

福岡県内で生産されるイタリアンライグラスの主要無機成分含量迅速測定のための近赤外分光法の利用価値

平川達也*・棟加登きみ子・梅田剛利・家守紹光

福岡県内で生産したイタリアンライグラスを対象に近赤外分光法(NIRS)による主要無機成分の測定の可能性および利用法について検討した。

MLR法とPLS法を比較した結果、MLR法で得られた検量線の精度が高くなった。カリウムについては、検量線の検定における化学分析値と近赤外推定値との相関係数が0.88、推定誤差の標準偏差が化学分析値のレンジの12%、EI値は23.3で、検量線の精度は若干低いものの、実用に十分な推定精度と考えられた。しかし、実用性の判定精度の高いRPD値は2.09であり、推定精度は非常に低いと判定された。これらの結果からこの推定値を飼料設計に用いるには困難であるが、高低の判定に利用できると考えられた。

また、リン、カルシウム、マグネシウムのRPD値は1.19-1.76と推定精度が非常に低いため、近赤外線分析による推定にはさらに精度の向上を図る必要があると考えられた。

[キーワード：近赤外分光法、イタリアンライグラス、カリウム、MLR法、RPD]

Usefulness of Near-Infrared Reflectance Spectroscopy for the Quick Determination of Inorganic Ingredient Contents in Italian Ryegrass Produced in Fukuoka Pref. HIRAKAWA Tatsuya, Kimiko MUNEKATO, Taketoshi UMEDA and Tsugumitsu KAMORI (Fukuoka Agricultural Reserch Center, Chikushino, Fukuoka, 818-8549, Japan) *Bull. Fukuoka Agric. Res. Cent.* 24:99-103 (2005)

Under exmination was applicability and use of Near-Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS) too measurement of inorganic ingredient in the Italian Ryeglass produced in Fukuoka pref. As a result of comparing the MLR method with the PLS method, the accuracy in calibration obtained by the MLR method turned out to be higher.

The accuracy of the determination was evaluated by the correlation coefficient (R), the rate of the standard deviation of prediction to the range width of a sample (SDP/range) and the evaluation index (EI=2×SDP/range×100%). The 'R', SDP/range and EI of potassium were 0.88, 12%, and 23.3, respectively. Although the presumed accuracy was a little low, it was acceptable for practical use. However, the RPD value stood at 2.09 and was judged to be very low.

These results indicated that although it would be difficult to use these presumed values for feed design, they may serve for determining a high or low inorganic ingredient content.

The RPD value of Phosphric, Calcium, and Magnesium was 1.19-1.76 and presumed accuracy were very low and it was thought that it was necessary to aim at improvement in accuracy further for presumption by Near-Infrared Reflectance Spectroscopy.

[Key word : Near-Infrared Reflectance Spectroscopy, Italian Ryeglass, potassium, MLR method, RPD]

緒 言

近年、一戸当たりの乳用牛飼養頭数は増加しているが、飼料作物の作付面積は横ばい傾向にある⁶⁾。そのため、家畜ふん尿が自給飼料畑へ過剰に還元されており、県内で生産されるイタリアンライグラスの多くは無機成分のバランスが崩れていることが示されている⁹⁾。また、このような粗飼料の過剰摂取は、乳熱や低カルシウム血症等、多くの代謝障害に深く関与していることが指摘されている^{11, 12, 13)}。

このため、給与粗飼料の無機成分含量を知る必要があるが、化学分析は多大な時間、費用及び分析施設を必要とするため、迅速かつ安価な分析法の開発が求められてきた。

一方、近赤外分光法は多くの飼料成分について迅速に測定できることから、既にフォレンジテストの中心的手法として乳用牛の飼料給与設計に利用されている^{2, 19)}。しかし、無機成分については、近赤外域で吸収を示さないため、分析精度が低いとされてきた^{10, 19)}。

