

博士論文

牛の未改良形質である精液性状および暑熱耐性の  
ゲノムワイドマーカーに基づく育種価推定に関する研究

安宅 倭

# 目次

1. 序論	1
2. 牛の育種で用いられるゲノミック評価	
2.1 緒論	3
2.2 シングルステップ法	3
2.3 利用したソフトウェア	11
2.4 摘要	14
3. 黒毛和種およびホルスタイン種の精液性状に関する分析	
3.1 緒論	15
3.2 材料と方法	15
3.3 結果	20
3.4 考察	29
3.5 摘要	32
4. ホルスタイン種の暑熱耐性に関する分析	
4.1 緒論	33
4.2 材料と方法	34
4.3 結果	42
4.4 考察	64
4.5 摘要	69
5. 総合考察	70
6. 全体摘要	73
7. 謝辞	77
8. 参考文献	79

## 1. 序論

牛は、1頭の母から一度に生まれる個体数が通常1頭、多くても2頭であることから、選抜淘汰による育種改良に大きな制約をとらなう。このため、さまざまな情報を蓄積し有効利用することによって改良を効率化する取り組みが古くから行われてきた。そのもっとも古い例が血統登録であり、日本を代表する乳用牛であるホルスタイン種については 1890 年に日本畜産協会が登録を開始し、現在では(一社)日本ホルスタイン登録協会がその役割を引き継いでいる(日本ホルスタイン登録協会, 2018)。また日本の代表的肉用牛である黒毛和種については 1948 年に、戦前発展してきた各産地の和牛登録・改良制度を全国一律の登録制度として統合した、(社)全国和牛登録協会が設立されている(全国和牛登録協会, 2018)。

乳用牛の乳量のように雌雄両方から遺伝するものの、どちらか一方の性別にしか発現しない経済形質が多いことも育種改良上の大きな制約である。人工授精の普及発達によって、1頭の雄牛から非常に多くの子牛が生産可能となったことから、雌にしか発現しない形質については後代検定牛を計画的に生産することで記録を収集し、経済性に優れていることが判明した種雄牛の凍結精液を広く全国的に利用するしくみがつくられ、経済性の向上がはかられた。例として日本の乳用牛については 1974 年、(社)家畜改良事業団が乳量等の経済形質の情報を一元的に蓄積し、遺伝的改良と経営改善に活用する牛群検定事業を開始している。蓄積された検定情報は、(一社)日本ホルスタイン登録協会の血統情報と組み合わせ、1989 年からは最良線形不偏予測値 (Best Linear Unbiased Prediction: BLUP) 法種雄牛母型祖父モデルによる全国レベルの遺伝的能力推定に利用され、この取り組みは 1992 年、BLUP 法アニマルモデルを採用する際に現在の独立行政法人家畜改良センターに引き継がれている。日本のホルスタイン種雄牛は公表される遺伝的能力をもとに選抜され、選抜された種雄牛の凍結精液を集中利用することによって遺伝的改良を推進している。こうした取り組みは先進国では広く行われており、凍結精液は国境を越えて流通することが可能であることから、Multiple Across-Country Evaluation(MACE)法による国際的な能力比較のためのインターブルが設立され、日本も 2003 年からその評価に参加している。

BLUP 法は牛の遺伝的能力を推定する上で欠かせない手法となっているが、近年、DNA マイクロアレイの発達によって一塩基多型(single nucleotide polymorphism: SNP)情報が比較的簡単に計測できるようになり、本牛またはその後代から経済形質が測定されるまで、両親の平均でしか得ることができなかった子の遺伝的能力を、生まれてすぐに、より正確知ることができるようになってきている。しかし何十年にもわたって蓄積されてきた血統情報に比べて、SNP 情報を持つ個体

は限られかつ雄牛が中心であることから、分子血縁行列を使った古典的 BLUP(t-BLUP)法によって得た推定育種価(EBV)から疑似記録(de-regressed EBV)を作成し、SNP 情報から作成したゲノム関係行列を利用した BLUP(GBLUP)法によりゲノミック推定育種価(GEBV)を計算するマルチステップ法が現在、牛では主流となっている。その一方、蓄積された様々な情報を一括で利用し、1つの混合モデル方程式(Mixed Model Equation: MME)で計算するシングルステップ法が提案され、盛んに研究が行われている。

本研究では、重要性が指摘されながら遺伝率が低いなどの要因によって分析を進めることができなかった牛の経済形質のうち、種雄牛の精液性状と乳用牛の暑熱耐性について、将来の普及が期待されるシングルステップ法を活用した分析検討をおこなう。

## 2. 牛の育種で用いられるゲノミック評価

### 2.1 緒論

ゲノム情報を利用した育種の考え方は、20 年前にはマーカー利用選抜(MAS, Lande と Thompson, 1990; Williams, 2005)が中心であったが、遺伝的不良形質のように大きな効果を持つ遺伝子が関与する場合には成果を上げやすいものの、量的形質のように微小な効果を持つ多数の遺伝子が関与する場合には実用的な成果を上げられず、MAS は現在では当初の期待に反して、慎重な楽観論の一つ(Dekkers, 2004)とされている。量的形質については、因果関係がはっきりと説明できないものの、多数の微小な効果を持つ遺伝子が関与することを仮定した infinitesimal モデルに基づき、MME を解いて得られる EBV を用いた選抜が 50 年近く前から現在もなお成果を上げている。

DNA マイクロアレイのような検出技術が発達し、数千から数十万座位の SNP について一度に遺伝子型の決定が可能となり、マーカー密度が大幅に向上した現在、個々のアリル効果を検定するゲノムワイド関連解析 (Genome-wide Association Study: GWAS)と同時に、ゲノム情報を MME に取り込んでゲノミック評価を行い、GEBV により選抜を行うゲノミック選抜が実用化されている。

本節では、牛のゲノミック評価で用いるゲノミック関係行列や GBLUP 法についてまとめると同時に、ゲノミック評価を実装し本研究で活用したプログラムについて説明する。

### 2.2 シングルステップ法

#### 2.2.1 ゲノミック関係行列の作成

ゲノミック関係行列は個体間のマーカー型の似通いを示す行列である。各マーカーの効果を推定する次のようなモデルを想定する。

$$\mathbf{y} = \mathbf{1}_n\mu + \mathbf{W}\mathbf{g} + \mathbf{e}$$

ただし、

$\mathbf{y}$ : 1個体に1つの表現型値からなる次数  $n$  のベクトル、

$\mathbf{1}_n$ : すべての要素が 1 の次数  $n$  のベクトル、

$\mu$ : 全平均、

$\mathbf{W}$ : 各行に  $n$  頭の個体の  $m$  個のマーカー型を centered coding で示したマーカー型行

列、

$\mathbf{g}$ : 各マーカーの変量効果ベクトル、

$\mathbf{e}$ : 残差

であり、 $\mathbf{g}$ は平均 0、分散 $\mathbf{I}\sigma_g^2$ の多変量正規分布に従う、すなわち全マーカーは独立でかつ共通の分散を持つと仮定する。また $\mathbf{W}$ は、各行に  $n$  頭の個体の  $m$  個のマーカー型を 0、1、2 のコードで示したマーカー型行列 $\mathbf{M}$ から、マーカー型行列の各列の和がゼロになるよう各遺伝子座のマーカー型平均で補正した centered coding に変換したマーカー型行列であり、次のように作られる。

$p_j$ を  $j$  番目の遺伝子座のアリル  $a$  のアリル頻度、 $q_j = 1 - p_j$ をもう一方のアリル  $A$  のアリル頻度として、マーカー型行列の各列の和がゼロになるよう各遺伝子座のマーカー型平均で補正した centered coding に変換すると、

$$\mathbf{W} = \mathbf{M} - \mathbf{P}$$

となり、0、1、2 コードの場合各遺伝子座のコードの平均は、 $2p_j^2 + 2p_jq_j = 2p_j$ であることから、

$$\mathbf{P} = \begin{pmatrix} 2p_1 & \cdots & 2p_m \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ 2p_1 & \cdots & 2p_m \end{pmatrix}$$

である。

ハーディーワインベルク平衡下にあることを仮定すると、遺伝子型とその頻度は次のように整理される。

遺伝子型	値	頻度
AA(0)	$-2p_jg_j$	$q_j^2 = (1 - p_j)^2$
Aa(1)	$(1 - 2p_j)g_j$	$2p_jq_j = 2p_j(1 - p_j)$
aa(2)	$(2 - 2p_j)g_j$	$p_j^2$

ここから、各マーカーの相加的遺伝効果の平均は、

$$\left(-2p_j(1 - p_j)^2 + (1 - 2p_j)2p_j(1 - p_j) + (2 - 2p_j)p_j^2\right) g_j = 0$$

分散は、

$$2p_j(1 - p_j)\sigma_g^2$$

全マーカーが独立であるとの仮定から、総分散は、

$$2 \sum_j p_j(1 - p_j)\sigma_g^2 = \sigma_u^2$$

各個体の EBV  $\mathbf{u}$  の分散は、

$$\text{Var}(\mathbf{u}) = \mathbf{W}\mathbf{W}'\sigma_g^2 = \frac{\mathbf{W}\mathbf{W}'}{2\sum_j p_j(1-p_j)}\sigma_u^2$$

ゲノミック関係行列は、

$$\mathbf{G} = \frac{\mathbf{W}\mathbf{W}'}{2\sum_j p_j(1-p_j)}$$

と導くことができる。本研究ではこの VanRaden(2008)のゲノミック関係行列を利用する。こうして得られたゲノミック関係行列は様々な仮定に基づいて計算されていることに留意すべきである。

また、こうして得られたゲノミック関係行列はランク落ちし正則行列とならない。これは Centered coding を利用しマーカー型平均で補正する過程で行列のランクが1つ少なくなるためである。このほか、一卵性双生児が含まれる場合、 $\mathbf{Z}$  の行重複によりランク落ちし、個体数がマーカー数を超過してしまった場合もランク落ちする。このため、GBLUP 法で利用する場合は逆行列を持つように分子血縁行列 $\mathbf{A}$ とともに、

$$\alpha\mathbf{G} + \beta\mathbf{A}$$

のようなかたちで利用され、本研究で用いた BLUPF90 ファミリー(後述)では $\alpha$ 、 $\beta$ の既定値を0.95、0.05 としている。このように分子血縁行列を混ぜて利用することは、相加的遺伝分散のうちマーカーで説明することができないポリジェニックな効果を含めるためとも説明されている(Meyer ら, 2018)。

なお-1、0、1 コードをはじめとしてマーカー型のコード方法はいくつかあるが、マーカー型間の差が同じであればゲノミック関係行列は同じになる(Strandén と Christensen, 2011)。

ゲノミック関係行列を利用した GBLUP 法は、マーカーの効果を推定せず、予測群の GEBV を直接推定することから、従来の MME に関する理論がそのまま応用でき、実務家にとって応用しやすい。親子関係のみから構築される分子血縁行列には、遺伝分散の半分を占めるメンデルアンサンプリングの分散が反映されず、より多くの優良遺伝子を受け継いだ後代を選抜するには、当該牛自身あるいは多数の後代の記録を MME に取り込んで得た EBV を利用せざるを得なかった。しかし、ゲノミック関係行列にはメンデルアンサンプリングの分散が反映され、特に記録も後代も持たない個体について、より正確な EBV に基づいた選抜が可能である(Daetwyler ら, 2007)。GBLUP 法による GEBV は依然として、理論的な説明が完全についているとは言えないが、大量の情報が活用可能になる中で有効な情報を最大限に引き出し、実用性を重視して利用されてい

る。

## 2.2.2 マルチステップ法とシングルステップ法

ゲノム情報を持つ個体は種雄牛や種牝牛のように経済的な価値が高いものが中心になりがちでかつ、一部のいわゆる名牛を除き、最近の牛が中心となる。こうした牛は強い選抜がかかると同時に差別的な管理を受けて評価値が過大になると懸念されたこともあり、牛の GBLUP 法はマルチステップ法が現在でも広く用いられている。マルチステップ法では、t-BLUP 法によって EBV を計算し、両親の平均値に回帰している EBV を de-regress して乳量などの記録を測定できない種雄牛についても疑似記録(de-regressed EBV)を得たうえで、de-regressed EBV とゲノム情報を持つ個体群をリファレンス集団としてゲノミック関係行列を使った GBLUP 法により GEBV を得ている。リファレンス集団は、評価値の信頼度が高い雄牛が中心だが、GEBV の信頼度の向上のために種牝牛を含む雌牛集団を使うことがあり、その場合は適切な重みづけをするなどの処理を行っている(Wiggans ら, 2011)。

インターブルの国際評価でも採用された de-regress 方法(Rozzi と Schaeffer, 1996)をアニマルモデルによる計算に適用すると次のようになる。

まず、EBV について次のように仮定する。

$$\mathbf{p} = \mu \mathbf{1}_n + \mathbf{a}$$

ただし、

$\mathbf{p}$ : EBV の列ベクトル、

$\mu$ : 全平均、

$\mathbf{1}_n$ :要素がすべて 1 の  $n$  次のベクトル、

$\mathbf{a}$ : EBV から全平均を除いた列ベクトル、

である。そして、 $\mathbf{y}$  を de-regressed EBV の列ベクトルとし、残差分散が EBV の信頼度の逆数に比例するとし、次のようなモデルを仮定する。

$$\mathbf{y} = \mu \mathbf{1} + \mathbf{a} + \mathbf{e}$$

これに基づく MME は、

$$\begin{pmatrix} \text{trace}(\mathbf{D}^{-1}) & \text{vecdiag}(\mathbf{D}^{-1})' \\ \text{sym.} & \mathbf{D}^{-1} + \mathbf{A}^{-1}\mathbf{k} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \hat{\mu} \\ \hat{\mathbf{a}} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \text{vecdiag}(\mathbf{D}^{-1})'\mathbf{y} \\ \mathbf{D}^{-1}\mathbf{y} \end{pmatrix}$$

ただし、



$D$ : 信頼度の逆数を要素とする対角行列、

$\text{trace}(D^{-1})$ :  $D^{-1}$  のトレース、

$\text{vecdiag}(D^{-1})$ :  $D^{-1}$  の対角要素からなる列ベクトル、

$A^{-1}$ : 分子血縁行列の逆行列、

$h^2$  を遺伝率として、 $k = \frac{1-h^2}{h^2}$

である。そして、次のような手順により  $y$  を求める。

1)  $\mu$ 、 $\hat{a}$  の初期値をゼロとする、

2)  $\hat{a} = p - \hat{\mu} \mathbf{1}$  を計算する、

3)  $D^{-1}y = \text{vecdiag}(D^{-1})\hat{\mu} + (D^{-1} + A^{-1}k)\hat{a}$  を計算する、

4)  $\hat{\mu} = \frac{\mathbf{1}'(D^{-1}y) - \text{vecdiag}(D^{-1})'\hat{a}}{\text{trace}(D^{-1})}$  を計算する、

5) 収束するまで 2) に戻る。

6) 3) のように  $D^{-1}y$  を計算し、 $D(D^{-1}y)$  により de-regressed EBV を得る。

一方、近年盛んに研究が行われているシングルステップ法(Aguilar ら, 2010(a); 2011; Legarra ら, 2012; 2014)は、利用可能な情報を最大限かつ同時に利用し、一度に GEBV を計算する方法であり、t- BLUP 法の分子血縁行列を、分子血縁行列とゲノム情報を持つ個体のゲノミック関係行列を混ぜて作成する混合行列  $H$  に置き換えて計算するものである。分子血縁行列の逆行列は Henderson(1976)や Quaas(1976)らによって両親の情報や近交係数のデータを読みながら簡単に計算する方法が知られ、全国レベルの大規模のデータを利用した EBV の計算 (VanRaden と Wiggans, 1991)を行う上で大きな力を発揮した。しかし、マルチステップ法においてもシングルステップ法においても、ゲノミック関係行列の逆行列は現在のところ、地道に計算せざるを得ない。

### 2.2.3 混合行列 $H$ の作成

MME は一般に、次のように表される、

$$\begin{bmatrix} X'R^{-1}X & X'R^{-1}Z \\ Z'R^{-1}X & Z'R^{-1}Z + V^{-1} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \hat{b} \\ \hat{u} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} X'R^{-1}y \\ Z'R^{-1}y \end{bmatrix}$$

ただし、

$X, Z$ : 計画行列、

$R$ : 誤差分散共分散行列

$y$ : 表現型値のベクトル、

$\hat{b}, \hat{u}$ : 母数効果および変量効果の推定値、

$V$ : 変量効果の分散共分散行列

である。

EBV は変量効果 $u$ に相当し、 $A$ を分子血縁行列、 $I$ を単位行列、 $U$ を変量効果の形質間の分散共分散行列、 $E$ を形質間の誤差分散共分散行列として2つの行列のクロネッカー積を作成する演算子 $\otimes$ を用いれば、t-BLUP 法では、

$$V = A \otimes U \text{ (単形質の場合 } A\sigma_u^2)$$

$$R = I \otimes E \text{ (単形質の場合 } I\sigma_e^2)$$

であり、 $U$ および $E$ を推定する必要がある。なお現在、乳用牛の育種で多く用いられ、検定日(通常月一日)に農家で測定した乳量等の記録を表現型値とし、変量効果をルジャンドル多項式などを利用した回帰式によって表す変量回帰検定日モデルでは、複数産次の記録をそれぞれ別形質と扱うとともに、 $E$ に対角行列を仮定することが多い。

