政彦

ポット栽培の‘早秋’を供試して、摘心が収量および果実品質に及ぼす影響、収量および果実品質の年次変化に関して調査を継続している。

## (2) 生石農場

### 1) ミニブタの人為的繁殖統御技術の検討

担当：岸 昌生

ミニブタにおいて人為的な交配技術（人工授精）や発情誘起法が確立すれば計画的交配が可能になり、安定的に個体生産を行うことができる。しかし、ミニブタでは射出精液を人工授精することによって産子は得られているものの、精液の採取法や長期保存法について詳細な検討は行われていない。さらに、ミニブタの人工授精は、家畜豚での機材（精液注入器）を応用しているのみで、小型のミニブタに適した人工授精（精液注入）に関しても詳細な検討は行われていない。本研究では、ミニブタの人工授精に関わる研究として、精液採取、精液保存および精液注入について検討したので報告する。

#### i) 精液採取法の検討

家畜豚では種雄より射出精液を採取する場合、発情期の雌に乗駕した種雄（写真1）が射精している間に精液を横取りする方法（横取り法）が利用されている。しかし、発情期の雌を使用しないで精液採取を実施できれば、いつでも採取が可能であり、非常に作業効率は高くなる。家畜豚では専用の精液採取用台（擬牝台）があり、一般的に利用されている。本検討では、ミニブタ（ゲッチンゲン系）専用の擬牝台を作製し（写真2）、精液採取が可能であるか検討した。

その結果、作製した擬牝台を用いて精液を採取することが可能であった。しかし、実施回数4回に対して採取成功回数は2回であり、本擬牝台による安定的精液採取は難しいと考えられた。擬牝台に発情期雌の尿を塗布すると種雄が擬牝台に乗駕しやすくなることが知られている。また、今回の検討より、擬牝台の上部シートの素材の違いが乗駕に影響する可能性を確認しており（データ非表示）、今後の擬牝台の改良に応用して行く予定である。



写真1 発情期の雌に乗駕中のミニブタ種雄



写真2 擬牝台に乗駕中のミニブタ種雄

## ii) 精液保存法の検討

### (材料および方法)

供試ミニブタは当農場で飼育している種雄用のミニブタ（ゲッチングン系，2および6歳齢）を使用し，精液は横取り法または擬牝台（上記）を用いて，用手法により射出精液をガーゼまたは精液ろ過用紙（富士農場サービス）を装着した35-38℃の保温瓶に採取し，希釈処理に供するまで同温度に保持した（丹羽ら，1989）。

精液は採取後直ちに性状を調べ，活力が80+++および生存精子率が90%以上である精液を実験に供した（下記，精液検査参照）．精液の希釈は37-38℃の3%（w/v）ゲンタマイシン加精液希釈液（マルベリー-III，富士農場サービス）を用いて行い，保存試験を始めるまで希釈精液を37-38℃に保持した（約15分間）。

希釈精液（50ml）は保存用ボトル（富士農場サービス）に移した後（写真3），25℃の恒温槽（アズワン）で30分間保持し，さらに低温（15℃）に調整した恒温器（ヤマト科学）で11-14日間保存した．

精液の活力は，保存精液を精液ボトルより一部取り出し，37-38℃の恒温槽で20-30分間加温した後，同温度に保持した精液性状検査板（富士平工業）を用いて室温下（23-25℃）で1分間以内に検査した．また，精液のpHおよびエオジン・ニグロシン染色による生存性（生存精子率%）を調べた．



写真3 精液保存用ボトルに分注された希釈精液(50mL)

### 実験1. 精子濃度が保存精子の性状に及ぼす影響

希釈後の精子濃度の違い（0.8-3.5x 10<sup>8</sup>/ml）が保存精子の活力，pHおよび生存精子率に及ぼす影響を調べた．

### 実験2. 希釈精液の温度測定

低温処理に至るまでの希釈精液の温度変化を調べた．すなわち，温度記録計（おんどとりJr.，RTR-5 2Pt，T&D社）および低高温センサー（TR-8120）を用いて，35℃から25℃へ保持し，さらに15℃へ低温処

理した保存用ボトル中の精液(50ml)の温度を測定した.