それに対し、Clarkら³⁾はトールフェスク等の無機成分含量推定の可能性を検討し、リン、カリウム、カルシウム、マグネシウムは推定可能であることを報告している。また、堆肥の無機成分含量推定に関する報告^{5, 7, 16)}も増加しており、梅田ら²¹⁾は肉牛ふん堆肥に限定した結果、近赤外分光法による無機塩類(リン酸、加里、石灰、苦土)の測定は可能であると報告している。

そこで、福岡県で自給されている飼料作物の45%を占めている代表的草種である寒地型イネ科牧草イタリアンライグラスについて、近赤外分光法による無機成分含量の測定の可能性およびその利用法について検討した。

* 連絡責任者 (畜産環境部)

試験方法

1 供試材料および試料の調製

供試材料は、1999～2001年に県内で生産されたイタリアンライグラス生草、サイレージ計84点（うち水田畑由来48点、河川敷草地由来36点）および2000～2002年に福岡県農業総合試験場内で栽培されたイタリアンライグラス生草74点の合計158点を用いた（第1表）。

各試料は60度48時間で通風乾燥後1mm粉碎し、その後0.5mmメッシュを装着したUdy cyclone Millを用いて微粉碎した。

2 化学分析項目および方法

化学分析方法は飼料分析基準注解（第3版）¹⁸⁾に従い、リンは乾式灰化後バナドモリブデン酸アンモニウム法、カリウム、カルシウム、マグネシウムは乾式灰化後、原子吸光測定法で定量した。これらの分析値を加熱乾燥法で求めた乾物率で除して化学分析値（乾物中%）とした。

3 近赤外分光法による検量線の作成

微粉碎した試料は、近赤外分析計（NIRSystems社6500型）を用いて波長400～2500nmの範囲内を2nm間隔で吸光度を測定し、付属のNIRSソフトウェアを用いて、取得した近赤外線スペクトルについて2次微分処理（微分条件：Segment20, Gap0）を行った。

その後、測定する各成分値が測定レンジ（最大値-最小値）内に平均的に分布するように、検量線作成用試料100点、有効性の検証用試料58点に分割した。検量線作成の回帰分析は、作成用試料を用いて、線形重回帰分析（以下MLR法）と部分最小2乗法による回帰分析（以下PLS法）の2種類の方法を用いた。MLR法は最大4波長までを使用した。検量線については、重相関係数（R）が高く、検量線の標準誤差（SEC）が小さいものを選択し候補検量線とした。

4 検量線の有効性の検証

作成した検量線は、検定用試料58点を用いて有効性の検証を行い、近赤外分光法による推定値と化学分析値との重相関係数（R）が高く、検定用試料における推定誤差の標準誤差（SDP）が最も小さいものを最適検量線とした。

また検量線の有用性については、水野ら¹⁹⁾の提唱するEI法（Evaluation index, 第2表）とともに、検量線の推定精度の信頼性を判定する基準としてWilliamが²²⁾新

第1表 供試したイタリアンライグラスの概要

	検量線作成用 (N=100)				検定用 (N=58)			
	河川敷 ¹⁾	水田畑 ²⁾	試験場内 ³⁾	計	河川敷	水田畑	試験場内	計
生草	14	15	43	72	5	7	31	43
サイレージ	1	17	0	18	6	9	0	15
計	25	32	43	100	11	16	31	58

- 1) 福岡県内の筑後川および遠賀川河川敷草地由来
- 2) 福岡県内の水田畑由来
- 3) 福岡県農業総合試験場内の圃場で生産

第2表 EI法による検量線の有用性評価

EI (%)	ランク	精度	有用性
～12.4	A	非常に高い	極めて高い
12.5～24.9	B	高い	高い
25.0～37.4	C	やや高い	中程度
37.5～49.9	D	低い	乏しい
50.0～	E	非常に低い	極めて乏しい

注) EI = 2 × SDP / レンジ × 100, SDP: 推定誤差の標準偏差

第3表 RPD法による検量線の有用性評価

RPD	精度	有用性
< 2.4	非常に低い	
2.5～3.0	低い	ラフなスクリーニング
3.1～4.9	高い	満足できるスクリーニング
5.0～7.9	非常に高い	品質管理分析相当
8.0<	特に高い	化学分析と同等