ここで、 $u$ と $A$ をゲノム情報を持たない個体に相当する部分(1)とゲノム情報を持つ個体に相当する部分(2)に分ける。

$$u = \begin{bmatrix} u_1 \\ u_2 \end{bmatrix}, A = \begin{bmatrix} A_{11} & A_{12} \\ A_{21} & A_{22} \end{bmatrix}$$

マルチステップ法のゲノミック評価では分子血縁行列 $A$ の代わりに $G$ (実際には $\alpha G + \beta A_{22}$ だが、説明を単純にするため 2.2.3 では $G$ を用いる)、 $y$ に de-regressed EBV を使用するが、シングルステップ法では分子血縁行列 $A$ の代わりに混合行列 $H$ 、 $y$ には実際に測定した表現型値を使用する。

混合行列 $H$ は $A_{22}$ を単純に入れ替え、

$$H = \begin{bmatrix} A_{11} & A_{12} \\ A_{21} & G \end{bmatrix}$$

とすればよいと考えがちだが、これでは $G$ がゲノム情報を持たない個体との、あるいはゲノム情報を持たない個体同士の関係にゲノムから得られた情報が反映されない。言い換えると、ゲノム情報を持つ個体の EBV がゲノム情報を持たない個体の EBV に影響することがなく意味がない。例えば、ゲノム関係行列の非対角要素が 0.6 の全兄弟の子孫にゲノム情報がない場合、この子孫

同士の非対角要素は 0.3 になるべきであるが、この方法では親子関係しか反映されず 0.25 になってしまう。また、ゲノム情報を持つ個体が表現型値を全く持たない場合、

$$\mathbf{u}_2 | \mathbf{u}_1 = \mathbf{A}_{21} \mathbf{A}_{11}^{-1} \mathbf{u}_1$$

となって  $\mathbf{G}$  は意味をなさない (Legarra ら, 2009)。

$$\mathbf{A}^{-1} = \begin{bmatrix} \mathbf{A}^{11} & \mathbf{A}^{12} \\ \mathbf{A}^{21} & \mathbf{A}^{22} \end{bmatrix}$$

とすると、ゲノム情報を持つ個体の EBV が与えられた場合のゲノム情報を持たない個体の EBV の分布は、

$$p(\mathbf{u}_1 | \mathbf{u}_2) \sim N(\mathbf{A}_{12} \mathbf{A}_{22}^{-1} \mathbf{u}_2, \mathbf{A}^{11-1}) = N(\mathbf{A}_{12} \mathbf{A}_{22}^{-1} \mathbf{u}_2, \mathbf{A}_{11} - \mathbf{A}_{12} \mathbf{A}_{22}^{-1} \mathbf{A}_{21})$$

ただし、 $N$  は正規分布である。マーカーの効果を  $\mathbf{g}$  とすると、

$$\mathbf{u}_2 = \mathbf{W} \mathbf{g}$$

であり、 $\mathbf{u}_1$  は、

$$\mathbf{u}_1 = \mathbf{A}_{12} \mathbf{A}_{22}^{-1} \mathbf{W} \mathbf{g} + \boldsymbol{\varepsilon}$$

更に、

$$\begin{aligned} \text{Var}(\mathbf{u}_1) &= \mathbf{A}_{12} \mathbf{A}_{22}^{-1} \mathbf{G} \mathbf{A}_{22}^{-1} \mathbf{A}_{21} + \mathbf{A}_{11} - \mathbf{A}_{12} \mathbf{A}_{22}^{-1} \mathbf{A}_{21} \\ &= \mathbf{A}_{11} + \mathbf{A}_{12} \mathbf{A}_{22}^{-1} (\mathbf{G} \mathbf{A}_{22}^{-1} \mathbf{A}_{21} - \mathbf{A}_{22} \mathbf{A}_{22}^{-1} \mathbf{A}_{21}) \\ &= \mathbf{A}_{11} + \mathbf{A}_{12} \mathbf{A}_{22}^{-1} (\mathbf{G} - \mathbf{A}_{22}) \mathbf{A}_{22}^{-1} \mathbf{A}_{21} \end{aligned}$$

$$\text{Var}(\mathbf{u}_2) = \mathbf{G} = \frac{\mathbf{w} \mathbf{w}'}{2 \sum_j p_j (1-p_j)}$$

$$\text{Cov}(\mathbf{u}_1, \mathbf{u}_2) = \mathbf{A}_{12} \mathbf{A}_{22}^{-1} \mathbf{G}$$

したがって、つぎのようにまとめられる。

$$\mathbf{H} = \begin{bmatrix} \mathbf{A}_{11} + \mathbf{A}_{12} \mathbf{A}_{22}^{-1} (\mathbf{G} - \mathbf{A}_{22}) \mathbf{A}_{22}^{-1} \mathbf{A}_{21} & \mathbf{A}_{12} \mathbf{A}_{22}^{-1} \mathbf{G} \\ \mathbf{G} \mathbf{A}_{22}^{-1} \mathbf{A}_{21} & \mathbf{G} \end{bmatrix}$$

MME ではこの逆行列

$$\mathbf{H}^{-1} = \begin{bmatrix} \mathbf{H}^{11} & \mathbf{H}^{12} \\ \mathbf{H}^{21} & \mathbf{H}^{22} \end{bmatrix}$$

が必要であるが、分割行列の逆行列に関する定理を利用すると、

$$\begin{aligned} \mathbf{H}^{11} &= (\mathbf{H}_{11} - \mathbf{H}_{12} \mathbf{H}_{22}^{-1} \mathbf{H}_{21})^{-1} \\ &= (\mathbf{A}_{11} + \mathbf{A}_{12} \mathbf{A}_{22}^{-1} \mathbf{G} \mathbf{A}_{22}^{-1} \mathbf{A}_{21} - \mathbf{A}_{12} \mathbf{A}_{22}^{-1} \mathbf{A}_{21} - \mathbf{A}_{12} \mathbf{A}_{22}^{-1} \mathbf{G} \mathbf{G}^{-1} \mathbf{G} \mathbf{A}_{22}^{-1} \mathbf{A}_{21})^{-1} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
&= (\mathbf{A}_{11} - \mathbf{A}_{12}\mathbf{A}_{22}^{-1}\mathbf{A}_{21})^{-1} \\
&= \mathbf{A}^{11} \\
\mathbf{H}^{12} &= -\mathbf{H}^{11}\mathbf{H}_{12}\mathbf{H}_{22}^{-1} = \mathbf{A}^{11}\mathbf{A}_{12}\mathbf{A}_{22}^{-1}\mathbf{G}\mathbf{G}^{-1} = \mathbf{A}^{12} \\
\mathbf{H}^{21} &= \mathbf{A}^{21} \\
\mathbf{H}^{22} &= \mathbf{H}_{22}^{-1} - \mathbf{H}^{21}\mathbf{H}_{12}\mathbf{H}_{22}^{-1} \\
&= \mathbf{G}^{-1} - \mathbf{A}^{21}\mathbf{A}_{12}\mathbf{A}_{22}^{-1}\mathbf{G}\mathbf{G}^{-1} \\
&= \mathbf{G}^{-1} - (\mathbf{I} - \mathbf{A}^{22}\mathbf{A}_{22})\mathbf{A}_{22}^{-1} \\
&= \mathbf{G}^{-1} - \mathbf{A}_{22}^{-1} + \mathbf{A}^{22}\mathbf{A}_{22}\mathbf{A}_{22}^{-1} \\
&= \mathbf{A}^{22} + \mathbf{G}^{-1} - \mathbf{A}_{22}^{-1}
\end{aligned}$$

となり、次のようにまとめられる。

$$\begin{aligned}
\mathbf{H}^{-1} &= \begin{bmatrix} \mathbf{A}^{11} & \mathbf{A}^{12} \\ \mathbf{A}^{21} & \mathbf{A}^{22} + \mathbf{G}^{-1} - \mathbf{A}_{22}^{-1} \end{bmatrix} \\
&= \mathbf{A}^{-1} + \begin{bmatrix} \mathbf{0} & \mathbf{0} \\ \mathbf{0} & \mathbf{G}^{-1} - \mathbf{A}_{22}^{-1} \end{bmatrix}
\end{aligned}$$

この中で $\mathbf{G}^{-1}$ と $\mathbf{A}_{22}^{-1}$ は、ゲノム情報から構築した $\mathbf{G}$ と分子血縁行列の部分行列 $\mathbf{A}_{22}$ から地道に逆行列を求めざるを得ず、ゲノム情報を持つ個体数の三乗に比例するコストがかかる(Legarra と Ducrocq, 2012)ことから、ジェノタイプされた個体が増える将来は何らかの解決策を見出さなければならないが、 $\mathbf{A}^{-1}$ は両親の情報から簡単に構築できることから現在のところは実用的な範囲で、混合行列 $\mathbf{H}$ によりMME中の分子血縁行列 $\mathbf{A}$ を置き換えることができている。

なお実際には混合行列 $\mathbf{H}$ の作成に利用したゲノミック関係行列 $\mathbf{G}$ と分子血縁行列 $\mathbf{A}$ の集団は通常大きく異なり、 $\mathbf{A}$ の集団の中では選抜が繰り返されてきたことから $\mathbf{U}$  (単形質の場合 $\sigma_u^2$ )を適用するのは厳密には不適切かもしれない。血縁を遡る世代数の制限により、この問題は緩和できるといわれている (Misztal ら, 2013)が、未改良形質のみを対象とする分析では、あまり問題にならないかもしれない。

## 2.2.4 混合行列 $\mathbf{H}$ の調整

混合行列 $\mathbf{H}$ の構築は分子血縁行列 $\mathbf{A}$ とゲノミック関係行列 $\mathbf{G}$ に矛盾がないことが前提である。何世代にもわたる完全な血縁から構築された $\mathbf{A}$ と質の高い $\mathbf{G}$ の間ではその整合性は高く、対応する要素の差の標準偏差は0.4以下と報告されている(WangとMisztal, 2011)。しかし現実には、血縁

記録のミスや不完全な血縁、ゲノム情報の過誤による品質低下などによって 1 を超える違いも見られる。調整しない  $\mathbf{H}$  を利用した場合、分散成分の推定や反復法による計算(2.3.2 参照)がなかなか収束しない場合や、得られる GEBV が過大推定になる場合があることが報告されている(Misztal ら, 2013)。

調整のための2つのパラメータ  $\tau, \omega$  を含めた  $\mathbf{H}$  の逆行列は、次のように記述される。

$$\mathbf{H}^{-1} = \mathbf{A}^{-1} + \begin{bmatrix} \mathbf{0} & \mathbf{0} \\ \mathbf{0} & \tau(\alpha\mathbf{G} + \beta\mathbf{A}_{22})^{-1} - \omega\mathbf{A}_{22}^{-1} \end{bmatrix}$$

2.2.3 で示した  $\mathbf{H}$  の逆行列は  $\tau = 1, \omega = 1$  の場合であるが、これらを1より小さい値に設定したほうが収束がよく、 $\omega$  は不完全な血縁による  $\mathbf{A}$  と  $\mathbf{G}$  の違いを調節可能であり、 $\mathbf{H}$  を正定値にすると同時に過大推定の補正にも効果があると報告されている(Misztal ら, 2010; 2017)。また Martini ら(2018) は、 $\tau$  を 1 より大きく、 $\omega$  を 1 より小さくすることによって GEBV の分散が小さくなることを導き、過大推定に効果があることを明らかにしている。過大推定という実用上の問題もあり、混合行列  $\mathbf{H}$  の調整は精力的に研究が進められている分野であるが現在のところ、 $\tau$  と  $\omega$  の値は各研究者が経験的に決定している。

## 2.3 利用したソフトウェア

### 2.3.1 BLUPF90 と関連プログラム(BGF90)

MME の計算について研究しているジョージア大学の Misztal 教授らのグループは、BGF90(Misztal ら, 2002)という MME を解くためのパッケージプログラムに、SNP 情報を読み込んで  $\mathbf{H}$  を構築するルーチンを組み込んで公開している。以下 2.2.3 で取り上げた一般的な MME を使って、このプログラムについて説明する。

airemlf90 は制限付き最尤推定法(REML)によって分散共分散行列  $\mathbf{U}$  および  $\mathbf{E}$  を推定し、同時に  $\hat{\mathbf{b}}, \hat{\mathbf{u}}$  を得ることができるプログラムである。REML 推定量は非線形方程式の解であるため、通常は Newton-Rhapson 法またはそれに準じた方法(準 Newton 法)を利用するが、大規模データでは計算が困難である。しかし、Newton-Rhapson 法で用いるヘッセ行列(観測情報行列)と準 Newton 法である Fisher scoring 法で利用するヘッセ行列(Fisher 情報行列)を足して 2 で割った平均情報行列(average information matrix)は比較的簡単に計算できることから、このプログラムではこれをヘッセ行列とする準 Newton 法(AI-REML, Jensen ら, 1997)により REML 推定量を求めている。AI-REML は EM アルゴリズムを利用する remlf90 に比べて非常に早く収束すると同時に、

収束時の平均情報行列を漸近分散として利用することで分散成分の推定誤差分散も得ることができるが、データやモデルによっては収束が難しい。また、EM アルゴリズムを用いた REML 法のプログラムである `remlf90` は、変量回帰検定日モデルを使った場合収束に問題があると報告されている(Misztal ら, 2018)。

このため、変量回帰検定日モデルによる分散成分の推定にはギブスサンプリングを用いるのが一般的になっており(Jamrozik と Schaeffer, 1997; Lidauer ら, 2009)、本研究では変量回帰検定日モデルを使用する際、誤差分散を複数設定できる `gibbs3f90` プログラムを利用する。

分散成分が決まれば、 $\hat{\mathbf{b}}, \hat{\mathbf{u}}$  は `blupf90` プログラムによって MME を解き、求めることができる。このプログラムでは方程式のゼロでない要素をすべてメモリー上に置くことから、残念ながら大規模または複雑な方程式には大きなメモリーを要し、解くことができない場合がある。

### 2.3.2 Iteration on data

大きなメモリーを持つ計算機が安価に利用できるようになり、より大きな MME を扱うことが可能になってきているが、本研究のように地域レベルで収集された膨大な記録を用い、変量回帰モデルの MME を解くのは困難である。このため、反復法(iteration)の毎反復ごとに表現型値、重み、各効果の水準番号といったデータを読みながら方程式を構築する iteration on data という方法が使われている。

2.2.3 で示した MME を、

$$\mathbf{B}\mathbf{x} = \mathbf{c}$$

とまとめる。ただし、

$\mathbf{B}$ : 次数  $n$  の正方行列、

$\mathbf{x}, \mathbf{c}$ : 次数  $n$  のベクトル、

$\mathbf{b}_i$ :  $\mathbf{B}$  の  $i$  番目の行、

$b_{ii}$ :  $\mathbf{B}$  の  $i$  番目の対角要素、

$x_i, c_i$ :  $\mathbf{x}, \mathbf{c}$  の  $i$  番目の要素

である。反復法である Successive Over relaxation (SOR) 法は次のように表すことができる (Barrett ら, 1994)。

do until “convergence”

do  $i=1, n$

$$x_i = x_i + \lambda(c_i - \mathbf{b}_i \mathbf{x}) / b_{ii}$$

enddo

enddo

$\lambda = 1$ のときは Gauss-Seidel 法となる。 $B$ はデータごとの重みづけの総和と分散共分散行列から構築可能であるため、Iteration on data では $\mathbf{x}$ ,  $\mathbf{b}$ および $B$ の対角要素およびデータをメモリー上に置き、 $c_i - \mathbf{b}_i \mathbf{x}$ はデータを読みながら計算することで、方程式全体をメモリーに乗せる場合と比べて大幅に少ないメモリーで方程式を解くことができる。また、計算の並列化により計算速度を向上したり、方程式ではなくデータをメモリー上に置くことで、読み取りに要する時間を短くできる。しかしながら、データをディスク上にキャッシュせざるを得ない状況になると、計算時間は飛躍的に増大し、実用的な計算はほぼ不可能となる。