(結果および考察)

実験1. 異なる濃度 ( $0.8-3.5 \times 10^8/\text{ml}$ ) に調製し,  $15^\circ\text{C}$  で保存した精子の活力を調べた結果,  $0.8-1.3 \times 10^8/\text{ml}$  に比べて  $3.5 \times 10^8/\text{ml}$  の精子濃度で活力の低下が早くなる傾向が見られた (図1). 家畜豚 (ランドレース種および大ヨークシャー種) では, 低温保存 ( $18^\circ\text{C}$ ) における精子活力は  $1.0 \times 10^8/\text{ml}$  よりも  $0.5 \times 10^8/\text{ml}$  の精子濃度で長期間高かった (沖沢, 2001) ことから, ミニブタにおいても高濃度の精子は低温保存後の精子活力に悪影響を及ぼすと考えられた. また,  $0.8-1.3 \times 10^8/\text{ml}$  の精子濃度では, 人工授精に供することのできる活力 (70+++ ) を維持した期間は6-10日間であり, 今回使用した精液希釈液 (マルベリーIII) の保存可能期間内 (7-14日間) にほぼ一致したことから, ミニブタにおいても本希釈液は有効であることが示唆された. 今後, 低濃度 ( $0.8 \times 10^8/\text{ml}$  以下) の精子における低温保存後の活力について詳細に検討すれば, さらにミニブタにおける本希釈液の適切な有効期間が判明できると考えられる.

低温保存中の精液の pH は, 保存開始時では7.4-7.8であり, 家畜豚での報告 (浜名ら, 2007) と同等であった (図2). また, 精液の pH は保存期間にともない, ほとんどの精子濃度 ( $0.9-3.5 \times 10^8/\text{ml}$ ) で低下した (図2). しかし, 同じ精液希釈液を用いて低温保存した家畜豚 (ランドレースまたはPietrain) 由来精液では, pH は上昇することが報告されている (Vyt et al., 2004). Vyt et al. (2004) は, 我々よりも低濃度 ( $3.0 \times 10^4/\text{ml}$ ) の精液を用いており, 今回の結果と異なると考えられる. 精液の pH が7.2よりも低いと精子運動能が低下することから (Johnson et al., 2000), 今後, 低温保存中の精液の pH 統御について詳細な検討が必要であると考えられる.

低温保存中の生存精子率は, 10日間の保存では, 精子濃度に拘らず70%以上であった (図3). これは, 市販されている家畜豚 (デュロック種) での成績 (89%以上) や既報 (Vyt et al., 2004) に比べて低い傾向であったが, 人工授精に供することのできる生存精子率 (80%) と同等であり, 少なくとも10日間の保存は本希釈液で実施可能であると考えられる.

今回, 12日間低温保存した精液 (精子濃度  $0.8 \times 10^8/\text{ml}$ ) を発情期の雌 (1頭) に人工授精したところ, 残念ながら妊娠は確認されなかった. しかし, 今後, 多数の人工授精を試みることによって, 妊娠例は得ることができると思われる.

以上のことから, 市販されているマルベリーIIIを用いてミニブタ精液を  $0.8-1.3 \times 10^8/\text{ml}$  に希釈し,  $15^\circ\text{C}$  に保持すれば, 1週間程度の保存は可能であると考えられる. 今後, さらに長期保存に適した条件を検討していきたい.