注) RPD = SD / SDP, SDP: 推定誤差の標準偏差, SD: 検定試料における標準偏差

たに示したRPD法（Ratio of SD of reference date in prediction sample to SEP, 第3表）により、各分析項目の利用目的から判断した。

結果と考察

1 供試材料の成分含量のレンジ

検量線作成用試料および検量線検定用試料の無機成分含量の化学分析値を第4表に示した。供試試料のリン、カリウム、カルシウム、マグネシウムのレンジは、それぞれ0.14～0.53%、0.88～5.26%、0.21～0.87%、0.09～0.28%、変動係数は24.4～35.3%であった。

粗飼料中の無機成分は、施肥量、堆肥の散布量、土壌の種類や性質、収穫時期等の要因によりかなり変動する。検量線の作成においては、各分析項目の無機成分含量のレンジを正規分布化させず、均一な分布にすることが求められており¹⁾、かつ将来の分析対象として広いレンジを持つことが必要である¹⁹⁾。

本県では家畜ふん堆肥を施用できない河川敷草地、および家畜ふん堆肥が過剰に施用された水田畑圃場が多いことから、日本標準飼料成分（2001）¹⁵⁾に記載されている

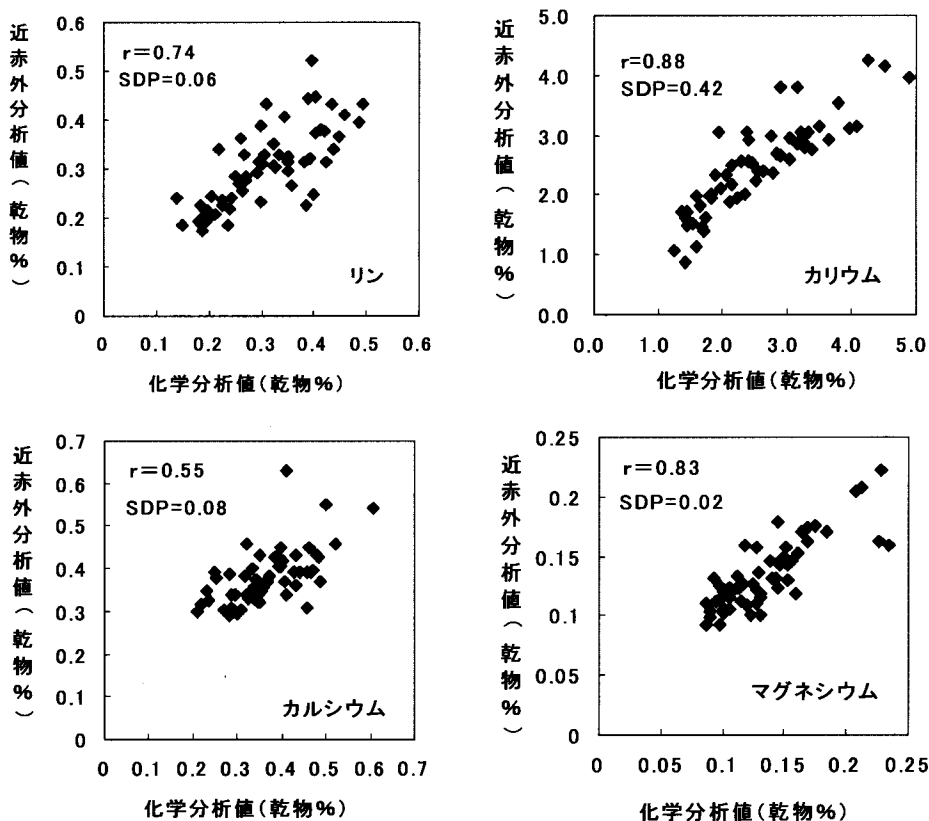
第4表 供試したイタリアンライグラスの無機成分の化学分析値

	検量線作成用 (N=100)				検定用 (N=58)				参考値 ³⁾
	平均	レンジ	標準偏差	変動係数 ²⁾	平均	レンジ	標準偏差	変動係数	
P	0.30	0.14～0.53	0.10	31.5	0.31	0.14～0.49	0.09	29.4	0.20～0.44
K	2.44	0.88～5.26	0.82	33.7	2.51	1.26～4.89	0.89	35.3	1.80～4.91
Ca	0.37	0.21～0.87	0.11	29.5	0.37	0.21～0.77	0.10	26.3	0.37～0.66
Mg	0.13	0.09～0.28	0.03	24.4	0.13	0.09～0.24	0.04	27.5	0.15～0.32