家畜におけるEBVの計算では近年、前処理付き共役勾配(preconditioned conjugate gradient: PGC)法によってより早く計算する研究が進み(Strandén と Lidauer, 1999; Tsuruta ら, 2001)、一般的になっている。その手順は、次の通りである。

$$n=0; \mathbf{x}_0 = \mathbf{0}; \mathbf{r}_0 = \mathbf{c} - \mathbf{B}\mathbf{x}_0; \mathbf{p}_0 = \mathbf{N}^{-1}\mathbf{r}_0; \mathbf{e}_0 = \mathbf{r}'_0\mathbf{p}_0;$$

do until “convergence”

$$n=n+1; \mathbf{w}_n = \mathbf{B}\mathbf{p}_{n-1}$$

$$\alpha_n = \mathbf{e}_{n-1} / (\mathbf{p}'_{n-1}\mathbf{w}_n)$$

$$\mathbf{x}_n = \mathbf{x}_{n-1} + \alpha_n\mathbf{p}_{n-1}$$

if mod(n, 50)=0 then

$$\mathbf{r}_n = \mathbf{c} - \mathbf{B}\mathbf{x}_n$$

else

$$\mathbf{r}_n = \mathbf{r}_{n-1} - \alpha_n\mathbf{w}_n$$

end if

$$\mathbf{w}_n = \mathbf{N}^{-1}\mathbf{r}_n$$

$$\mathbf{e}_n = \mathbf{r}'_n\mathbf{w}_n$$

$$\beta_n = \mathbf{e}_n / \mathbf{e}_{n-1}$$

$$\mathbf{p}_n = \mathbf{w}_n + \beta_n\mathbf{p}_{n-1}$$

enddo

ただし、

$\mathbf{N}$ : 前処理行列、  
 $\alpha, \beta, e$ : スカラー、  
 $\mathbf{r}, \mathbf{c}, \mathbf{p}, \mathbf{w}$ : ベクトル

である。

$\mathbf{N}$ の選択は収束に大きく影響するが、メモリーを節約することも重要であるため、家畜育種では $\mathbf{A}$ の対角要素からなる対角行列を利用するのが一般的であり、このため逆行列も容易に得ることができる。またこの手順では、 $\mathbf{r}_n = \mathbf{r}_{n-1} - \alpha_n \mathbf{w}_n$ の計算で誤差が蓄積される問題を解決するため、50回に1回、 $\mathbf{r}_n$ を再計算している。

反復法を用いてEBVを計算した場合、方程式左辺の逆行列の対角要素は計算されないことから、信頼度の計算に必要な予測誤差分散を近似的に得る必要があり、ゲノミック評価でもこうした手法が提案されている(Misztalら, 2013; Liuら, 2017)。本研究では信頼度の計算は割愛し、大規模なMMEを解くにあたり、(独)家畜改良センターの大澤氏が開発したmmefというプログラムを利用した。

## 2.4 摘要

本節では、牛のゲノミック評価の基礎と、ゲノミック評価を実装したプログラムについて説明した。利用可能なデータの飛躍的な増加に対応し、ゲノミック評価の手法は実用性を考慮しながら今後ますます発展すると思われるが、本研究ではこの後、築き上げられた基礎を基に作られた信頼できる計算用プログラムを用い、牛の未改良形質である精液性状と暑熱耐性へのゲノミック評価の応用について検討する。



## 3.黒毛和種およびホルスタイン種の精液性状に関する分析

### 3.1 緒論

世界的に、特に強い選抜を受けた乳用牛において(Lucyら, 2001)繁殖効率の低下が報告され、雌雄両方の繁殖性についての関心が高まっている。ホルスタイン種雄牛の精液性状についての先行研究がいくつか報告されている(Everettら, 1978; Mathevonら, 1998; Karouiら, 2011; Snojら, 2013; Kawakamiら, 2016)。一方、黒毛和種についてはNishimuraら(2010)が唯一の報告であり、2つの品種を同時に飼養する種雄牛センターの記録を包括的に分析した報告はない。

Sellemら(2015)は凍結精液融解後の精子の性状について、精子運動解析装置(computer-assisted semen analysis: CASA)やフローサイトメトリーを用いることで、精子の繁殖性を適切に推定できるかもしれないと報告している。Takedaら(2015)は、末端トランスフェラーゼによってDNA断片化を標識する方法(TUNEL法)による精子のDNA損傷に関する評価が、受胎率推定の補足指標になりうることを報告している。CASAなどの新しい技術を利用した長期の時系列データは現在のところ利用できないが、これらの報告から、雄側繁殖性の向上が受胎率の向上などの繁殖成績改善に役立つ可能性が示唆される。

ゲノミックの時代となり、ゲノムワイドマーカーに基づく選抜が乳用牛育種、特に繁殖形質のように遺伝率が低い形質において成功をおさめている(García-Ruizaら, 2016)。しかしながら、ゲノムワイドマーカーを用いた精液性状に関する研究は行われていない。そこで本研究では、効率的かつ効果的な精液生産実現のため、また、種雄牛選抜の仕組みで考慮することによって繁殖性向上を実現するため、精液性状に関する遺伝的パラメータや環境効果について包括的に分析する。

### 3.2 材料と方法

#### 3.2.1 表現型記録

(一社)家畜改良事業団が所有し、全国4か所の種雄牛センターで飼養した種雄牛の精液性状に関する4形質、すなわち、精液量(ml; VOL)、精子活力(活発な前進運動を行う精子の割合%; MOT, 畜産技術協会, 2004)、適切にキャリブレーションされた分光光度計を用いて得た精液濃度に精液量をかけて得た精子数( $\times 10^8$ 個; NUM)、凍結融解後の精子活力(%; A-MOT)の記録を表現型記録として用いた。VOL、MOT、精液濃度は採精直後に計測されている。ホルスタイン

種については1971年以降、黒毛和種については1981年以降2015年4月までの記録が利用可能であった。

牛の健康管理のため、採精、凍結、融解は遺伝的能力が判明する前の待機種雄牛を含めて定期的に行われている。しかしながら採精された一部の精液は低活力あるいは在庫管理のため廃棄されている。また、1日に一頭の牛から採取した精液は凍結前に混合されるが、この過程で活性が60に満たない精液は、融解後低品質となる精液生産を防ぐために廃棄されている。本研究では、同一日に記録された複数の記録について、VOLとNUMについては総和、MOTについては平均値を使って1日の記録としている。

本研究で用いた2,065頭のホルスタイン種および808頭の黒毛和種の表現型値について、表3.1に示す。MOTとA-MOTの記録数の差は、採精された精液の廃棄によって生じている。低活力の精液の廃棄により、分析結果全体に偏りを生む可能性がある。このため、多形質モデルによる分析ではA-MOTを含む分析と、これを含まない分析を行い、MOTのGEBVを比較した。

記録の採用条件は次のとおりである。

- 1) 採精間隔(前回採精からの日数)3~7日
- 2) 採精時年齢1~8歳
- 3) 採精年月と種雄牛センターからなる同期グループ内の記録数が10件以上。

表 3.1 記録の概要

形質 <sup>1</sup>	ホルスタイン種					
	1-8 歳			1-3 歳		
	記録数	平均	標準偏差	記録数	平均	標準偏差
VOL, ml	126,395	10.3	4.13	53,254	8.91	3.90
MOT, %	126,395	79.1	8.36	53,254	78.5	8.93
NUM, × 10 <sup>8</sup>	126,395	123	63.2	53,254	104.8	63.5
A-MOT, %	109,383	43.6	7.97	45,561	43.2	8.32
形質 <sup>1</sup>	黒毛和種					
	1-8 歳			1-3 歳		
	記録数	平均	標準偏差	記録数	平均	標準偏差
VOL, ml	60,851	8.41	3.47	27,654	6.97	2.85
MOT, %	60,851	79.6	5.95	27,654	79.0	6.52
NUM, × 10 <sup>8</sup>	60,851	88.5	38.2	27,654	77.0	36.7
A-MOT, %	56,259	41.6	6.65	25,483	40.7	6.86

<sup>1</sup> VOL = 精液量, MOT = 精子活力, NUM = 精子数, A-MOT = 凍結融解後の精子活力

### 3.2.2 マーカー遺伝子型

(一社)家畜改良事業団が所有する、Illumina Bovine SNP50 BeadChip version 1 および2を用いてジェノタイピングした 1,258 頭のホルスタイン種および 824 頭の黒毛和種雄牛の遺伝子型を用いた。これらの個体のコールレイトは 0.98 を超えている。常染色体上のマーカーは、コールレイト(0.9 以上)、マイナーアレル頻度(0.01 以上)、ハーディ・ワインベルグ平衡のカイ二乗検定 P 値(0.01 以上)により選定し(Onogi ら, 2014)、利用したマーカー数はホルスタイン種については 41,558 マーカー、黒毛和種については 38,374 マーカーとなった。

### 3.2.3 統計学的分析

ホルスタイン種と黒毛和種の記録は別々に分析した。本研究で利用したアニマルモデルは次の通りである。

$$Y_{ijklmn} = YMC_{ij} + A_{ik} + I_{il} + b_i F_m + pe_{im} + u_{im} + e_{ijklmn}$$

ただし、

$Y_{ijklmn}$ は採精年月と種雄牛センターからなるj番目の同期グループにおいて、種雄牛mの年齢k(1~8歳)、採精間隔l(1~5が3~7日に相当)で得られた、形質i(1から4の順にVOL、MOT、NUM、A-MOTに相当)のn番目の記録、 $YMC_{ij}$ は形質iに関する季節と飼養管理等の影響を補正するj番目の同期グループの母数効果、

$A_{ik}$ は形質iに関する採精時年齢kの母数効果、

$I_{il}$ は形質iに関する採精間隔lの母数効果、

$b_i$ は形質iに関する近交係数の母数一次回帰係数、

$F_m$ は種雄牛mの近交係数、

$pe_{im}$ は形質iに関する種雄牛mの恒久的環境効果(PE: 変量)、

$u_{im}$ は形質iに関する種雄牛mの(G)EBV(変量)、

$e_{ijklmn}$ は残差の変量効果

である。

各種雄牛センターにおいて採精、凍結などを行う技術者の情報は利用できなかった。しかし(一社)家畜改良事業団の技術者は、統一のマニュアルに従って採精と凍結精液生産についてよく訓練されていることから、技術者の効果は様々な環境や管理効果の一部として、同期グルー

プの効果に含まれているものと仮定した。この点は本研究の制限要因となり得ることに注意する必要がある。近交係数は R の pedigree ライブラリー(Coster, 2015)を利用し、(一社)日本ホルスタイン登録協会から提供を受けたすべての利用可能な血縁情報に基づいて計算した。一方、MME で利用する分子血縁行列は、表現型または遺伝子型記録を持つ種雄牛から最低 5 代までさかのぼって作成した。表現型または遺伝子型記録を持つ種雄牛の概要を表 3.2 に示す。

表 3.2 種雄牛の概要

種類	ホルスタイン種	黒毛和種
表現型と遺伝子型の両方	1163	797
表現型のみ	902	11
遺伝子型のみ	95	27

分散成分およびモデル中の各効果の推定値は、BLUPF90 ファミリー(Misztal ら, 2002)の airemlf90 プログラムによって得た。遺伝率( $h^2$ )、遺伝相関、反復率の予測誤差分散は平均情報行列の逆行列を用いて計算した。本研究の黒毛和種の分析では、ほとんどすべての種雄牛が表現型と遺伝子型の両方を持っているが、ホルスタイン種は半分より少し少ない種雄牛が遺伝子型情報を持っていない。これらの牛のほとんどは古い牛だが、遺伝的趨勢の検討には必要となる。利用可能な表現型と遺伝子型の情報を有効に利用するため、本研究では分子血縁行列とゲノミック関係行列から作成した混合行列  $\mathbf{H}$  の逆行列を利用する、シングルステップ GBLUP (ss-GBLUP) 法によって分析した。混合行列  $\mathbf{H}$  の逆行列を作成する際のパラメータは、 $\alpha = 0.95$ 、 $\beta = 0.05$ 、 $\tau = \omega = 1$  の既定値とした。

分散共分散構造は、次のように表すことができる。

$$\text{Var} \begin{bmatrix} \mathbf{pe} \\ \mathbf{u} \\ \mathbf{e} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mathbf{I} \otimes \mathbf{P} & \mathbf{0} & \mathbf{0} \\ \mathbf{0} & \mathbf{H} \otimes \mathbf{U} & \mathbf{0} \\ \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{I} \otimes \mathbf{R} \end{bmatrix}$$

ただし、

$$\mathbf{pe} = \begin{bmatrix} pe_{11} \\ \vdots \\ pe_{1m} \\ \vdots \\ pe_{41} \\ \vdots \\ pe_{4m} \\ \vdots \end{bmatrix}, \quad \mathbf{u} = \begin{bmatrix} u_{11} \\ \vdots \\ u_{1m} \\ \vdots \\ u_{41} \\ \vdots \\ u_{4m} \\ \vdots \end{bmatrix}, \quad \mathbf{e} = \begin{bmatrix} e_{11111} \\ \vdots \\ e_{1jklm} \\ \vdots \\ e_{41111} \\ \vdots \\ e_{4jklm} \\ \vdots \end{bmatrix}, \quad \mathbf{P} = \begin{bmatrix} \sigma_{pe_1}^2 & \sigma_{pe_1pe_2} & \sigma_{pe_1pe_3} & \sigma_{pe_1pe_4} \\ & \sigma_{pe_2}^2 & \sigma_{pe_2pe_3} & \sigma_{pe_2pe_4} \\ & & \sigma_{pe_3}^2 & \sigma_{pe_3pe_4} \\ & & & \sigma_{pe_4}^2 \\ & \text{sym.} & & \end{bmatrix},$$

$$U = \begin{bmatrix} \sigma_{u_1}^2 & \sigma_{u_1u_2} & \sigma_{u_1u_3} & \sigma_{u_1u_4} \\ & \sigma_{u_2}^2 & \sigma_{u_2u_3} & \sigma_{u_2u_4} \\ & & \sigma_{u_3}^2 & \sigma_{u_3u_4} \\ sym. & & & \sigma_{u_4}^2 \end{bmatrix}, \quad R = \begin{bmatrix} \sigma_{e_1}^2 & \sigma_{e_1e_2} & \sigma_{e_1e_3} & \sigma_{e_1e_4} \\ & \sigma_{e_2}^2 & \sigma_{e_2e_3} & \sigma_{e_2e_4} \\ & & \sigma_{e_3}^2 & \sigma_{e_3e_4} \\ sym. & & & \sigma_{e_4}^2 \end{bmatrix},$$

$I$ は単位行列、

⊗ は2つの行列のクロネッカー積を作成する演算子

である。

予備分析としては A-MOT の利用だけでなく、検定済みとなった後の記録の利用、即ち、後代検定によって判明した遺伝的能力に基づく淘汰によって偏りが生じていないかどうかを検討する必要がある。そこで前者については、A-MOT を含む 4 形質の多形質モデルで得られた GEBV と、これを含まない 3 形質の多形質モデルで得られた GEBV を信頼度の違いを考慮するためにそれぞれ de-regress し、MOT の GEBV の違いに一定の傾向が見られないかを検討した。後者については、1～3歳の採精記録と4～8歳の採精記録を別形質とし、精液性状 4 形質別に、冒頭で示したものと同様のモデルによって遺伝相関を推定し、その結果から2つの年齢グループの記録を単一記録として一度に使用するかどうかを判断した。予備分析の結果から、A-MOT を利用し、年齢は 1～3 歳の採精記録に限って分析を行うこととした。

GEBV の de-regress には、Rozzi と Schaeffer (1996)のサイヤモデルに基づくインターブルが実施する国際種雄牛評価向けの方法をアニマルモデルによる計算用に改変して適用し、重みづけにはこの報告の娘牛数の代わりに GEBV の信頼度を用いた。

ホルスタイン種については 1981 年以降、黒毛和種については 1994 年以降の同期グループ効果の推定値について、年、月あるいは種雄牛センターごとに平均値と標準偏差を計算し、精液生産に影響する環境効果について検討した。特に月ごとの平均値については、各種雄牛センターの最寄りの気象官署で計測された、月ごとの気温または湿度との比較を行った。YMC<sub>ij</sub>、A<sub>ij</sub>および I<sub>ik</sub>の各母数効果のベースはそれぞれ、1995 年、1 歳、3 日とした。GEBV の遺伝ベースは 2010 年以前の最も多くの種雄牛の生年が属する年とし、ホルスタイン種については 2005 年、黒毛和種については 1996 年生まれの種雄牛 GEBV の平均値をゼロとした。遺伝的趨勢は、各生年生まれの種雄牛 GEBV の平均値を時系列で示した。

ss-GBLUP 法の予測能力を t-BLUP 法と比較するため、直近2年間(2013 年 5 月～2015 年 4 月)の記録を削除した部分データセットを作成し、それぞれ全データセットで推定したものと同じ分散成分を適用し、blupf90 プログラムによって GEBV および t-BLUP 法による EBV を得た。全デ

ータセットには表現型記録が存在するが、部分データセットには表現型記録が存在しない種雄牛は、ホルスタイン種が 190 頭、黒毛和種が 31 頭存在し、これらを検証種雄牛群として次の 4 通りの相関係数によって育種価の予測能力を検討した。

