

## 低ストレス，簡易，迅速な牛の早期妊娠の予測に成功

### ポイント

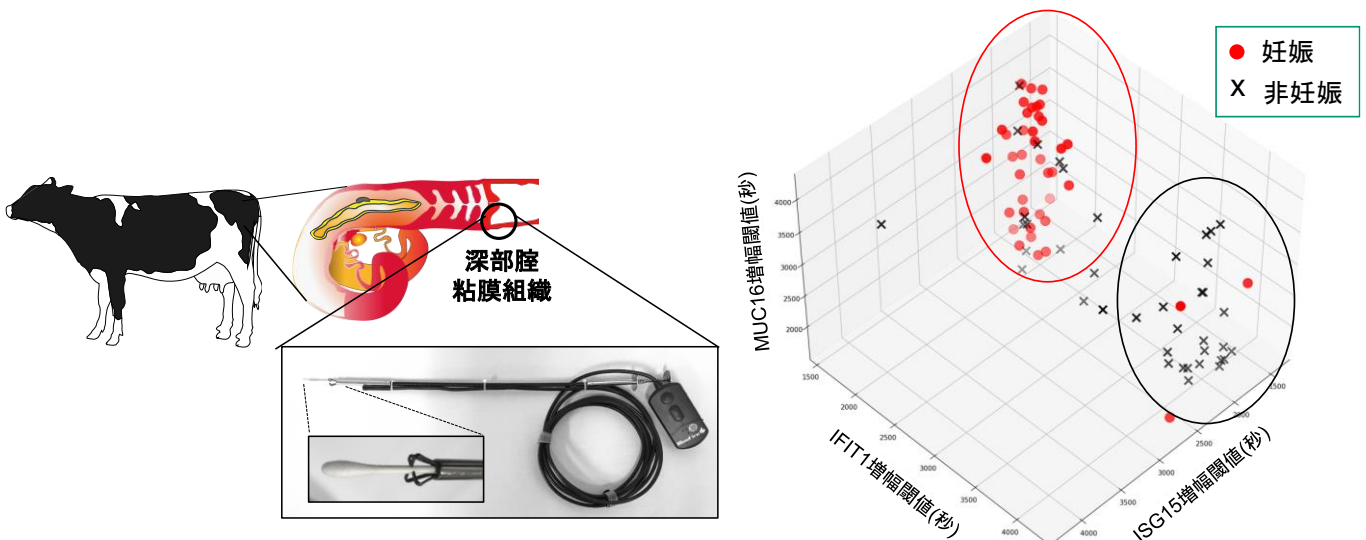
- ・妊娠により発現量が顕著に変化する遺伝子情報を指標に高精度な早期妊娠，非妊娠予測に成功。
- ・子宮外組織である腔組織由来サンプルを簡易迅速に採取する手法を開発。
- ・乳肉生産効率の向上に期待。

### 概要

北海道大学大学院農学院博士後期課程の國井宏樹氏，同大学院農学研究院の高橋昌志教授らの研究グループは，北海道立総合研究機構酪農試験場，東京農業大学と共同で，人工授精後 17-18 日目に採取した牛の子宮外組織である腔壁において妊娠特異的に発現が増減する遺伝子情報を指標として，RT-LAMP\*<sup>1</sup> (Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification)法により取得した複数ターゲット遺伝子の増幅情報を用いた機械学習\*<sup>2</sup> モデルを作成することで，85%以上の感度及び特異度で早期での妊娠の成否を予測することに成功しました。併せて，簡易迅速に腔粘膜組織サンプルの採取が可能な器具を開発し，牛へのストレスを減らした採取手法を確立しました。

本研究成果は，早期における妊娠の成否を高確率で予測することで牛の繁殖効率を向上させ，乳肉生産効率の向上に資することが期待されます。

なお，本研究成果は，2021 年 7 月 10 日（土）の Biochemical and Biophysical Research Communications 誌にてオンライン公開されました。