1) 数値は乾物中%

2) 変動係数: 標準偏差 ÷ 平均値 × 100

3) 参考値のレンジについては日本標準飼料成分表（2001）に記載される各ステージの平均値の最小値から最大値までを示した。



第1図 イタリアンライグラス主要無機成分の近赤外分析値と化学分析値との関係

第5表 MLR法およびPLS法による検量線の作成結果

	MLR 法						PLS 法		
	採用波長 (nm)				R	SEC	factor	R	SEC
P	1694	2264	2421	804	0.78	0.06	2	0.73	0.07
K	2264	1508	1694		0.85	0.44	3	0.83	0.47
Ca	1028	1738	898	1256	0.59	0.10	1	0.22	0.11
Mg	1400	2230	1732	1780	0.83	0.02	3	0.74	0.02

- 1) R: 検量線の作成における重相関係数
- 2) SEC: 検量線の作成における標準誤差
- 3) factor: 因子数

第6表 MLR法およびPLS法による検量線の検定結果

	MLR 法				PLS 法			
	R	SDP	EI	RPD.	R	SDP	EI	RPD
P	0.74	0.06	35.1	1.47	0.65	0.07	40.3	1.28
K	0.88	0.42	23.3	2.09	0.86	0.46	25.3	1.93
Ca	0.55	0.08	29.3	1.19	0.22	0.10	34.1	1.02
Mg	0.83	0.02	28.1	1.76	0.74	0.03	33.3	1.48

- 1) R: 検量線の作成における重相関係数
- 2) SDP: 検量線の検定における標準誤差
- 3) EI: $2 \times SDP / \text{レンジ} \times 100$, 0~12.4%-A, 12.5~24.9%-B, 25.0~37.4%-C, 37.5~49.9%-D, 50.0~--E (37.5未満で有効)
- 4) RPD: 検定飼料群のSD/SDP; >2.5で実用レベルで使える精度

数値と比べても、広いレンジを有するサンプルが収集できたと考えられる。

2 検量線の作成

MLR法とPLS法の回帰分析法ごとの検量線作成結果を第5表に示した。

MLR法では、単相関による相互干渉を考慮し、3～4波長を使用した。第一波長については、リンは1694nm、カリウムは2264nm、カルシウムは1028nm、マグネシウムは1400nmであった。また、カリウムがリンの第一波長を第三波長として、またリンがカリウムの第一波長を第二波長として使用していたことから、Clarkら³⁾の報告にもあるように、特定の有機物又は無機物との相関により測定されていると考えられた。

検量線作成における重相関係数は、カリウムが0.85、マグネシウムが0.83と比較的高い相関を示したが、リンとカルシウムは、東らや雑賀らの報告^{8, 17)}にあるように0.78, 0.59と低い相関を示した。SECは0.02～0.44であり、カリウムなどレンジの広い成分では高い値となった。

PLS法における検量線の重相関係数は0.22～0.83、SECは0.02～0.47であり、MLR法に比べ若干精度が劣る結果となった。またPLS法は用いた因子が何に対応しているか判断はできないが、藤井ら⁵⁾は牛ふん堆肥で1～9、梅田²¹⁾らは肉牛ふん堆肥で10～14の因子数であるとの報告がある。今回の試験においては1～3と少数であった。

3 検量線の有効性の検証

MLR法とPLS法の回帰分析法ごとに作成された検量線を検定用試料により検定した結果を第6表に示した。また第1図に各分析項目毎に、検定用試料における近赤外分析値と化学分析値との関係を示した。