- 1) 全データセットによる de-regressed GEBV と部分データセットによる de-regressed GEBV、
- 2) 全データセットによる de-regressed GEBV と部分データセットによる de-regressed EBV、
- 3) 全データセットによる de-regressed EBV と部分データセットによる de-regressed GEBV、
- 4) 全データセットによる de-regressed EBV と部分データセットによる de-regressed EBV、

### 3.3 結果

#### 3.3.1 若雄以外の記録と凍結融解後の精子活力の記録採用

若雄の記録とそれ以降の記録の間には中程度から高い遺伝相関がみられた。VOL と MOT の遺伝相関は NUM や A-MOT に比べて小さかった(表 3.3)。

採精された精液の一部が低活力を原因として廃棄される場合、事前選抜によって遺伝的能力の劣る牛の記録がより多く廃棄されていれば、その A-MOT の GEBV が高めに推定されるだけでなく、モデル中の遺伝的な相関関係を通じて他の形質にも偏りを生じる可能性がある。しかしながら、A-MOT の記録を採用しない場合、MOT の de-regressed GEBV が全体的には少し小さくなるものの、MOT について A-MOT の記録が欠けている牛とそうでない牛の GEBV の差を比較した場合、両者に大きな違いはない(表 3.4)。また、de-regressed GEBV の差と A-MOT の記録欠落との間にも規則性は見られなかった(図 3.1)。

表 3.3 1～3歳の採精記録と4～8歳の採精記録の間の遺伝相関

	VOL <sup>1</sup>	MOT <sup>2</sup>	NUM <sup>3</sup>	A-MOT <sup>4</sup>
ホルスタイン種	0.847±0.067	0.730±0.178	0.947±0.040	0.955±0.088
黒毛和種	0.695±0.167	0.636±0.334	0.944±0.100	0.927±0.080

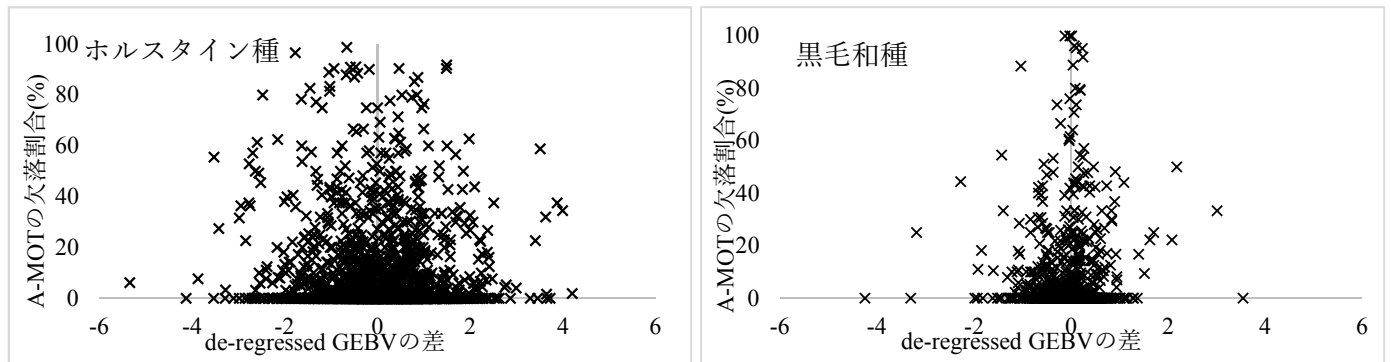
<sup>1</sup> VOL = 精液量、<sup>2</sup> MOT = 精子活力、<sup>3</sup> NUM = 精子数、<sup>4</sup> A-MOT = 凍結融解後の精子活力

表 3.4 A-MOT<sup>1</sup>を含むモデルと含まないモデル間の、de-regressed GEBV (1～3歳の種雄牛の MOT<sup>3</sup>(%))<sup>2</sup> の差

		種雄牛数	平均	標準偏差
ホルスタイン種	種雄牛 1 <sup>4</sup>	1197	-0.221	0.609
	種雄牛 2 <sup>5</sup>	1070	-0.275	0.795
黒毛和種	種雄牛 1 <sup>4</sup>	341	-0.088	0.609
	種雄牛 2 <sup>5</sup>	467	-0.098	0.659

<sup>1</sup> A-MOT = 凍結融解後の精子活力、<sup>2</sup> de-regressed GEBV (A-MOTを含む) - de-regressed GEBV (A-MOTを含まない)、<sup>3</sup> MOT = 精子活力、<sup>4</sup> 種雄牛 1 = A-MOT の記録欠落がある種雄牛、<sup>5</sup> 種雄牛 2 = A-MOT の記録欠落がない種雄牛

図 3.1. A-MOT<sup>1</sup>を含むモデルと含まないモデル間の、A-MOT の記録の欠落割合と MOT<sup>2</sup> の de-regressed GEBV の差<sup>3</sup>



<sup>1</sup> A-MOT = 凍結融解後の精子活力、<sup>2</sup> MOT = 精子活力、<sup>3</sup> de-regressed GEBV (A-MOT を含む) - de-regressed GEBV (A-MOT を含まない)

### 3.3.2 遺伝的パラメータ

遺伝率、遺伝相関、表現型相関および反復率を表 3.5 に示す。推定値は品種によって異なるが、遺伝率は中程度で他の経済的に重要な形質(Suzuki と Van Vleck, 1994; Pereira ら, 2001; Inoue ら, 2011; Nogi ら, 2011)と同様であった。MOT と A-MOT の遺伝相関は高かった。

表 3.5 1~3歳の雄牛の遺伝率(対角)、遺伝相関(上三角)、表型相関(下三角)および反復率(rep)

形質	ホルスタイン種							
	VOL <sup>1</sup>		MOT <sup>2</sup>		NUM <sup>3</sup>		A-MOT <sup>4</sup>	
VOL <sup>1</sup>	0.159	(0.022)	0.165	(0.146)	0.475	(0.084)	0.031	(0.124)
MOT <sup>2</sup>	0.047	(0.024)	0.091	(0.026)	0.205	(0.146)	0.932	(0.038)
NUM <sup>3</sup>	0.545	(0.016)	0.230	(0.022)	0.143	(0.021)	-0.032	(0.131)
A-MOT <sup>4</sup>	0.013	(0.025)	0.566	(0.017)	0.078	(0.024)	0.146	(0.030)
rep	0.355	(0.010)	0.565	(0.009)	0.304	(0.009)	0.498	(0.010)
形質	黒毛和種							
	VOL <sup>1</sup>		MOT <sup>2</sup>		NUM <sup>3</sup>		A-MOT <sup>4</sup>	
VOL <sup>1</sup>	0.175	(0.036)	0.435	(0.157)	0.685	(0.084)	0.305	(0.159)
MOT <sup>2</sup>	0.124	(0.027)	0.081	(0.022)	0.549	(0.127)	0.897	(0.071)
NUM <sup>3</sup>	0.661	(0.020)	0.274	(0.024)	0.181	(0.035)	0.356	(0.146)
A-MOT <sup>4</sup>	0.074	(0.032)	0.279	(0.023)	0.097	(0.031)	0.123	(0.030)
rep	0.467	(0.016)	0.265	(0.013)	0.425	(0.016)	0.345	(0.015)

<sup>1</sup> VOL = 精液量、<sup>2</sup> MOT = 精子活力、<sup>3</sup> NUM = 精子数、<sup>4</sup> A-MOT = 凍結融解後の精子活力

### 3.3.3 母数効果の推定値

ss-GBLUP 法で推定した同期グループ効果の年次的変化を図 3.2 に示す。年内の値のばらつきにより、規則的な傾向をつかむのは困難だが、ホルスタイン種および黒毛和種の両方において近年、若干の改善が MOT および A-MOT に見られる。同期グループ効果の季節的な変化と、

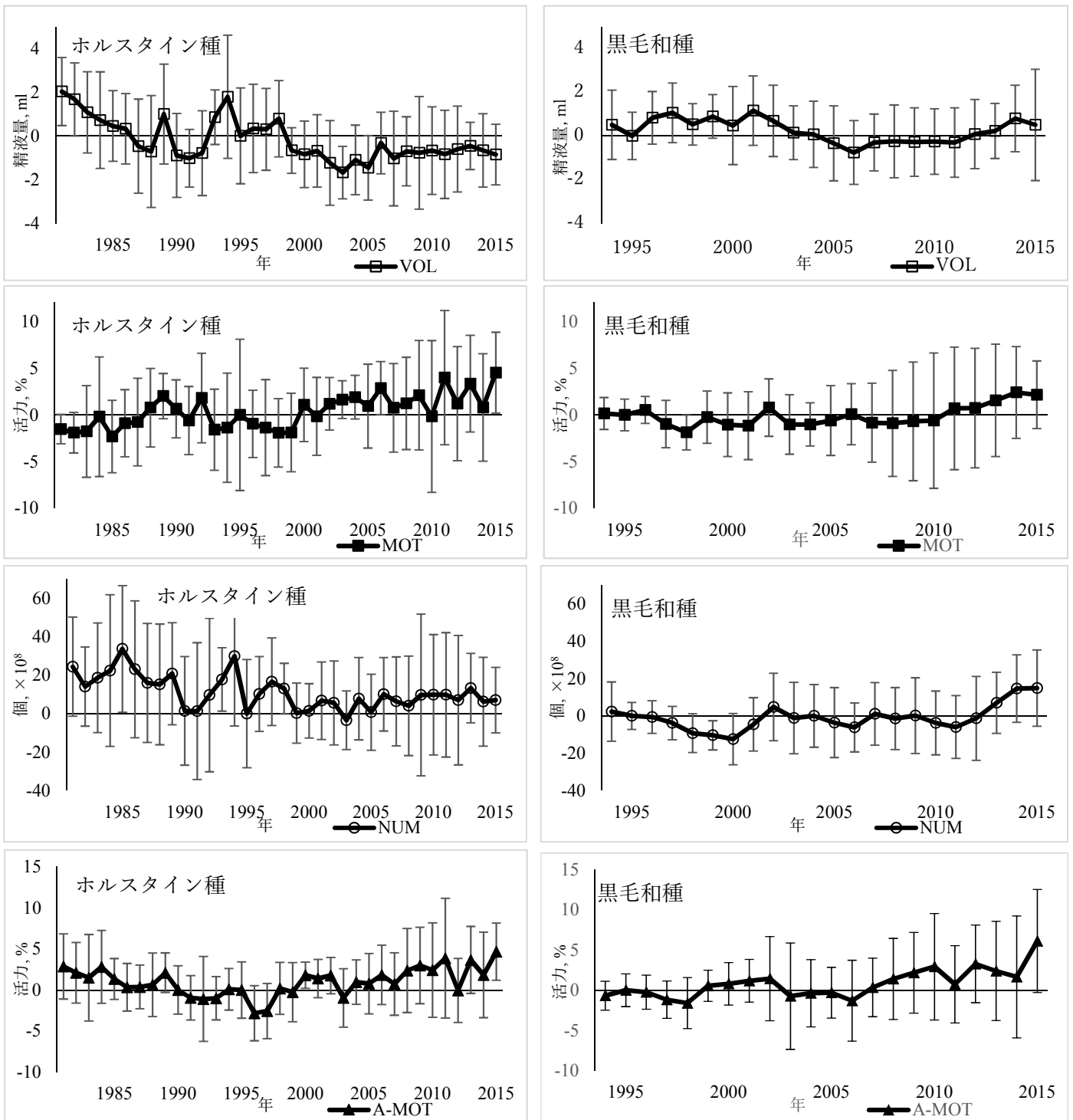
対応日に最寄りの気象官署で記録された気温と湿度の月平均を図 3.3 に示す。ホルスタイン種と黒毛和種では記録の収集年がそれぞれ 1981～2015 年、1994～2015 年と異なるが、気温と湿度の月平均は同様であった。年次的変化と同様、月内の値のばらつきによって規則的な傾向をつかむのは困難だが、一般的にホルスタイン種の値の変化は黒毛和種より大きい。MOT と A-MOT は夏場に若干低く、冬場に若干高くなるが、そうした気温や湿度の変化との関係は黒毛和種に比べてホルスタイン種でより明確にみられる。MOT および A-MOT の平均値の最大月と最小月の差は、ホルスタイン種でそれぞれ 2.26%(4 月-8 月)および 2.62%(3 月-7 月)だが、黒毛和種ではそれぞれ 1.12%(5 月-7 月)および 1.50%(12 月-8 月)であった。また、それらの値は同期グループ効果全体の標準偏差(MOT および A-MOT について、ホルスタイン種でそれぞれ 4.80%および 4.55%、黒毛和種でそれぞれ 4.09%および 4.33%)と比べて小さかった。

年齢の効果の推定値を図 3.4 に示す。VOL、MOT および NUM についてはホルスタイン種と黒毛和種の両方で、年齢と性成熟に従って大きくなる傾向が見られる。採精間隔の効果の推定値を図 3.5 に示す。ホルスタイン種と黒毛和種の両方で、採精間隔が伸びるにつれて VOL と NUM は大きくなるが、A-MOT は小さくなる傾向が見られた。

今回分析した表現型記録を持つ種雄牛の近交係数は、ホルスタイン種が  $4.5 \pm 2.9$ 、黒毛和種が  $11.3 \pm 7.5$  であり、黒毛和種の値はホルスタイン種の2倍を超えている。ホルスタイン種においては近交係数の上昇傾向が見られる。近交係数の上昇に伴う近交退化の推定値を表 3.6 に示す。この値は両品種のすべての形質で負であった。

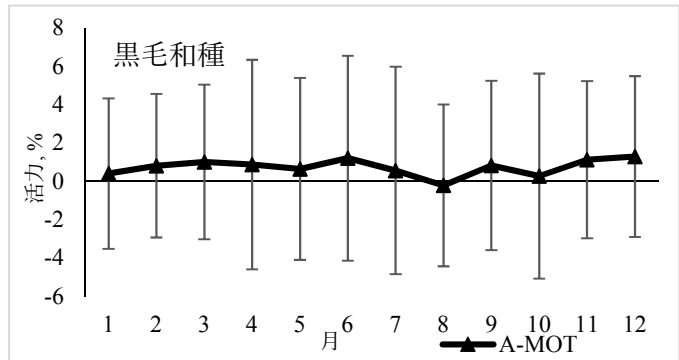
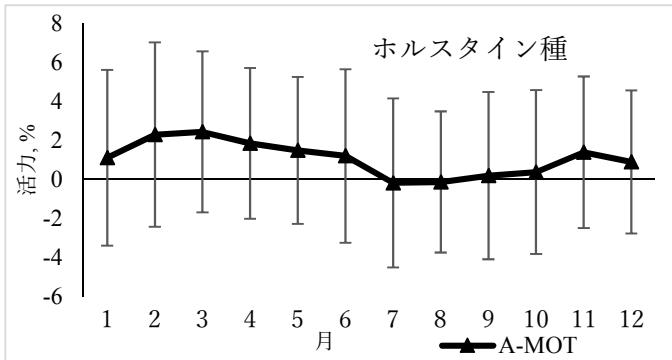
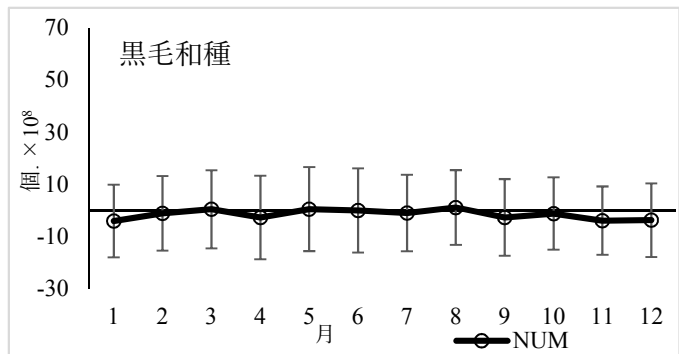
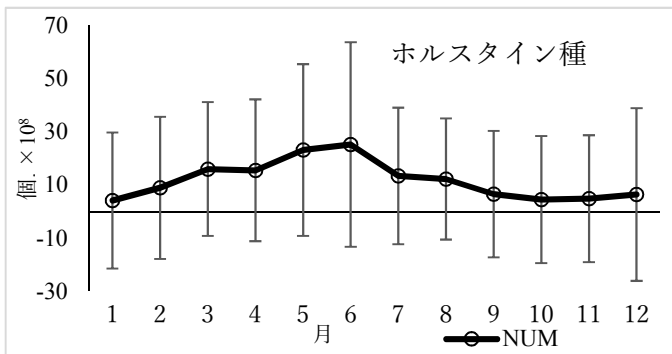
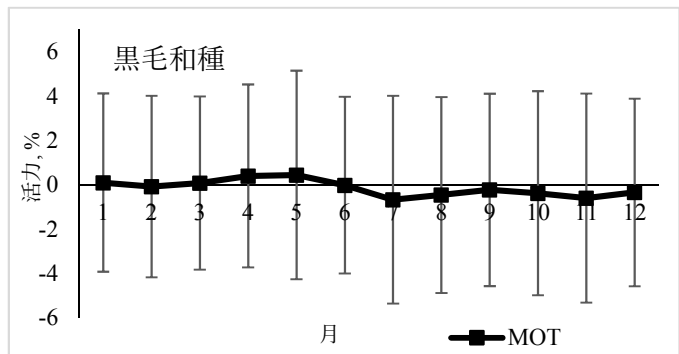
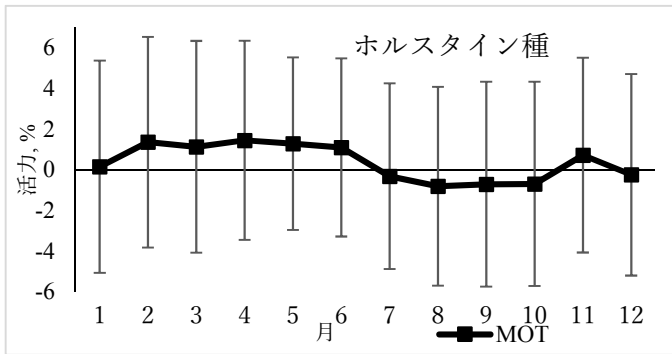
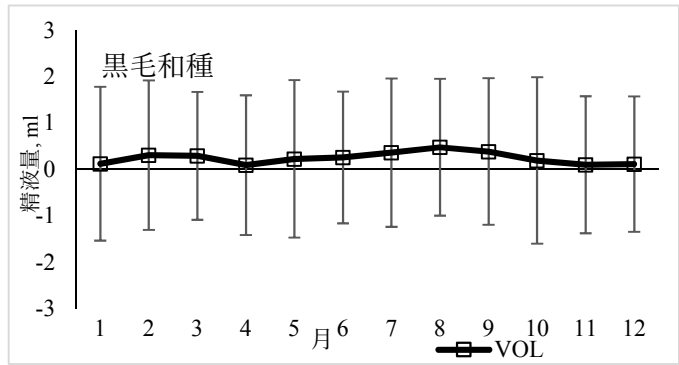
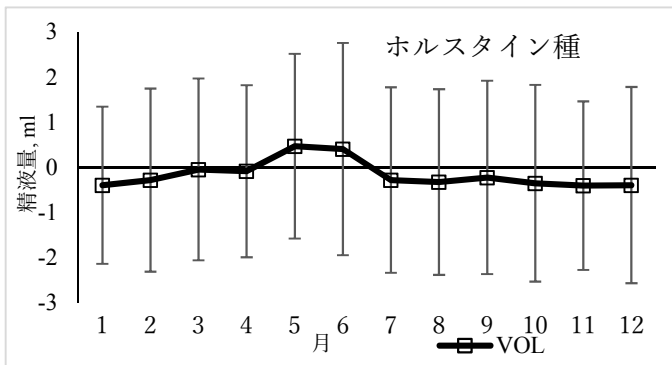