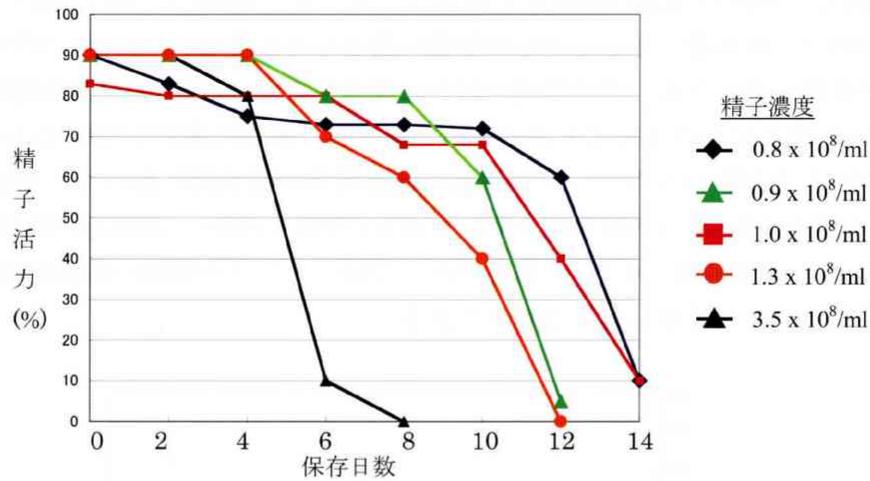


図1 精子濃度の違いが低温保存中の精子活力に及ぼす影響  
\*精子活力は+++の運動性を有する精子の割合を示した

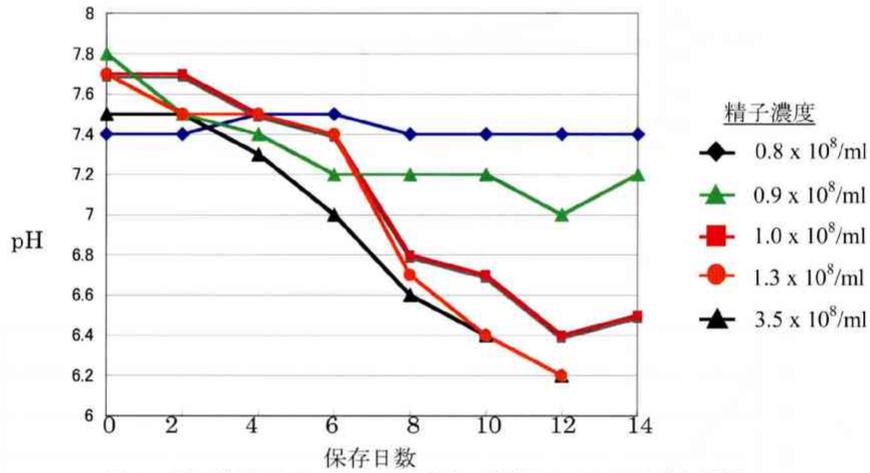


図2 精子濃度の違いが低温保存中の精液のpHに及ぼす影響

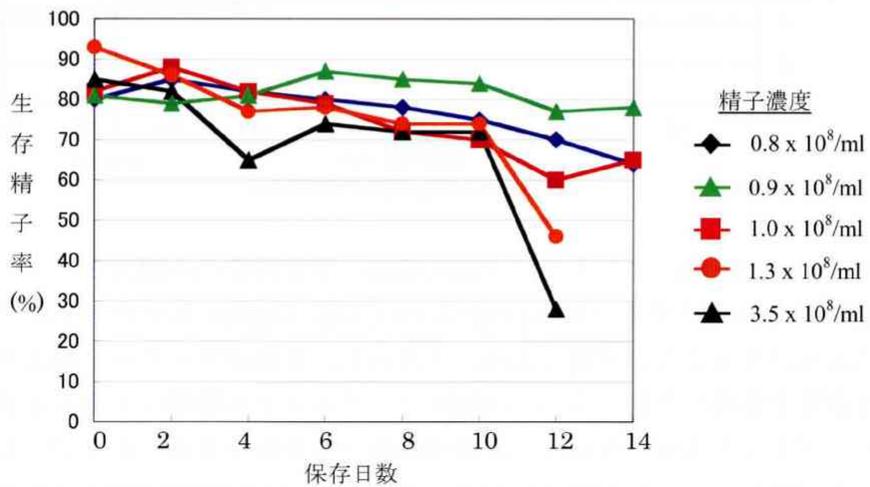


図3 精子濃度の違いが低温保存中の精子生存性に及ぼす影響

実験2. 低温処理した精液の実際の温度変化を調べたところ、図4および図5の通りであった。すなわち、希釈精液(36℃)は恒温槽に移してから16分後に設定した温度(25℃)に達し(冷却速度：約0.7℃/分)、さらに、恒温器へ移した後、設定温度(15℃)に到達するまで242分間(約4時間)を要した。家畜豚では希釈精液を10-20℃で保存することが一般的であるが、実際に設定した温度(10-20℃)に到達するまでの時間を測定した報告は少ない。ブタ精液の凍結保存の前処理において、精液を35-38℃から室温(20-25℃)へ冷却する場合、2時間程度を要しており(丹羽, 1989)、本検討の冷却速度(約0.7℃/分)より緩慢であった(冷却速度：0.08-0.15℃/分)。今後、ミニブタ精液の低温保存における冷却速度について詳細な検討を行う必要があると考えられる。