MLR法で得られた検量線を検定用試料により検定した結果、重相関係数は0.55～0.88、SDPは0.02～0.42、EI値は23.3～35.1%で、カリウムがBランク（実用性が高い）、その他3項目はすべてCランク（実用性が中程度）であった。RPD値は1.19～2.09であり、目標とする2.5には届かなかった。

またPLS法で得られた検量線を検定用試料により検定した結果、重相関係数は0.22～0.86、SDPは0.03～0.46、EIは25.3～40.3%で、リンがDランク（実用性が乏しい）、その他の3項目はすべてCランク（実用性が中程度）であった。またRPD値は1.02～1.93であった。（第2, 3及び6表）

以上の結果から、MLR法により作成された検量線はPLS法により作成された検量線と比較すると、検定における重相関係数は高く、SDPおよびEI値が低く、RPD値は高い値になるため、MLR法による検量線がPLS法に比べ有効であると判断された。

近赤外域において物質中の官能基に由来する吸収は、狭い領域で複雑に重なり合っているため、目的とする成分に由来する吸収のみを特定することが非常に難しいとされている²⁰⁾。

このため、基本的な手法としてMLR法を用いるが、MLR法では吸収波長に影響を及ぼす他成分の吸収を取り除くため、補正のための波長をいくつか用意する必要

がある。また、使用波長選定時に互いに相関のある波長を選択しないように考慮しなければならない¹⁰⁾。

一方PLS法は、説明変数として連続したスペクトルデータの中から、目的変数と相関の高い因子を順番に抽出し回帰式を作成する方法で、今回の試験の目的である吸収を持たない無機成分の測定に際してはPLS法が有効であると思われたが、結果は検量線の精度を示す4項目のすべてにおいてMLR法がPLS法より優れていた。

出口の報告⁴⁾では、様々な草種、番草を込みにした試料群では、PLS法がMLR法より精度が高く、また共線性を持つデータの解析には有効とされている。

しかし、今回MLR法がPLS法より優れていたのは、草種を限定し、かつ地域の特性を十分に活かした広いレンジを設定できたこと、また互いに相関がなく無機物を推定できる波長域を選択し、説明変数として用いることができたためと考えられた。

粗飼料の品質評価ガイドブック¹⁹⁾では、検量線は推定精度の検定における相関係数0.9以上、SDPが検定試料のレンジの10%以内であることが望ましいとしている。

今回、検量線の実用性評価法としてEI法及びRPD法により検討を行った結果、カリウムについては検量線の検定における化学分析値と近赤外推定値との相関係数が0.88、推定誤差の標準偏差が化学分析値のレンジの12%、EI値は23.3で精度は若干低いものの、実用に十分な推定精度と考えられた。しかし、推定精度の信頼性を判定する基準として新たに示されたRPD値は2.09であり、目標である2.5には届かなかったため、検量線から得られる無機成分含量の推定値を飼料設計に用いるのは困難であると考えられた。ただし、泌乳牛の移行期管理において、カリウム含量2%以下の粗飼料を給与することが求められており^{12, 13)}その対策は急務である。そこでRPD法による精度は充分でないが、従来のEI法で実用性が高く判定されていることから、イタリアンライグラスにおけるカリウム含量については高低の判断など実用的に利用できると考えられた。

一方、リン、カルシウム、マグネシウムに関しては、レンジが狭いためSDPの値自体が小さく、EI法でCランク（実用性が中程度）が得られたが、RPD値による評価では1.19～1.76と精度が非常に低く、推定値の利用目的もカリウムに比べて低いことから、検量線による推定にはさらに精度の向上を図る必要があると考えられた。

今回の評価において、EI法では実用的であると判定されながら、RPD法でいずれも低く判定される結果となった。このことは測定対象物の予想含有量が1%以下の項目に関して、SDPの絶対値だけで判定すると実用的な価値の過大評価につながることを示している。EI法は相対評価を目的にしたものであり、今後含有量1%以下の項目や無機成分を推定する場合、EI法だけでなくRPD法を併用して評価することが望ましいと考えられた。