腔底部粘膜組織の迅速採取と RT-LAMP 反応により数値化した各遺伝子発現量のプロット。

## 【背景】

乳肉生産のための効率的な牛の増産には、受胎効率を高めた安定的な繁殖の向上が必要です。牛の発情周期は約 21 日であり、人工授精実施後、妊娠不成立であれば次の発情・排卵で再び受胎に向けた人工授精等の処置を実施する必要があります。1 回目の妊娠が不成立の場合、次の処置に至るまでの少なくとも 21 日間の妊娠生産性を伴わない牛の飼育期間が生じることになります。受胎不成立による非妊娠期間の延長は、牛乳出荷量減少、子牛販売収入の遅延、授精用精液の使用本数増加や、生産を伴わない飼料給与等による経営損失を引き起こします。そのため、できるだけ早く「妊娠か非妊娠か」を知り、次の受胎に向けた措置を行うための早期妊娠判定技術が求められています。

これまでの牛の妊娠診断方法は、超音波診断法や直腸検査法が主流であり、いずれもその信頼度は高いものの、診断が行われるのは授精後 30 日以上経過してからになります。牛の発情周期は 21 日であることから、妊娠診断により非妊娠確定までの間に人工授精を行う機会を 1 回または 2 回逃すことを意味します。このことから、次の発情・排卵開始までの 21 日より以前に妊娠判定が可能な早期妊娠診断技術が国内外で求められてきました。

他方で、子宮内で成長している胚から反芻動物固有に産生されるインターフェロン  $\tau$  (タウ)<sup>\*3</sup> により誘導される、インターフェロン誘導遺伝子(interferon stimulated genes(ISGs))<sup>\*4</sup> の血中白血球における発現が早期妊娠判定の指標とできることが報告され、その活用が検討されてきました。しかし、採血作業が牛に与えるストレス、判定結果取得までの一連の作業に時間がかかるとともに、判定精度も改善の余地があることから、低侵襲、簡易迅速、かつ高精度な早期妊娠判定技術の開発が国内外で求められていました(図 1)。

## 【研究手法】

研究グループは、まず、牛のストレスが少なく、かつ術者の作業労力も軽減できる採取器具を開発し、人工授精実施後 17-18 日目のホルスタイン種搾乳牛から腔深部壁の粘膜組織を採取しました。採取した粘膜組織において、妊娠により顕著に発現量が変化する遺伝子を網羅的に探索した結果、インターフェロン誘導遺伝子として妊娠時に発現が増加する *ISG15* 及び *IFIT1*、反対に非妊娠時に増加する *MUC16* を選定しました(図 2)。

採取サンプルにおけるこれらの遺伝子発現量を指標とした牛の妊娠状態を予測するために、まず 80 頭分のサンプル(妊娠・非妊娠確定牛それぞれ 40 頭ずつ)を RT-LAMP 法に供し、採取サンプル中のそれぞれの遺伝子発現量を数値化しました。

次に、50 頭分のデータを用いて、各遺伝子発現量がどのような場合に妊娠または非妊娠となるのかをコンピューターに学習させることで、牛の妊娠状態を予測する機械学習モデルを作成しました。作成した妊娠予測モデルに残りの 30 頭分のデータを適用することで、作成したモデルがどの程度正しく妊娠・非妊娠を予測できているかを評価しました。

## 【研究成果】

作成したモデルの人工授精実施後 17-18 日目における妊娠予測性能は二種類以上の複合の遺伝子指標で作成したモデルの場合、*IFIT1* と *MUC16* を組み合わせた場合に最も高く、93.3%の確率で妊娠している牛を正しく妊娠と判定することができ、86.7%の確率で妊娠していない牛を正しく非妊娠と判定することができました(表 1)。

以上より、本研究で作成した妊娠予測モデルを用いることで、人工授精実施後 17-18 日目の腔深部壁の粘膜組織を用いた簡便な牛の早期妊娠予測が可能であることが明らかになりました。

## 【今後への期待】

本研究成果を踏まえて、牛に与えるストレスを軽減しつつ、簡易、迅速な採取によって得られた微量サンプルからの高精度な妊娠判定技術の確立によって、牛の早期妊娠予測が可能になり、国内外での牛の生産効率の向上につながる事が期待されます。今後、より大規模な解析を行うことで判定性能の信頼性を高め、関係企業等との連携をとって実用化をすすめる予定です。