図 3.2 同期グループ効果の年次的変化



同期グループ効果の推定値の平均をマーカー、標準偏差を上下の線で表した。各品種の1995年の平均値をベースとしてゼロで表した。VOL = 精液量、MOT = 精子活力、NUM = 精子数、A-MOT = 凍結融解後の精子活力。

図 3.3 A. 同期グループ効果の季節的变化



B. 気温と湿度の季節的变化

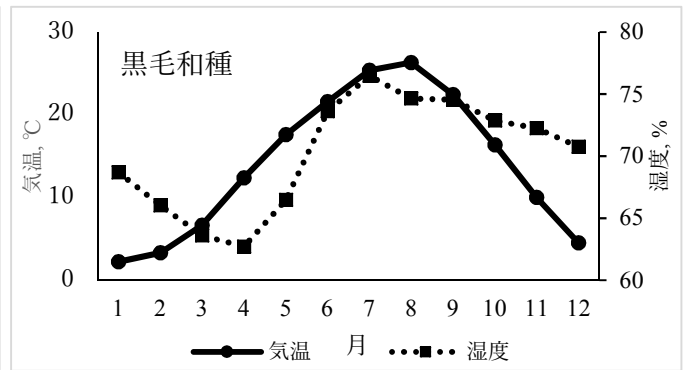
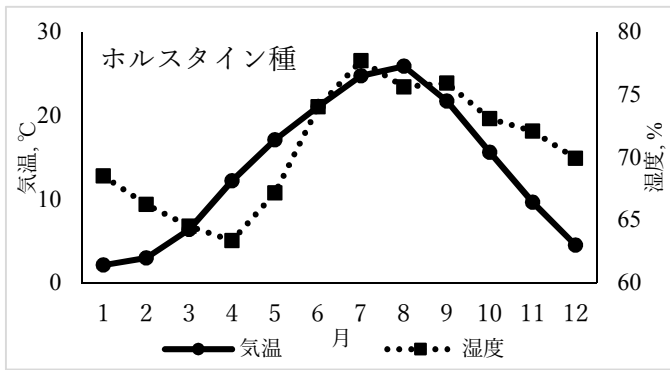
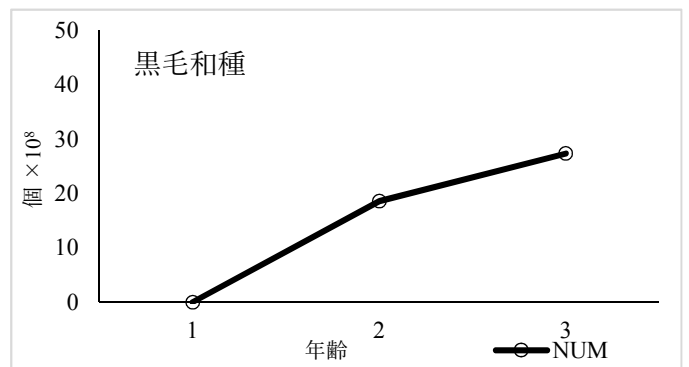
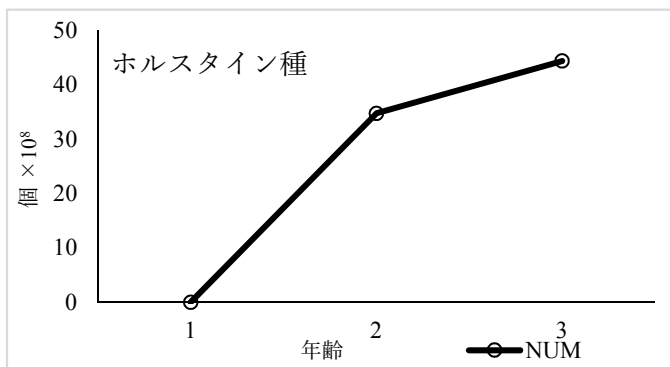
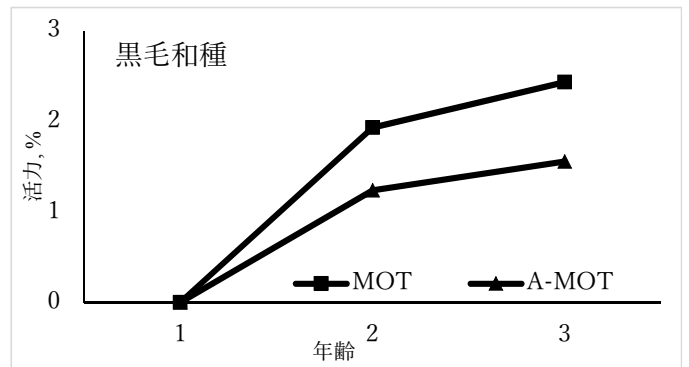
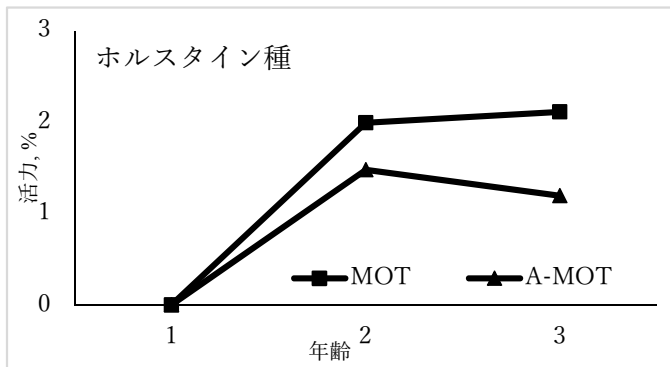
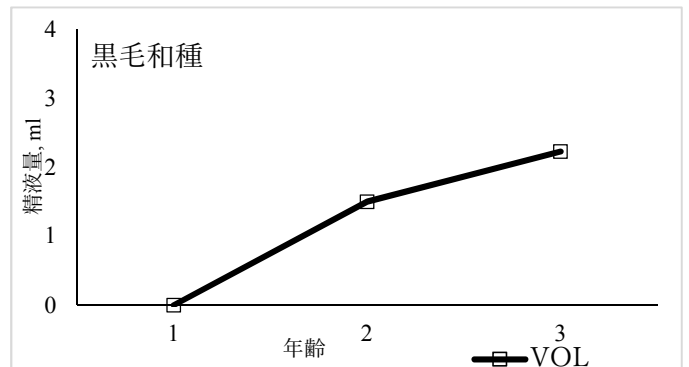
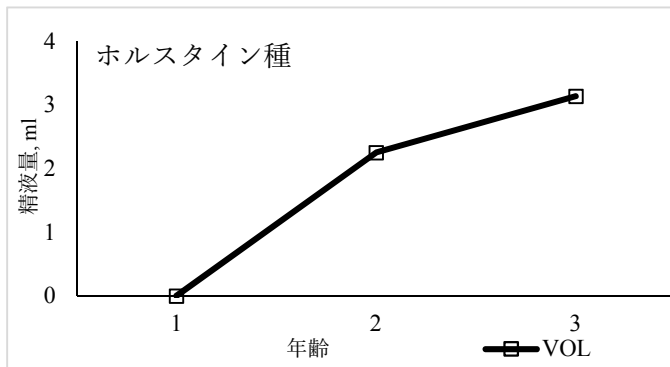
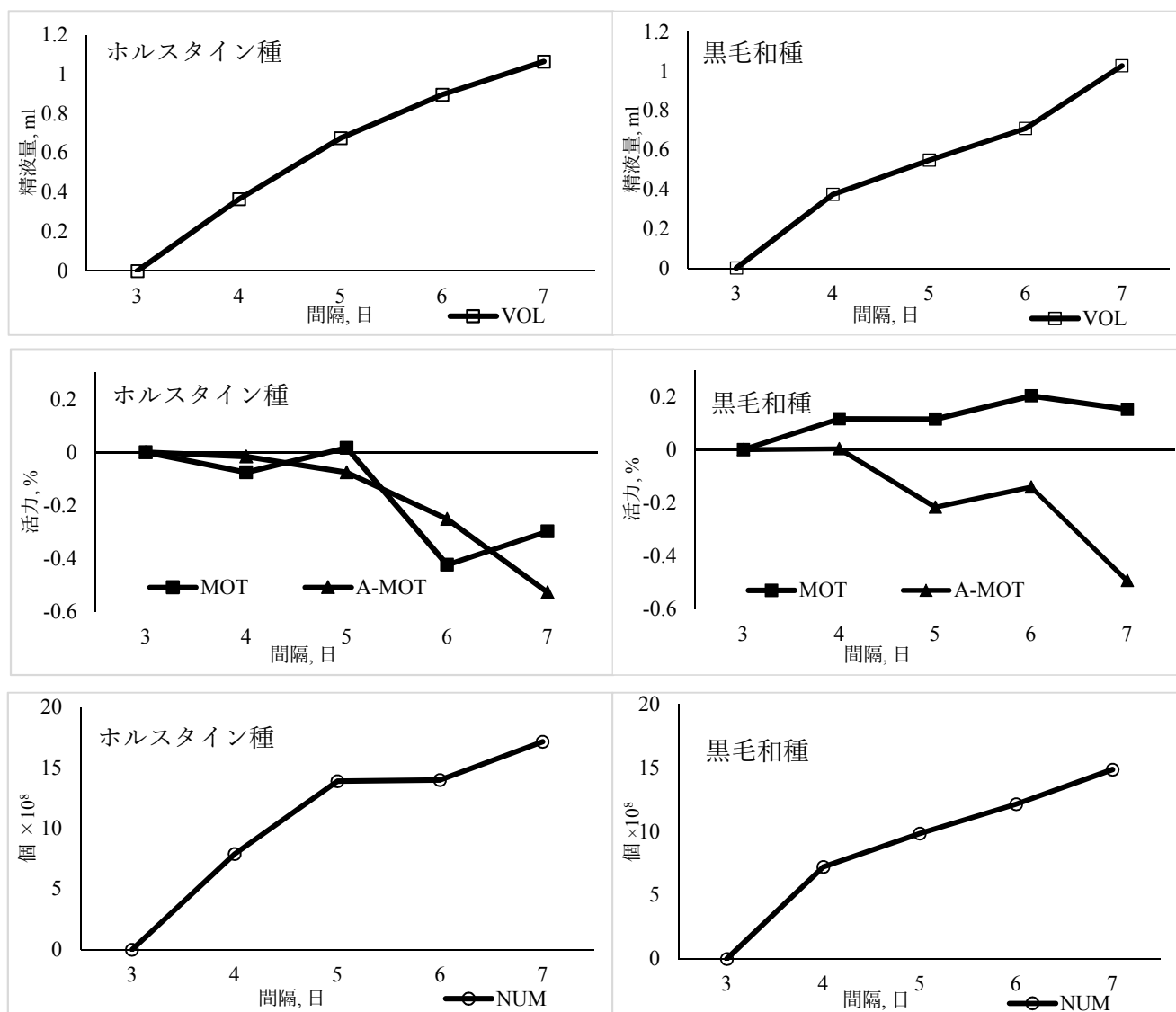


図 3.4. 採精時年齢の効果



各品種の1歳の推定値をベースとしてゼロで表した。VOL = 精液量、MOT = 精子活力、NUM = 精子数、A-MOT = 凍結融解後の精子活力。

図 3.5 採精間隔の効果



各品種の3日の推定値をベースとしてゼロで表した。VOL = 精液量、MOT = 精子活力、NUM = 精子数、A-MOT = 凍結融解後の精子活力。

表 3.6 近交退化<sup>1</sup>と1~3歳の種雄牛の近交係数

形質 <sup>2</sup>	ホルスタイン種	黒毛和種
VOL, ml	-0.005	-0.003
MOT, %	-0.176	-0.097
NUM, $\times 10^8$	-0.758	-0.424
A-MOT, %	-0.151	-0.086
近交係数, % (平均 $\pm$ 標準偏差)	4.5 $\pm$ 2.9	11.3 $\pm$ 7.5

<sup>1</sup> 近交係数 1%あたりの表現型値の変化。

<sup>2</sup> VOL = 精液量、MOT = 精子活力、NUM = 精子数、A-MOT = 凍結融解後の精子活力。

### 3.3.4 遺伝的効果

年あたりの種雄牛頭数を考慮し、ホルスタイン種については 1980 年、黒毛和種については 1990 年以降に生まれた牛について、ss-GBLUP 法で得た遺伝的趨勢を図 3.6 に示す。両品種について負の遺伝的趨勢が見られた。

### 3.3.5 ss-GBLUP 法の育種価予測能力

全データセットにのみ記録を持つ、ホルスタイン種 190 頭、黒毛和種 31 頭の種雄牛を検証牛群とし、育種価の予測能力を全データセットまたは部分データセットから得た検証牛群の de-regressed EBV または de-regressed GEBV の相関係数により示した(表 3.7)。4 つの比較の中で ss-GBLUP 法で推定した de-regressed GEBV の予測能力が両品種のすべての形質において最も高かった。全データセットで得た全種雄牛の de-regressed EBV と de-regressed GEBV の相関は両品種のすべての形質で 0.8 を超えている。