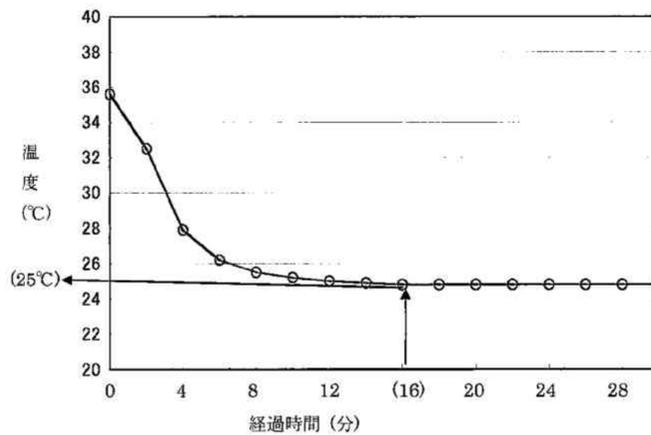


図4 低温処理後の精液の温度変化1

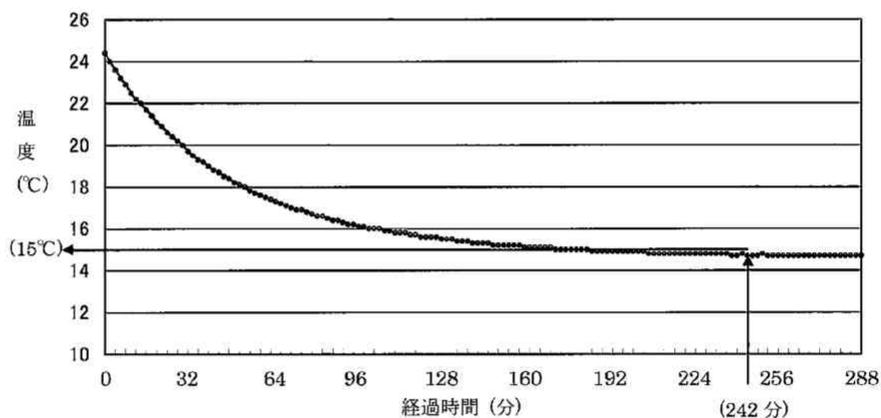


図5 低温処理後の精液の温度変化2

### iii) 精液注入法の検討 (内視鏡によるミニブタ雌生殖器：子宮頸管内の観察)

家畜豚では、受胎率を向上させるために2段階式の注入器(精液注入カテーテル, 写真4)を用いて精液を子宮深部に注入させることが可能である。すなわち、外側カテーテルを膣より子宮頸管(図6参照)に進入させ頸管を通過した後、さらに内側カテーテルを子宮深部へと進入させて精液を注入する。この方法をミニブタでも応用できれば、受胎率の向上が期待できる。そこで、本実験では、家畜豚で用いられている内側カテーテルが雌ミニブタの生殖器のどの位置まで進入できるか、内視鏡プローブ(AVS細径内視鏡システム, TESALA, AVS社)を用いて子宮頸管内を観察した。供試ブタは予め鎮静して実験を行った。その結果、内側カテーテルは膣口から子宮頸管に進入するものの、頸管の途中で