## 【謝辞】

本研究は日本学術振興会の JSPS 科研費 (19H03099, 20J11776), 日本中央競馬会(JRA)畜産振興事業, 東京農業大学生物資源ゲノム解析センター「生物資源ゲノム解析拠点共同研究」及びウシオ電機株式会社の助成を受けて実施されました。

## 論文情報

論文名	Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and machine learning application for early pregnancy detection using bovine vaginal mucosal membrane (LAMP 法と機械学習を用いた膣粘膜組織からの牛早期妊娠判定)
著者名	Hiroki Kunii <sup>1</sup> , Tomoaki Kubo <sup>2</sup> , Natsuki Asaoka <sup>1</sup> , Ahmed Z. Balboula <sup>3</sup> , Yu Hamaguchi <sup>4</sup> , Tomoya Shimasaki <sup>1</sup> , Hanako Bai <sup>5</sup> , Manabu Kawahara <sup>5</sup> , Hisato Kobayashi <sup>4</sup> , Hidehiko Ogawa <sup>6</sup> , Masashi Takahashi <sup>5</sup> ( <sup>1</sup> 北海道大学大学院農学院, <sup>2</sup> 北海道立総合研究機構酪農試験場, <sup>3</sup> ミズーリ大学畜産科学部, <sup>4</sup> 東京農業大学生物資源ゲノム解析センター, <sup>5</sup> 北海道大学大学院農学研究院, <sup>6</sup> 東京農業大生命科学部)
雑誌名	Biochemical and Biophysical Research Communications (生物学の専門誌)
DOI	10.1016/j.bbrc.2021.07.015
公表日	2021年7月10日(土)(オンライン公開)

## お問い合わせ先

北海道大学大学院農学研究院 教授 高橋昌志 (たかはしまさし)

T E L 011-706-2542 F A X 011-706-2537 メール mmasashi@anim.agr.hokudai.ac.jp

U R L <https://www.agr.hokudai.ac.jp/>

## 配信元

北海道大学総務企画部広報課 (〒060-0808 札幌市北区北8条西5丁目)

T E L 011-706-2610 F A X 011-706-2092 メール jp-press@general.hokudai.ac.jp

北海道立総合研究機構酪農試験場 (〒086-1135 標津郡中標津町旭ヶ丘7番地)

T E L 0153-72-2004 F A X 0153-73-5329 メール konsen-agri@hro.or.jp

学校法人東京農業大学経営企画部 (〒156-8502 東京都世田谷区桜丘1-1-1)