表 3.7 育種価の予測能力<sup>1</sup>

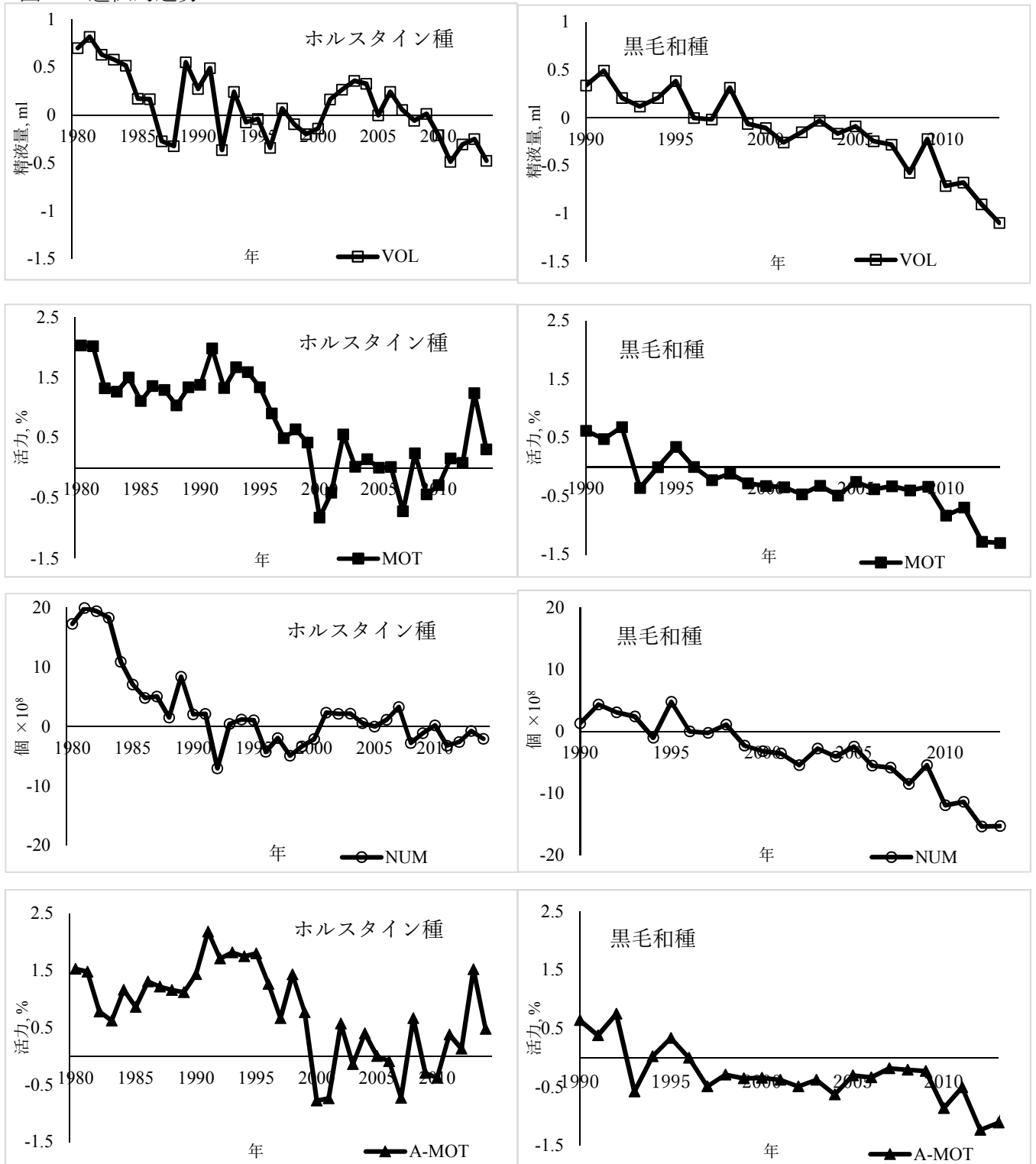
推定方法	ホルスタイン種							
	VOL <sup>3</sup>		MOT <sup>4</sup>		NUM <sup>5</sup>		A-MOT <sup>6</sup>	
	EBV	GEBV	EBV	GEBV	EBV	GEBV	EBV	GEBV
t-BLUP	0.194	0.317	0.198	0.190	0.307	0.359	0.140	0.161
ss-GBLUP	0.204	<b>0.640</b>	0.056	<b>0.367</b>	0.205	<b>0.624</b>	0.086	<b>0.408</b>
全種雄牛 <sup>2</sup>	0.844		0.878		0.827		0.867	
推定方法	黒毛和種							
	VOL <sup>3</sup>		MOT <sup>4</sup>		NUM <sup>5</sup>		A-MOT <sup>6</sup>	
	EBV	GEBV	EBV	GEBV	EBV	GEBV	EBV	GEBV
t-BLUP	0.457	0.360	0.529	0.636	0.181	0.204	0.593	0.667
ss-GBLUP	0.346	<b>0.568</b>	0.496	<b>0.728</b>	0.164	<b>0.560</b>	0.507	<b>0.724</b>
全種雄牛 <sup>2</sup>	0.909		0.915		0.853		0.913	

<sup>1</sup> 直近2年(2013年5月～2015年4月)の記録を削除し、部分データセットを作成した。全データセットにのみ記録を持つ、ホルスタイン種 190 頭、黒毛和種 31 頭の種雄牛を検証牛群とした。予測能力は全データセットまたは部分データセットから得た検証牛群の de-regressed EBV または de-regressed GEBV の相関係数により示した。したがって、各形質について 4 通り (2 x 2) の値を示し、そのうち最大のものを太字で示した。

<sup>2</sup> 全データセットで得た全種雄牛の de-regressed EBV と de-regressed GEBV の相関。<sup>3</sup>VOL = 精液量、<sup>4</sup>MOT = 精子活力、

<sup>5</sup>NUM = 精子数、<sup>6</sup>A-MOT = 凍結融解後の精子活力。

図 3.6 遺伝的趨勢



ホルスタイン種については2005年、黒毛和種については1996年生まれの種類雄牛 GEBV の平均値をベースとしてゼロで表した。VOL = 精液量、MOT = 精子活力、NUM = 精子数、A-MOT = 凍結融解後の精子活力。

## 3.4 考察

### 3.4.1 若雄以外の記録と凍結融解後の精子活力の記録採用

高い遺伝相関が推定された NUM と A-MOT については若雄牛と成熟雄牛の記録を同一形質(=遺伝相関1)とみなした反復モデルを適用可能であると考えられるが、VOL と MOT については適用困難であると考えられる。遺伝相関に関する仮定が成り立つのであれば、成熟雄牛の記録利用は GEBV の信頼度向上に貢献することから、偏りを生じない限りできるだけ多くの形質を多形質モデルに取り込むことが望ましく、VOL と MOT については年齢別に別の形質と考えることも可能かもしれない。しかしモデルが複雑化し、複数の似た形質を取り込むことによって遺伝的パラメータの推定が困難になる恐れもある。

ゲノミック評価による選抜が行われると、より若齢で種雄牛の選抜が行われる。言い換えれば将来、若齢牛の評価が成熟牛より重要になるとともに、成熟牛の記録は少なくなる。

事前選抜された A-MOT の記録を利用することについて、Mayer と Thompson (1984)、Sorensen と Kennedy (1984)、Schaeffer (1987)といった多くの先行研究が、すべての選抜に用いた記録を利用することで偏りのない分散成分と育種価推定が推定可能であると報告している。更に、多形質モデルによって偏りが補正される可能性もあるが、実際本研究では、A-MOT を利用した場合と利用しなかった場合の GEBV を比較し、規則的な変化は認められなかった。A-MOT の記録を利用しない場合、情報の欠落によって MOT の遺伝率はさらに低く推定される可能性もある。

以上から本研究では、1～3 歳の採精記録に基づき、A-MOT を含めた多形質モデルによる分析が実用的かつ適当と判断した。

### 3.4.2 遺伝的パラメータ

t-BLUP 法による精液性状の遺伝的パラメータは、先行研究においていくつか報告されている。本研究とは異なる日本の種雄牛センターでの記録を用いたホルスタイン種の分析を行った Kawakami ら(2016)は、VOL、MOT、NUM および A-MOT の遺伝率/反復率を 0.12/0.25、0.11/0.62、0.06/0.16 および 0.20/0.72 と報告している。スペインのホルスタイン種について Karoui ら(2011)は VOL、MOT、NUM および A-MOT の遺伝率/反復率を 0.22/0.31、0.09/0.35、0.18/0.27 および 0.22/0.45 と報告している。Mathevon ら(1998)はカナダの若雄牛について VOL、MOT および NUM の遺伝率/反復率を 0.24/0.45、0.31/0.53 および 0.38/0.41、成熟雄牛について 0.44/0.51、0.01/0.64 および 0.54/0.54 と報告している。Mathevon ら(1998)は1年間に記録さ

れた 5,644 件の若雄牛および 2,023 件の成熟雄牛の記録を利用しているが、Kawakami ら(2016) と Karoui ら(2011)は 20,000～40,000 件の複数年にわたる記録を利用している。黒毛和種については Nishimura ら(2010)が 18,704 件の記録をもとに、VOL、MOT および NUM の遺伝率/反復率を 0.11/0.21、0.15/0.29 および 0.09/0.18 と報告している。

ホルスタイン種の分析方法は先行研究毎に異なるが、本研究で得られた推定遺伝率は一般に、Karoui ら(2011)および Kawakami ら(2016)のものと同様であった。本研究を含む3つの報告で、A-MOT の遺伝率は MOT より高かった。本研究で得られた VOL、NUM および A-MOT の推定反復率は、Karoui ら(2011)と同様であった。黒毛和種について、本研究の VOL と NUM の推定遺伝率は、単一県の種雄牛記録を用いた Nishimura ら(2010)より高かったが、MOT の推定遺伝率は低かった。なお本研究では、先行研究の約3倍の大きさの、全国にまたがった記録を用いている。

このような結果から、本研究で推定された遺伝的パラメータは合理的なものであり、推定された遺伝率は他の経済的に重要な形質と同様であることから、Kaorui ら(2011)が指摘しているのと同様、精子活力の改良が健全な雄側繁殖性に貢献しうるものと考えられる。

### 3.4.3 母数効果の推定値

高品質の凍結精液を効率的に生産するため、種雄牛センターは種雄牛の管理と凍結精液の生産において様々な環境要因や品種特性を考慮すべきである。管理効果の中では Karoui ら(2011)は、A-MOT について精液の凍結融解手法の改善に伴う正の趨勢を報告している。同様の傾向は本研究でも見ることができた。

季節的な効果について、ホルスタイン種で検討した先行研究はいくつかあるが、黒毛和種については調べた限りにおいて、そうした報告を見つけることはできなかった。Snoj ら(2013)は、VOL と NUM について冬場に最も低くなると報告している。また Everett ら(1978)は 1 年を 3 ヶ月ごとに区分した場合、1～3 月の精液性状が最もよくなり、6 月に最もよくなることを報告している。本研究で得られた結果は、これらの先行研究とも符合する。本研究では、最も暑い 7～8 月、あるいは最も湿度の高い 7 月の 1、2 ヶ月後となる 8～10 月に活力が最も低くなつたが、この時差は 56～63 日の雄牛の精細管における精子生産サイクル(Bearden と Fuquay, 2004)と一致する。精子の成熟過程の中では精母細胞が熱に最も弱いとされており、暑熱が活力に影響した可能性があると考えられる。



ホルスタイン種と黒毛和種を比較した場合、一般的にホルスタイン種の値の季節的な変化は黒毛和種に比べて大きく、ホルスタイン種は黒毛和種に比べて気温などの季節的な環境要因に敏感であることがうかがえる。とはいえ、季節的な変化は推定値の全体的な管理グループ効果のばらつきに比べて小さく、飼養管理と精液の凍結融解手法の改善によって問題なくなる程度のもので考えられる。

ホルスタイン種に見られた年齢と採精間隔の傾向は、先行研究(Mathevon ら, 1998; Karoui ら, 2011; Snoj ら, 2013)と一致するものだった。その差は決して大きくはなく、精子数では逆の傾向となるが、両品種とも 3 日間隔で採精された精液の A-MOT が最もよかった。こうした結果は、精子の生存や希釈液に対する感受性とも関係しているかもしれない。

先行研究(Smith ら, 1989; Nishimura ら, 2010; Maximini ら, 2011; Paldusova ら, 2015)において、近交係数の上昇による悪影響が報告されており、本研究でもすべての形質において、近交に伴う悪影響が見られた。近交係数の上昇を懸念する研究がいくつか出されており、Kawahara ら(2002)はホルスタイン種について、近交係数上昇と経済的に重要な形質の損失を抑える交配計画の必要性を強調している。Nomura ら(2011)は、有効な集団の大きさが小さくなり、遺伝的な変異が小さくなることによって経済的あるいは環境適応に関係した形質の将来的な遺伝的改良の可能性を小さくすることがないよう、数少ない黒毛和種種雄牛の集中的な利用をさけるよう主張している。本研究における近交係数の平均はホルスタイン種で 4.5%、黒毛和種で 11.5%であり、いずれも Maximini ら(2011)のシンメンタール種における報告より高い。すでに高い値となっている黒毛和種だけでなく、近交係数が上昇する傾向が見られるホルスタイン種においても、近交係数の高い種雄牛を候補種雄牛とすることは避けるべきであろう。

#### 3.4.4 遺伝的効果

両品種とも近年、精液性状に関する改良を行っていないにもかかわらず、負の遺伝的趨勢がすべての形質において見られたことから、その他の経済的に重要な形質と精液性状の間で負の遺伝相関がある可能性が考えられた。ホルスタイン種の MOT と A-MOT については近年、遺伝的傾向に反転の兆しが見られるが、この理由は明らかではない。負の遺伝定数性を防ぐためには精液性状に適切な重みをつけ、改良目標に即した他の形質とともに選抜指標の中に取り込むことを検討すべきである。Togashi ら(2016)は、ホルスタイン種雌牛の受胎率と泌乳持続性の間に遺伝的な相関を報告している。繁殖性の向上には、他の経済形質と繁殖形質の関係についての

さらなる検討が必要である。

凍結精液の実需者である酪農家にとっては、今回分析を行った形質の中で受胎の成否に直接関係すると思われる A-MOT の改良に最も関心があると思われ、精液性状の中では最も高い重みづけを置くべきかもしれない。MOT のような他の形質は、多形質モデルの利用によって遺伝的な相関関係を通じた推定精度の向上に貢献するものと考えられる。

#### 3.4.5 ss-GBLUP 法の育種価予測能力

ゲノム情報の利用について検討した 4 つの相関係数の比較では、両品種のすべての形質において ss-GBLUP 法による GEBV の予測能力が最も高いことが判明した。このことから、ss-GBLUP 法の予測能力は t-BLUP 法より優れており、ゲノム情報は有益な情報を提供しているものと考えられた。

### 3.5 摘要

精液性状の積極的な遺伝的改良は行われてこなかったが、検討したすべての形質で負の遺伝的趨勢と、近交係数の上昇による好ましくない効果がみられた。一般的にも推奨されていることではあるが、近交係数の高い種雄牛を候補種雄牛とすることはなるべく避けるべきである。精液性状の育種価には変異が見られ、その遺伝的改良は可能と考えられる。ゲノム情報を用いれば種雄牛の生涯の早い時期に、各形質の遺伝的能力を知ることができ、繁殖成績に関する精子活力の向上や負の遺伝的趨勢の緩和を効率的に実現できる可能性がある。

## 4.ホルスタイン種の暑熱耐性に関する分析

### 4.1 緒論

ホルスタインの暑熱耐性に対する関心は、日本の西南暖地において20年以上前から存在し、農林水産省家畜改良センター(当時)が育種改良を目指したことがあった。この際、暑熱の影響を気温の増加に応じた乳量等の減少量で測る考え方は整理されたものの、当時乳用牛全国評価に採用されていた泌乳期モデル(分娩から乾乳までの総乳量、成分量を基に EBV を計算する)では毎日変わる気温や湿度の影響を反映する上で困難が伴うと考えられる一方、検定日モデルによる遺伝的能力評価は研究途上で計算資源も足りなかった。また、暑熱耐性の遺伝率は高くないと考えられていたが、低い遺伝率の改良に有効とされるゲノミック評価も開発されていなかった。

日本では平成 26 年に小売店頭からバターがなくなり、消費者に大きな影響を与えたが、この原因の一つは平成 25 年の猛暑であるとされている(農林水産省, 2018)。世界的には地球温暖化がこの先数十年にわたり酪農生産に悪影響を与え続けることが予想されており (IPCC, 2014)、その数は決して多くないものの、暑熱耐性の遺伝的能力に関する研究が行われている(Ravagnolo と Misztal, 2000; Aguilar ら, 2009; Hamammi, 2013; Bernabucci ら, 2014; Carabaño ら, 2016; Santana ら, 2017)。経済発展を続けるアジア地域を中心に牛乳乳製品の需要が拡大し酪農振興が図られているが、暑熱耐性が問題となることから、こうした研究はいわゆる酪農先進国以外でもおこなわれている(Boonkum ら, 2011)。

遺伝的改良によって成果を得るには時間がかかり、遺伝率が低ければ成果も限られると予想されることから、暑熱対策としては、送風機やミストの設置などの飼養管理上の対策を行うことが今後とも最も効果的と考えられる。しかしながら、牛乳乳製品市場の混乱がわずかな供給の減少によってもたらされうることを考えると、たとえ効果が限定的であっても、その他の経済的な価値を損なわない範囲で取り組む意味はあると考えられる。酪農の多頭飼育が進む中で、一頭一頭の改良程度がわずかであっても酪農家の経営に与える影響は大きくなっており、少なくとも、これまでに行ってきた乳牛改良の過程が暑熱耐性のような未改良形質に悪影響を与えていなかったのかを検討することは、酪農家の関心に答え、今後の遺伝的改良について考えるうえで重要である。