進入が不可能になった（膣口より約26cm付近，図6位置a，写真5）．ブタの子宮頸管内は，らせん状のヒダ様になっており（図6），ウシに比べてカテーテルを進入することが難しい．従って，家畜豚よりもさらに小型であるミニブタでは，カテーテル挿入がより難しくなると考えられた．しかし，今回の検討より，内側カテーテルの外径を2mmまでに細くできれば，頸管を通過して子宮内まで到達できると推察された．また，進入時において出血等が確認されなかったことから，カテーテルの素材，構造は基本的に家畜豚と同様で良いと思われた．

【まとめ】ミニブタの安定的生産を目指した人為的繁殖統御技術の確立として，人工授精に関わる検討を実施した．その結果，ミニブタ種雄から精液を採取できる専用の擬牝台を作製することができた．さらに，採取した精液を適当な希釈濃度に調整して低温（15℃）で1週間程度保存できる方法を確立し，精液が低温に至るまでの実際の温度変化を測定することができた．また，人工授精に用いる精液注入カテーテルの改良に関わる有用な知見を内視鏡観察によって得ることができた．

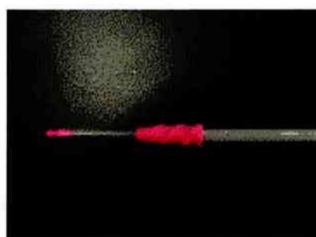
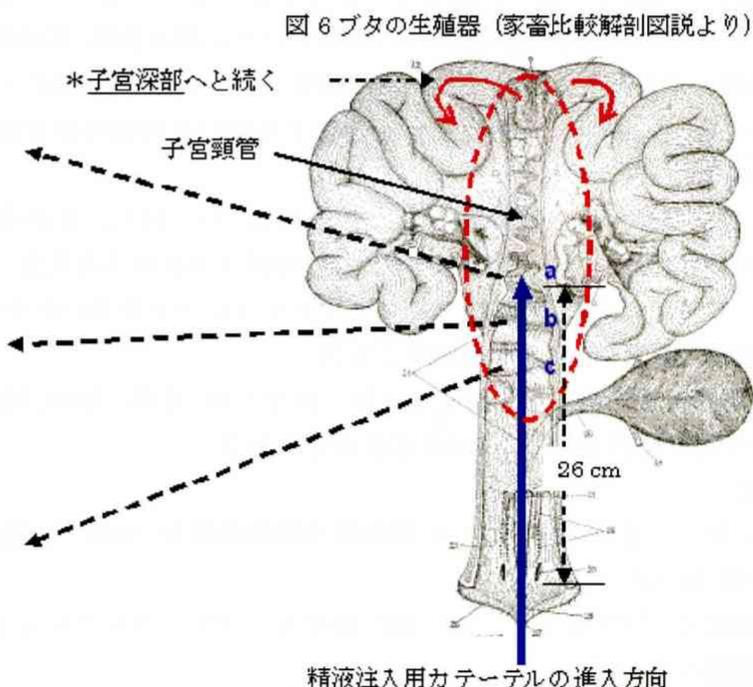
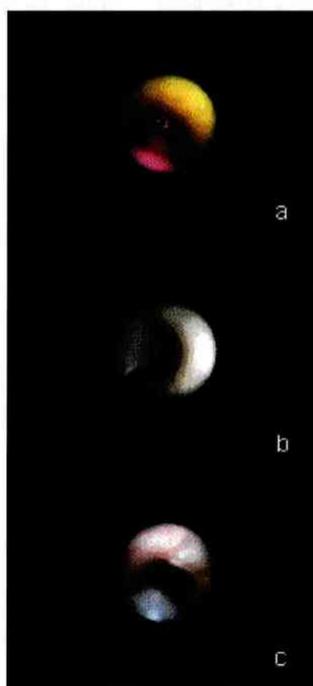


写真4 家畜豚用精液注入カテーテル



精液注入用カテーテルの進入方向

写真5 内視鏡によるミニブタ生殖器（子宮頸管）内画像：a,b,cは子宮頸管のそれぞれの位置における頸管内の状況を示している。a：カテーテルの進入が不可能となり、カテーテルの先端が観察される。b,c：位置cに比べてbでは頸管内が狭くなっているのが分かる。