T E L 03-5477-2300 F A X 03-5477-2707 メール koho@nodai.ac.jp

【参考図】

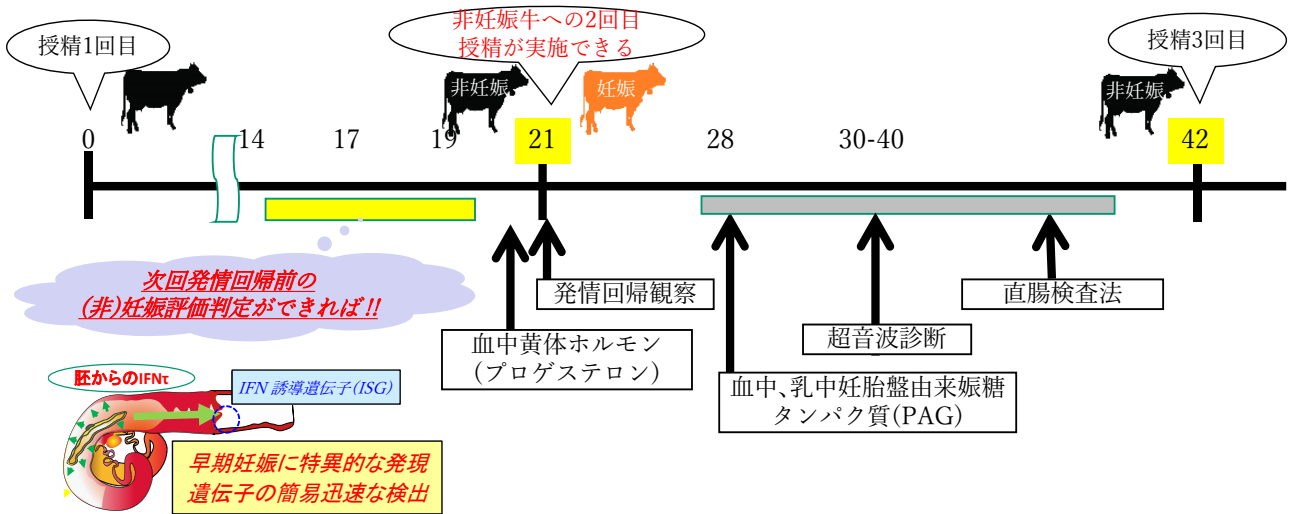


図 1. 早期妊娠診断技術の現況

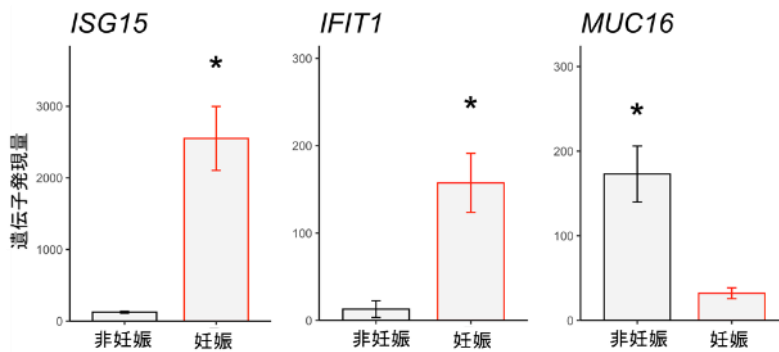


図 2. 網羅的な遺伝子発現解析により選出した妊娠特異的に発現が増加, 減少する遺伝子

組み合わせ遺伝子	正解率 (%)	感度 (%)	特異度 (%)	妊娠的中率 (%)	非妊娠的中率 (%)
<b>ISG15 / IFIT1 / MUC16</b>	<b>86.7</b>	<b>86.7</b>	<b>86.7</b>	<b>86.7</b>	<b>86.7</b>
<b>IFIT1 / MUC16</b>	<b>90.0</b>	<b>93.3</b>	<b>86.7</b>	<b>87.5</b>	<b>92.9</b>
IFIT1 / ISG15	53.3	66.7	40.0	52.6	54.5
ISG15 / MUC16	53.3	66.7	40.0	52.6	54.5

図 3. 複数指標による妊娠, 非妊娠判定の性能評価

## 【用語解説】

- \*1 RT-LAMP … 単一温度かつ短時間で遺伝子の増幅を解析できる LAMP 法を応用し、標的遺伝子である RNA から cDNA を合成して増幅・検出する方法のこと。RNA サンプルに対して、DNA を標的遺伝子とする場合と同様の試薬（プライマー、鎖置換型 DNA 合成酵素、基質等）に逆転写酵素を混合することによって、一定温度（60～65℃）下で増幅から検出までの工程を 1 ステップで実施が可能。一般的に遺伝子発現解析に用いられる定量 PCR 装置よりも検出装置が安価。
- \*2 機械学習 … コンピューターがアルゴリズムによりデータを分析し、そこに潜むパターンを見つけ出す手法。特に本研究で用いられている教師あり学習は、訓練データをコンピューターに学習させることで最適なモデルを作成し、未知のデータを予測する。
- \*3 インターフェロン  $\tau$  (タウ) … 牛、ヤギやヒツジなどの反芻動物の着床前胚のみから時期特異的に産生され、母体の妊娠認識に関与するサイトカイン。牛では、子宮内で伸長した胚が子宮内膜に着床する直前の妊娠 17-19 日をピークとした一過性分泌を示す。肝炎治療などに使用されるインターフェロン  $\alpha$  (アルファ) などの I 型インターフェロングループに属する。
- \*4 インターフェロン誘導遺伝子(interferon stimulated genes(ISGs)) … インターフェロンの刺激を受けた細胞内で発現が誘導される遺伝子群。