今日ではゲノミック評価などの評価手法の高度化に加え、気象庁の計測した毎日の気温や湿度のデータがインターネットを通じて容易に入手できるようになり、(一社)家畜改良事業団も牛群検定事業の中で暑熱に関する情報を提供し、酪農家がこれを活用するようになっている(乳用牛

群検定全国協議会, 2017)。またゲノミック評価についてはオーストラリアのグループがマルチステップ法ゲノミック評価による暑熱耐性の遺伝的能力評価を実用化し(Nguyen ら, 2016)、能力評価結果を定期的に発表している(Nguyen ら, 2017)。しかしながら、シングルステップ法による暑熱耐性の能力評価については未だ、研究発表されていない。そこで本研究では、日本の定期的な遺伝的能力評価で採用されている変量回帰検定日モデルを基本にしたシングルステップ法ゲノミック評価により、暑熱耐性の遺伝的効果について検討する。

## 4.2 材料と方法

### 4.2.1 表現型記録

1987年4月から2017年5月の間に(一社)家畜改良事業団が国内で収集したホルスタイン種の乳量(kg)、乳脂量(kg)、乳タンパク量(kg)、体細胞数(1000個/ml)の牛群検定日記録のうち、暑熱の影響をより大きく受けていると考えられる都府県の泌乳記録を表現型記録として利用した。このうち体細胞数については、次式によって体細胞スコア(somatic cell score: SCS)に変換して利用した。

$$\log_2(\text{体細胞数}/100) + 3$$

これらの記録はまず、以下の日本の乳用牛全国評価の条件に従って抽出した。

- 1) 父牛が明らか
- 2) 検定の種類は立会検定(A4法又はAT法(2回搾乳、3回搾乳))又は自動検定
- 3) 初産から3産までの検定日記録(分娩後 305 日以内)。ただし、各産次の分娩月齢は、初産 18~35 ヶ月齢、2産 30~55 ヶ月齢、3産 42~75 ヶ月齢。
- 4) ICAR(International Committee for Animal Recording:家畜の能力検定に関する国際委員会)の検定記録ガイドラインに準じ、一定の精度が保たれていること。

そして、分析モデルと計算資源を考慮し、次の四種類の表現型記録を作成した。

#### ① 閾値決定用データ

2017年5月までに収集した初産から3産の全記録。

#### ② 初産のみデータ

2015年11月までに収集した初産記録のうち、遺伝子型記録を持つ牛を飼養する233牛群の記録

### ③ 初産から3産の3分割データ

2017年5月までに収集した2000年以降分娩の初産から3産の記録のうち、同一管理グループ(牛群・検定日・搾乳回数および牛群・検定年・産次(初産または2-3産))に10頭以上の記録が存在するものを、無作為に割り当てられた農家コードを利用して3分割した記録。

### ④ 評価用全データ

2017年5月までに収集した2000年以降分娩の初産から3産の記録のうち、同一管理グループ(牛群・検定日・搾乳回数および牛群・検定年・産次(初産または2-3産))に2頭以上の記録が存在するもの。

## 4.2.2 マーカー遺伝子型と血縁情報

(一社)日本ホルスタイン登録協会より提供を受けた、Illumina BovineSNP50 BeadChip, version 1 および 2(Illumina Inc., San Diego, CA, USA: 50K)を用いてジェノタイピングした雄牛 5,439 頭および雌牛 2,598 頭の遺伝子型、および Illumina BovineLD BeadChip (LD)を用いてジェノタイピングした雌牛 20,411 頭の遺伝子型を用いた。BovineLD チップを用いた記録は、BEAGLE 3 (Browning と Browning, 2009)を用いて、BovineSNP50 チップの記録をリファレンスとして補完した。BovineSNP50 でジェノタイピングされた個体のコールレイトは 0.98 を超えている。

常染色体上のマーカーは、コールレイト(0.9 以上)、マイナーアレル頻度(0.01 以上)、ハーディ・ワインベルグ平衡のカイ二乗検定 P 値 (0.01 以上)により選定したが(Onogi ら, 2014)、分析に用いる方程式を小さくするため、BovineLD チップを用いた遺伝子型は同時に利用した表現型記録毎に、表現型記録を持つ牛かその母親に限って利用したため、これらの条件を計算した母集団に若干の違いが生じ、マーカー数は 39,044~39,092 と、利用したデータセット毎に若干異なった。

血縁情報は(一社)日本ホルスタイン登録協会から提供されたものを用い、泌乳記録を持つ牛(検定牛)または遺伝子型を持つ牛から最低 4 代までさかのぼって利用した。

表 4.1 記録の概要

	チップ	乳量/乳脂量/乳タンパク量					SCS				
		初産のみ	初産～3産				初産のみ	初産～3産			
			セット1	セット2	セット3	全データ		セット1	セット2	セット3	全データ
検定記録数	-	820,573	1,456,561	1,443,028	1,570,143	13,460,744	752,514	1,454,642	1,559,421	1,332,148	13,098,209
検定牛 (記録を持つ雌牛)	計	93,725	79,705	78,337	85,110	722,170	86,435	80,207	86,527	73,838	714,212
	50K	807	245	272	324	841	807	328	324	189	841
	LD <sup>1</sup>	363	728	954	1,034	2,824	363	1,077	792	841	2,817
	-	92,555	78,732	77,111	83,752	718,505	85,265	78,802	85,411	72,808	710,554
種雄牛 (検定牛の父)	50K	3,126	3,194	3,154	3,252	4,105	3,082	3,196	3,241	3,094	4,103
	-	2,229	1,427	1,467	1,445	3,206	1,999	1,398	1,505	1,401	3,180
遺伝子型を持つが 記録を持たない雌牛	50K	1,791	2,353	2,326	2,274	1,757	1,791	2,270	2,274	2,409	1,757
	LD <sup>1</sup>	1	6	15	4	22	1	9	7	9	22
種雄牛以外の 遺伝子型を持つ雄牛	50K	2,313	2,245	2,285	2,187	1,334	2,357	2,243	2,198	2,345	1,336
その他の個体	-	106,843	108,385	101,164	104,901	660,858	102,007	102,843	108,898	102,051	657,512
マーカ一数	-	39,092	39,088	39,091	39,076	39,044	39,092	39,072	39,082	39,091	39,045

<sup>1</sup>LD: 方程式を小さくするため、低密度チップの遺伝子型は、検定牛またはその母のみ採用した。

### 4.2.3 暑熱指標と個体の反応

暑熱指標として最もよく知られているのは、日本気象協会も発表している不快指数(DI, Thom, 1959)である。

$$DI = 0.72(T_d + T_w) + 40.6$$

ただし、 $T_d$ は乾球温度(摂氏)、 $T_w$ は湿球温度(摂氏)である。

この指数には、湿球温度の代わりに露点 $T_{dew}$ や相対湿度 $RH$ を利用した式もある。

$$\begin{aligned} DI &= 1.8(0.55T_d + 0.2T_{dew}) + 0.75 \times 32 + 17.5 \\ &= 0.99T_d + 0.36T_{dew} + 41.5 \\ &= 1.8T_d + 32 - (0.55 - 0.0055RH)(1.8T_d + 32 - 58) \end{aligned}$$

これらの式は温度湿度指数(THI)として NRC(1971)に掲載され、最後の式が先行研究でも多く採用されている(RavagnoloとMisztal, 2000; Aguilarら, 2009, 2010(b); Brügemannら, 2011; Hammamiら2013; Bernabucciら2014)。日本の気象庁も相対湿度の情報を提供していることから、本研究でもこの式を採用した。なお Hayes ら(2003)および Nguyen ら(2016)が採用している Yousef (1985)の式は、 $THI = T_d + 0.36T_{dew} + 41.2$ であるが、換算過程の違いにより 2 番目の式と少し異なる係数になっているだけで、実質的にはこれも DI であると考えられる。

本研究における暑熱の影響は、暑熱指標に応じた乳量等の変化としてとらえた。暑熱負荷の閾値より低い部分を暑熱の影響を受けない thermal neutral zone(Nickerson ら, 1989)として傾きゼロの直線とし、これを越えた部分について暑熱負荷による変化を一次回帰で表す折れ線モデル

(Misztal, 1999)を採用した。なお Nickerson ら(1989)は暑熱ストレスだけでなく寒冷ストレスによる影響についても述べているが、冬季には牛を牛舎に入れて環境影響を大きく緩和する管理をしていること(一方夏季に冷房付き牛舎に入れることはなく、対策をとったとしてもファンやミストであることから、暑熱ストレスがゼロになることはないと考えられる)、ホルスタイン種が寒さに強い品種であるといわれていることから考慮する必要はないと考えた。

折れ線モデルの場合、暑熱耐性を考慮する上で閾値と一次回帰の傾きという二つの値を考慮しなければならない。しかし、Sánchez ら(2009)は閾値が高い個体は傾きが小さく、閾値が低い個体は傾きが大きくなることを報告していることから、本研究ではすべての記録に一律の閾値をあてはめてモデルを単純化し、傾きの(G)EBV を推定した。具体的には、初産記録を用いた予備分析では Hayes ら(2003)および Nguyen ら(2016)と同様 THI=60 の閾値をすべての記録にあてはめたが、初産から3産の記録を用いた詳細な分析では産次別に、折れ線回帰分析によって閾値を求め、いずれの場合も閾値を超えた部分の傾きを個体ごとに推定するモデルを採用した(Ravagnolo と Misztal, 2000; Aguilar ら, 2009; Bernabucci ら 2014)。折れ線回帰の代わりにルジャンドル多項式を採用した分析も多く報告されている (Hayes ら, 2003; Brügemann ら, 2011; Hammami ら, 2013; Carabaño ら, 2014; Nguyen ら, 2016)。しかし推定すべきパラメータ数がさらに増え、複雑な計算が必要になることから本研究では、日本の定期的な遺伝的能力評価で採用されているモデルを基本に、推定すべき遺伝的パラメータ数を抑えられる折れ線モデルを採用した。

本研究では気象庁が公開している各気象官署の気温と湿度の記録を利用し、各牛群と結び付ける気象官署は、牛群の属する気象警報・注意報や天気予報の発表区域から最も近い気象官署(同一都府県内)とした。

測定された乳量等の記録には当日の暑熱負荷だけでなく、過去何日かの暑熱負荷が影響していると考えられる。Bormanova ら(2008)は検定日 3 日前の平均 THI を、Hayes ら(2003)および Nguyen ら(2016)は検定日およびその 4 日前までの平均 THI を記録に結び付けている。本研究では、初産記録を用いた予備分析では Hayes ら(2003)および Nguyen ら(2016)と同様検定日およびその 4 日前までの平均 THI を検定日記録に結び付けたが、初産から3産の記録を用いた詳細な分析では Hagiya ら(投稿中)の分析に基づき、乳量と乳成分量は検定日の 2 から 4 日前の平均 THI、SCS は検定日の 1 から 12 日前の平均 THI を検定日記録に結び付けて分析した。

#### 4.2.4 統計学的分析

閾値( $THI_{threshold}$ )は R の segmented パッケージ(Muggeo, 2008)を 4.2.1①のデータに用い、次の折れ線回帰分析により形質・産次別に求めた。

$$\begin{cases} y_i = c + e_i: THI_i < THI_{threshold} \text{ のとき} \\ y_i = a + b * THI_i + e_i: THI_i > THI_{threshold} \text{ のとき} \end{cases}$$

遺伝的パラメータおよび(G)EBV の推定は、日本の定期的な遺伝的能力評価で採用されているモデルを基本にした、次の変量回帰検定日モデルによって分析した。

$$y_{ijklmno} = HTDT_i + M'_j w + Ag'_k w + hyp'_l v + pe'_{mn} z + peh_{mn} \cdot f(THI) + u'_{mn} z + uh_{mn} \cdot f(THI) + e_{ijklmno}$$

ただし、

$y_{ijklmno}$  は牛群・年次・搾乳回数水準  $i$ 、牛群・分娩年・産次水準  $1$  に属する分娩月  $j$  分娩月齢水準  $k$  の検定牛  $m$  から産次  $n$  の  $o$  番目に得られた乳量(kg)、乳脂量(kg)、乳タンパク量(kg)または SCS の記録、

$HTDT_i$  は  $i$  番目の牛群・検定日・搾乳回数の母数効果、

$M'_j = [M_{j0} \ M_{j1} \ M_{j2} \ M_{j3} \ M_{j4} \ M_{j5}]$  は分娩月  $j$  の母数回帰係数ベクトル (12 水準)、

$Ag'_k = [A_{k0} \ A_{k1} \ A_{k2} \ A_{k3} \ A_{k4} \ A_{k5}]$  は分娩月齢水準  $j$  の母数回帰係数ベクトル(初産 18~35 か月の 18 水準、2産 30~55 か月の 26 水準、3産 42~75 か月の 34 水準)、

$hyp'_l = [hyp_{l0} \ hyp_{l1}]$  は 1 番目の牛群・分娩年・産次(初産または 2/3 産、初産記録のみの分析では  $hy'_l = [hy_{l0} \ hy_{l1}]$  となり、1 番目の牛群・分娩年)の変量回帰係数ベクトル、

$pe'_{mn} = [pe_{mn0} \ pe_{mn1} \ pe_{mn2}]$  は検定牛  $m$  の暑熱の影響を受けていないときの PE (一般的 PE)の変量回帰係数ベクトル、

$peh_{mn}$  は検定牛  $m$  の暑熱耐性の PE に関する変量直線回帰係数、

$u'_{mn} = [u_{mn0} \ u_{mn1} \ u_{mn2}]$  は検定牛  $m$  の暑熱の影響を受けていないときの(G)EBV (一般的(G)EBV)の変量回帰係数ベクトル、

$uh_{mn}$  は検定牛  $m$  の暑熱耐性の(G)EBV に関する変量直線回帰係数、

$e_{ijklmno}$  は産次と搾乳日数水準( $t=6\sim35, 36\sim65, 66\sim95, 96\sim125, 126\sim215, 216\sim305$ )ご



とに分散を定めた残差の変量効果、

$\mathbf{w}' = [\phi_0(t) \ \phi_1(t) \ \phi_2(t) \ \phi_3(t) \ \phi_4(t) \ e^{-0.05t}]$ すなわち搾乳日数  $t$  における4次のルジャンドル多項式にウイルミンク関数(Wilmink, 1987)の指数関数部分を加えたベクトル、

$\mathbf{v}' = [\phi_0(t) \ \phi_1(t)]$ すなわち1次のルジャンドル多項式のベクトル、

$\mathbf{z}' = [\phi_0(t) \ \phi_1(t) \ \phi_2(t)]$ すなわち2次のルジャンドル多項式のベクトル、

$$f(\text{THI}) = \begin{cases} 0: \text{THI} < \text{THI}_{\text{threshold}} \text{のとき} \\ \text{THI} - \text{THI}_{\text{threshold}}: \text{THI} > \text{THI}_{\text{threshold}} \text{のとき} \end{cases}$$

である。

変量効果の分散共分散行列は BLUPF90ファミリー(Misztal ら, 2002)の gibbs3f90 プログラムを用いた 10 万回のギブスサンプリングを行い、サンプルプロットの目視により収束を確認したうえで、初めの 5 万回を burn-in として捨て、変量効果の分散共分散行列を残り 5 万サンプルから得た。

各変量効果のベクトルを、

$$\mathbf{hyp}' = [\mathbf{hyp}'_1 \ \cdots \ \mathbf{hyp}'_l \ \cdots]$$

$$\mathbf{pet}' = [\mathbf{pe}'_{11} \ \mathbf{peh}_{11} \ \mathbf{pe}'_{12} \ \mathbf{peh}_{12} \ \mathbf{pe}'_{13} \ \mathbf{peh}_{13} \ \cdots \ \mathbf{pe}'_{mn} \ \mathbf{peh}_{mn} \ \cdots]$$

$$\mathbf{ut}' = [\mathbf{u}'_{11} \ \mathbf{uh}_{11} \ \mathbf{u}'_{12} \ \mathbf{uh}_{12} \ \mathbf{u}'_{13} \ \mathbf{uh}_{13} \ \cdots \ \mathbf{u}'_{mn} \ \mathbf{uh}_{mn} \ \cdots]$$

$$\mathbf{e}' = [e_1 \ \cdots \ e_{ijklmno} \ \cdots]$$

とすると、分散共分散構造は次のように表すことができる。

$$\text{var} \begin{bmatrix} \mathbf{hyp} \\ \mathbf{pet} \\ \mathbf{ut} \\ \mathbf{e} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mathbf{I} \otimes \mathbf{Q} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} \\ \mathbf{0} & \mathbf{I} \otimes \mathbf{P} & \mathbf{0} & \mathbf{0} \\ & & \mathbf{A} \text{ or } \mathbf{H} \otimes \mathbf{U} & \mathbf{0} \\ \text{sym.} & & \mathbf{0} & \mathbf{R} \end{bmatrix}$$