## 2. 研究業績

### 1) 学会発表

- (1) 文室政彦・宇都宮直樹・佐々木勝昭・志水恒介・神崎真哉. マンゴー ‘アーウィン’ および ‘愛紅’ の取り木発根向上のための処理方法. 園芸学研究. 8 (別1) : 340.
- (2) 文室政彦・宇都宮直樹・佐々木勝昭・志水恒介. ポット栽培のマンゴー ‘アーウィン’ および ‘愛紅’ におけるミツバチ受粉と自然受粉の結実性の差異. 園芸学研究. 8 (別2) : 437.
- (3) 文室政彦. マンゴー ‘アーウィン’, ‘愛紅’ および台湾在来種の取り木による苗生産. 国際植物増殖者会議第16回滋賀大会 講演要旨集. 26-27.
- (4) 志水恒介・中川正博・文室政彦・宇都宮直樹. 2009. 土壌容積および加温処理がマンゴー台木の初期生育に及ぼす影響. 熱帯農業研究. 3 (別2) : 50-51.
- (5) 前田隆昭・米本仁巳・荻原 進・谷口正幸・文室政彦・志水恒介. 2009. ブドウサンショウの休眠覚醒後の気温が開花期および着花数に及ぼす影響. 園芸学研究. 8 (別1) : 342.
- (6) 山崎安津・金好純子・古田貴音・我藤雄・文室政彦・羽生剛・北島宣. 2009. 無核紀州型の無核性発現を抑制する温度条件. 園芸学研究. 8 (別2) : 138.
- (7) 北島宣・伊勢賢太郎・羽生剛・山崎安津・文室政彦・友廣教道・米森敬三. 2009. カンキツの生理落果における果実の離脱特性とその評価. 園芸学研究. 8 (別2) : 391.
- (8) 谷口俊仁・福原順子・林 登・岸昌生・佐伯和弘. 2009. *EGFP*遺伝子導入体細胞クローン胚を利用した妊娠ウシ羊水中胎子細胞の効率的採取法の確立およびクローン胚の作製. 平成20年度日本獣医師会学会年次大会
- (9) 谷口俊仁・星野洋一郎・岩本太作・松井孝徳・庄 隼生・岸 昌生・佐伯和弘. 2009. 販売店で購入した精肉からの培養細胞樹立およびクローン胚の作製. 第16回日本胚移植研究会大会
- (10) 伊藤慧・中川隆生・西村愛美・森田真祐・西山有依・上條信一・倉持隆司・三谷匡・岸昌生・安齋政幸 Wistar系ラット精巣上体尾部精子を用いた冷蔵保存方法の検討. 2009. 第43回日本実験動物技術者協会総会
- (11) 林 登, 谷口俊仁, 星野洋一郎, 小林直彦, 岸 昌生, 佐伯和弘. 2009. 冷蔵保存ウシ組織由来細胞を利用したクローン牛の生産. 第110回日本畜産学会大会
- (12) 岩本・岸ら. 2009. PDMS製マイクロウェルプレートを用いたウシ胚の初期発生に及ぼすウェルの容積の影響. 第111回日本畜産学会大会
- (13) 志賀勇介・中川隆生・矢野史子・岸 昌生・東 文男. 2009. 特定病原体不在ミニブタの作成とその微生物学的評価. 第111回日本畜産学会大会

### 2) 報告書

- (1) 佐伯・岸ら. 遺伝子操作ウシの効率的作製技術開発. 2009. 和歌山県地域結集型共同研究事業終了報告書. 64-65

(2) 生石農場ミニブタ紹介: 「kw1:KMP 紀州ミニブタ」パンフレット (紀和実験動物研究所, 09. 8)

### 3) 報道機関への発表

- (1) テレビ大阪番組「きらきらアフロ」 近大おいし牛紹介 (09. 8. 20取材)
- (2) テレビ大阪番組 (テレビ東京系列) 「ワールドビジネスサテライト」 Science Edge SP. 望安福号 (安福号クローン) 紹介 (09. 12. 28放映)