引用文献

- 1) 甘利雅弘・阿部亮・田野良衛・柁木茂彦・芹沢駿治・古賀照章(1987)近赤外分析法による粗飼料の成分分析と栄養価の推定法. 日草誌33(3): 219-226.
- 2) 甘利雅弘(1993)飼料分析-近赤外分光法を中心に-

- ぶんせき, NO 2. 日本分析化学会, 東京:112-116.
- 3) D.H.Clark, H.F.Mayland, and R.C.Lamb (1987): Mineral Analysis of Forages with Near Infra-red Reflectance Spectroscopy. *Argon. J.* **79**: 485-490.
 - 4) 出口健三郎 (1999):平成11年度自給飼料品質評価研究会資料:70-79.
 - 5) 藤井真理・東政則・古澤邦夫・須崎淑恵・須波友子・村田定信・伊藤重雄 (2001) 堆きゅう肥品質迅速判定技術確立試験-4年間試験のまとめ-宮崎畜試研報**14**:98-106.
 - 6) ふくおかの畜産 (2003) 福岡県農政部畜産課:5-15.
 - 7) 古橋正・片山信也・池田博保 (1995) 牛糞堆肥の腐熟度及び有効性のNIRSによる迅速分析法の開発(第2報)~堆肥の有効性迅速分析法の開発~静岡県畜試研報**20**:50-57.
 - 8) 東政則・畠山澄雄・松本智之 (1987) 近赤外定量分析計による自給飼料の分析~第2報サイレーズの無機成分,九州農業研究**49**:188.
 - 9) 平川達也 (2004) イタリアンライグラスサイレーズのカリウム含量の簡易測定技術,畜産技術**588**:11-13.
 - 10) 岩本睦夫・河野澄夫・魚住純 (1994) 近赤外分光法入門幸書房, 東京:40-79.
 - 11) J.P.Goff and R.L.Horst (1997) Effect of the Addition of Potassium, but not calcium, to prepartrum rations on milk fever in dairy cows. *J.Dairy Sci* **80**:176-186.
 - 12) 久米新一 (1998) 乳牛のカリウム代謝. カチオン・アニオンバランスと乳熱予防, 畜産の研究**52**:798-802.
 - 13) 久米新一 (1998) 乳牛のカリウム代謝. カチオン・アニオンバランスと乳熱予防 (2), 畜産の研究**52**:903-908.
 - 14) 水野和彦・石栗敏機・近藤恒夫・加藤忠司 (1988) 近赤外線反射率測定法による乾草の成分および栄養価の推定, 草地試験場研究報告**38**:35-46.
 - 15) 日本標準飼料成分表 (2001) 独立行政法人農業技術研究機構編:128-136. 社団法人 中央畜産会.
 - 16) 大川内康郎・粕谷健一郎・清水康博 (2002) 近赤外分光法による牛ふん堆肥の成分分析, 富山県畜試研報**15**:14-18.
 - 17) 雑賀優・佐々木亨・野中和久・高橋健太郎・渡辺美智子・渡辺潔 (1989) 近赤外分光法によるオーチャードグラスのミネラル含有率の推定, 日草誌**35**(3):228-233.
 - 18) 飼料分析基準注解 (第3版) (1998) 飼料基準研究会編:34-64. 社団法人 日本科学飼料協会.
 - 19) 粗飼料の品質評価ガイドブック (1997) 日本草地協会, 東京:34-71.
 - 20) 改訂 粗飼料の品質評価ガイドブック (2001) 日本草地協会, 東京:53-70.
 - 21) 梅田剛利・小山太・高椋久次郎 (2001) 近赤外分光法による肉牛ふん堆肥の無機塩類含量の測定, 福岡県農総試研報**20**:105-108.
 - 22) Williams P:Recent advances in near-Infrared applications for the Agriculture and Food Industries (1996) 第12回非破壊計測シンポジウム講演要旨集:1-8.