ただし、

$\mathbf{I}$ は単位行列、

$\mathbf{Q}$ は2×2の牛群・分娩年・産次効果の回帰係数に関する分散共分散行列、

$\mathbf{P}$ および $\mathbf{U}$ は1産次あたり4(=2次のルジャンドル多項式の係数3+暑熱耐性の直線回帰係数

1)行/列のPEおよび(G)EBVの回帰係数に関する分散共分散行列、

$\mathbf{R}$ は搾乳日数の水準毎に異なる残差分散を対角成分とする対角行列、

$\mathbf{A}$ は分子血縁行列、

$\mathbf{H}$ は遺伝子型情報を持つ個体のゲノミック関係行列と全個体の分子血縁行列 $\mathbf{A}$ から作られる混合行列

である。

遺伝的パラメータは予備分析としてまず、4.2.1 ②の初産のみデータを使い、閾値をすべて 60 とした ss-GBLUP 法によって推定して収束を確認した。混合行列**H**の逆行列を作成する際のパラメータは  $\alpha=0.95$ 、 $\beta=0.05$ 、 $\tau=\omega=1$  の既定値とした。

次に、4.2.1 ③の初産から3産の3分割データを使い、各産次を別形質と扱った多形質モデルを乳量、乳成分量、SCS にそれぞれ適用し、産次ごとに推定した閾値を利用した t- BLUP 法により遺伝的パラメータを推定して収束を確認した。これは、初産～3 産の暑熱耐性の効果のように類似の効果が複数含まれる場合、正定値でない分散共分散行列がサンプルされてギブスサンプリングが収束しないことがあるためである。収束しない場合には PE と(G)EBV の暑熱耐性の効果が産次共通であると仮定したモデルに変更して収束を確認した。すなわち、暑熱耐性の効果を産次ごとに設定した場合には、**P**および**U**は 12(=(2 次のルジャンドル多項式の係数 3 + 暑熱耐性の直線回帰係数 1) × 3(産次))行/列の分散共分散行列となるが、この効果を産次共通にした場合には 10(=(2 次のルジャンドル多項式の係数 3) × 3(産次) + 暑熱耐性の直線回帰係数 1)行/列の分散共分散行列を PE と(G)EBV それぞれについて推定することとなる。

次に各形質で収束が確認されたモデルを使い、ss-GBLUP 法によって分散成分を推定した。ゲノム情報を持つ個体が増え、混合行列**H**の逆行列を作成する際のパラメータに既定値を用いた場合ギブスサンプリングが収束しなかったことから、米国での研究初期に利用された  $\omega=0.7$  に変更して遺伝的パラメータの推定を行った。

全データを用いた各個体の(G)EBV の推定に利用する分散共分散行列の要素は、3 つのデータサブセットから得られた推定値の平均を利用した。またその予測誤差**V**<sub>0</sub>は、それぞれの予測誤差**V**<sub>1</sub>, **V**<sub>2</sub>, **V**<sub>3</sub>が母分散 $\sigma^2$ に対しサンプル数と反比例すると仮定し、次のように得た。

$$V_1 = \frac{\sigma^2}{n_1}, V_2 = \frac{\sigma^2}{n_2}, V_3 = \frac{\sigma^2}{n_3}$$

$$V(x_0) = \frac{\sigma^2}{n_1 + n_2 + n_3} = \frac{\sigma^2}{\frac{\sigma^2}{V_1} + \frac{\sigma^2}{V_2} + \frac{\sigma^2}{V_3}} = \frac{V_1 V_2 V_3}{V_2 V_3 + V_3 V_1 + V_1 V_2}$$

#### 4.2.5 PE および (G)EBV と分散・共分散

搾乳日数  $t$  と THI に応じて一般的(G)EBV および総合(G)EBV は次のように計算した。

$$\text{一般的(G)EBV: } u_{mn0}\phi_0(t) + u_{mn1}\phi_1(t) + u_{mn2}\phi_2(t) = u_{mn}(t)$$

$$\text{総合(G)EBV: } u_{mn}(t) + f(THI) \cdot uh_{mn}$$

ただし、 $u_{mn0}$ 、 $u_{mn1}$ 、 $u_{mn2}$ は産次ごとの一般的(G)EBV の回帰係数の推定値、 $uh_{mn}$  は(産次ごとの)暑熱耐性の(G)EBV の回帰係数の推定値である。

搾乳日数  $t$  と搾乳日数  $t'$  の間の一般的遺伝(共)分散は、次のように計算した。

$$\begin{aligned} & cov(u_{mn}(t), u_{mn}(t')) \\ &= cov(u_{mn0}\phi_0(t) + u_{mn1}\phi_1(t) + u_{mn2}\phi_2(t), u_{mn0}\phi_0(t') + u_{mn1}\phi_1(t') + u_{mn2}\phi_2(t')) \\ &= \sum_{p,q} cov(u_{mnp}\phi_p(t), u_{mnq}\phi_q(t')) \\ &= \sum_{p,q} \phi_p(t)\phi_q(t')cov(u_{mnp}, u_{mnq}) \end{aligned}$$

ただし、 $cov(u_{mnp}, u_{mnq})$ は $\mathbf{U}$ の各産次のブロック対角行列の  $p$  行  $q$  列の要素( $p, q=1, 2, 3$ )である。

暑熱耐性の遺伝分散は、 $f(THI)^2 \cdot \sigma_{uhn}^2$ 、ただし $\sigma_{uhn}^2$ は初産のみデータを使った推定または初産から3産のデータを使った乳量、SCS の推定では、 $\mathbf{U}$ の各産次のブロック対角行列の 4 行 4 列要素、初産から3産のデータを使った乳脂量、乳タンパク量の推定では $\mathbf{U}$ の 10 行 10 列要素である。

一般的(G)EBV と暑熱耐性の(G)EBV の共分散は、次のように計算した。

$$\begin{aligned} & cov(u_{mn}(t), f(THI) \cdot uh_{mn}) \\ &= f(THI) \cdot cov(u_{mn}(t), uh_{mn}) \\ &= f(THI) \cdot cov(u_{mn0}\phi_0(t) + u_{mn1}\phi_1(t) + u_{mn2}\phi_2(t), uh_{mn}) \\ &= f(THI) \cdot \sum_i \phi_i(t)cov(u_{mni}, uh_{mn}) \end{aligned}$$

ただし、 $cov(u_{mni}, uh_{mn})$ は初産のみデータを使った推定または初産から3産のデータを使った乳量、SCS の推定では、 $\mathbf{U}$ の各産次のブロック対角行列の  $i$  行 4 列の要素( $i=1, 2, 3$ )、初産から3産のデータを使った乳脂量、乳タンパク量の推定では $\mathbf{U}$ の  $i$  行 10 列要素(初産  $i=1, 2, 3$ 、2産  $i=4, 5, 6$ 、3産  $i=7, 8, 9$ )である。

一般的(G)EBV と暑熱耐性の(G)EBV の相関は、

$$\frac{\sum_i \phi_i(t)cov(u_{mni}, uh_{mn})}{\sqrt{\sum_i \phi_i(t)^2 cov(u_{mni}, u_{mni})\sigma_{uhn}^2}}$$

最後に、総合遺伝分散は、

$$\sum_i \phi_i(t)^2 \text{cov}(u_{mni}, u_{mni}) + f(\text{THI})^2 \cdot \sigma_{uhn}^2 + 2f(\text{THI}) \cdot \sum_i \phi_i(t) \text{cov}(u_{mni}, u_{hmn})$$

により得た。

以上の値は、PE についても同様に計算可能である。

最後に、取りまとめた遺伝的パラメータをあてはめ全データ用い、mmef を使った ss-GBLUP 法によって、各個体の(G)EBV を推定した。

## 4.3 結果

### 4.3.1 暑熱耐性の閾値と傾きの推定

暑熱耐性の thermal comfort zone の閾値と 1THI 当たりの変化を推定した結果を表 4.2 に示す。乳量および乳成分量については閾値を超えた場合に THI の増加に応じて表現型値が減少するが、SCS は閾値を超えると増加する。また産次が進むと閾値が低くなり、変化の割合も大きくなる傾向が見られる。

表 4.2 暑熱耐性の閾値と1THI 当たりの減少量

形質	記録数	閾値			1THI 当たりの減少量			
		乳量	乳脂量	乳タンパク量	乳量	乳脂量	乳タンパク量	
乳量/ 乳脂量/ 乳タンパク量	初産	8,983,199	72.246	54.356	66.008	-8.19e-2	-3.27e-3	-3.54e-3
	2産	7,448,202	71.886	53.444	64.368	-1.72e-1	-4.25e-3	-5.01e-3
	3産	5,316,403	66.521	51.167	58.788	-1.59e-1	-5.01e-3	-4.62e-3
SCS	初産	7,690,035		63.645			1.73e-2	
	2産	6,361,339		64.865			1.24e-2	
	3産	4,509,975		59.460			1.26e-2	

### 4.3.2 初産記録のみを用いた遺伝的パラメータの推定

初産データを用いたギブスサンプリングは問題なく収束した。先行研究と同様、乳量および乳成分量においては、一般的 GEBV と暑熱耐性の GEBV の間に中程度の負の遺伝相関が存在した。総合遺伝率は日本の乳用牛全国評価と比べて低めに推定された。SCS については弱い正の遺伝相関が推定され、一般的効果と暑熱耐性の遺伝的つながりは乳量などと比べて弱いことが示唆された(表 4.3)。

表 4.3 暑熱耐性の分散と一般的効果と暑熱耐性の相関(乳期平均)

	乳量	乳脂量	乳タンパク量	SCS
PE ( $\sigma_{peh}^2$ )	$6.51 \times 10^{-3} \pm 2.32 \times 10^{-4}$	$7.35 \times 10^{-6} \pm 4.56 \times 10^{-7}$	$5.52 \times 10^{-6} \pm 2.52 \times 10^{-7}$	$1.02 \times 10^{-3} \pm 2.78 \times 10^{-5}$
GEBV ( $\sigma_{uh}^2$ )	$1.21 \times 10^{-3} \pm 1.25 \times 10^{-4}$	$1.66 \times 10^{-6} \pm 2.15 \times 10^{-7}$	$1.13 \times 10^{-6} \pm 1.41 \times 10^{-7}$	$3.15 \times 10^{-5} \pm 6.28 \times 10^{-6}$
PE 相関	$-0.291 \pm 0.0147$	$-0.389 \pm 0.0192$	$-0.402 \pm 0.0148$	$-0.124 \pm 0.0109$
遺伝相関	$-0.624 \pm 0.0426$	$-0.566 \pm 0.0523$	$-0.583 \pm 0.0427$	$0.275 \pm 0.0966$

PE: 恒久的環境効果、GEBV: ゲノミック推定育種価

いずれの形質においても、総合 PE 分散は総合遺伝分散と比べて大きかった。また今回採用しているモデルでは THI が大きくなると暑熱耐性の遺伝分散は次第に大きくなるが、乳量および乳成分量については THI が大きくなると総合 PE 分散または総合遺伝分散は小さくなり、遺伝率は低下した。SCS については総合 PE 分散または総合遺伝分散は大きくなり、遺伝率は若干上昇した(表 4.4)。

表 4.4 総合分散と総合遺伝率(乳期平均)

		乳量	乳脂量	乳タンパク量	SCS
THI = 閾値 = 一般的分 散/遺伝率	PE	14.1±0.221	$1.95 \times 10^{-2} \pm 3.07 \times 10^{-4}$	$1.35 \times 10^{-2} \pm 2.01 \times 10^{-4}$	1.30±0.0167
	遺伝	8.83±0.317	$1.13 \times 10^{-2} \pm 4.15 \times 10^{-4}$	$6.66 \times 10^{-3} \pm 2.76 \times 10^{-4}$	0.216±0.0189
	$h^2$	0.285±0.0112	0.221±0.0111	0.158±0.0108	0.0863±0.00787
THI = 80	PE	13.2±0.231	$1.66 \times 10^{-2} \pm 3.48 \times 10^{-4}$	$1.13 \times 10^{-2} \pm 2.05 \times 10^{-4}$	1.53±0.0218
	遺伝	6.76±0.301	$8.83 \times 10^{-3} \pm 4.15 \times 10^{-4}$	$5.12 \times 10^{-3} \pm 2.52 \times 10^{-4}$	0.257±0.0217
	$h^2$	0.2411±0.0119	0.194±0.0121	0.133±0.0101	0.0927±0.00902

#### 4.3.3 初産から3産の記録を用いた遺伝的パラメータの推定

t-BLUP 法を用いた推定では暑熱耐性の効果を産次ごとに推定した場合、乳脂量と乳タンパク量においてギブスサンプリングが収束しなかったことから、これらの形質では暑熱耐性の PE と(G)EBV の効果を産次共通の効果とし、t-BLUP 法および ss-GBLUP 法によって分散成分を推定した。

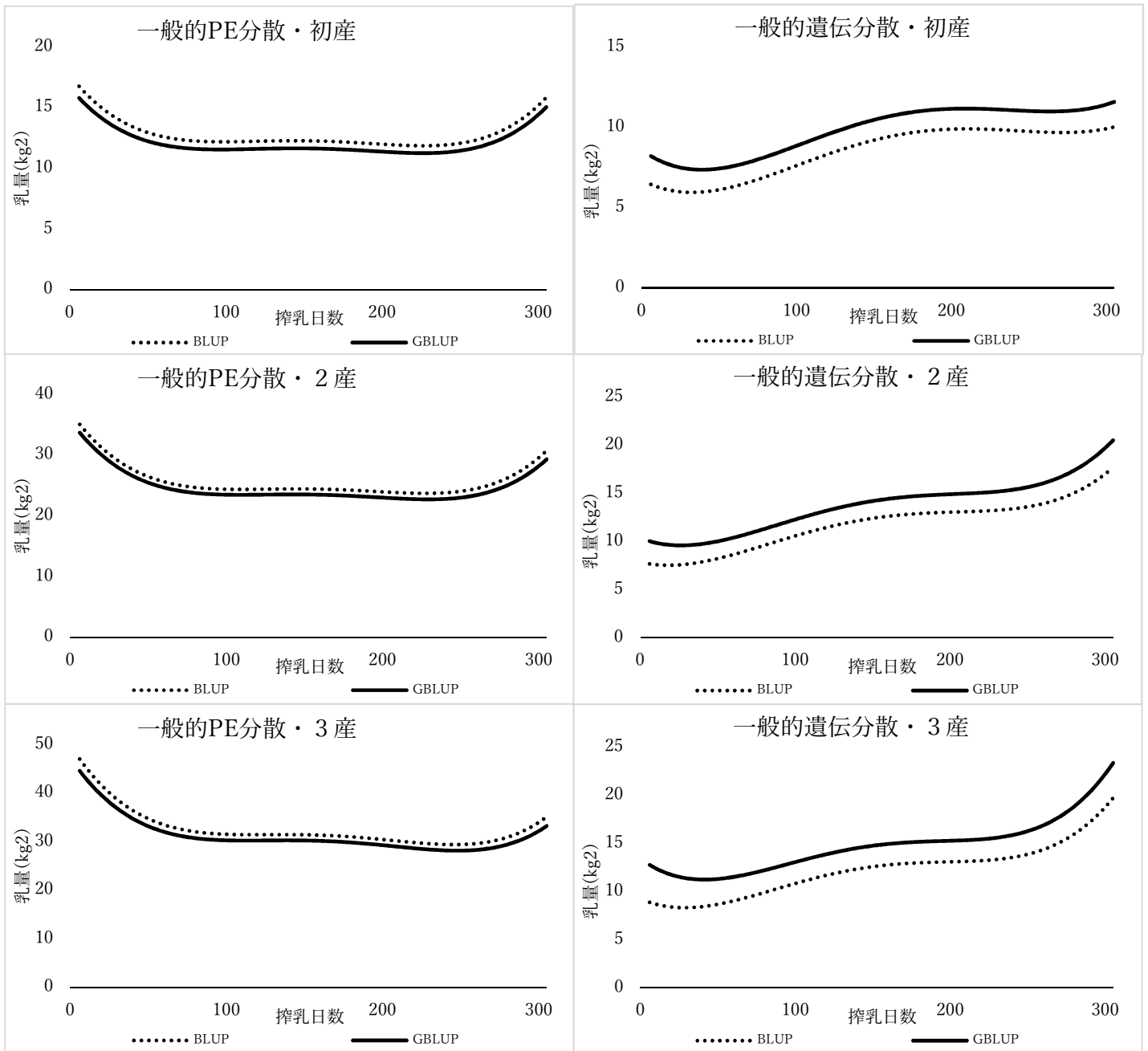
推定された一般的 PE 分散および一般的遺伝分散の搾乳日数に応じた変化を図 4.1 に示す。乳量および乳成分量において、乳期が後半になると一般的遺伝分散が若干大きくなる傾向が見られた。またすべての形質において ss-GBLUP 法の遺伝分散は t-BLUP 法より大きく、ss-GBLUP 法の PE 分散は t-BLUP 法より小さくなった(表 4.5)。

表 4.5 一般的 PE 分散と遺伝分散 (乳期平均)

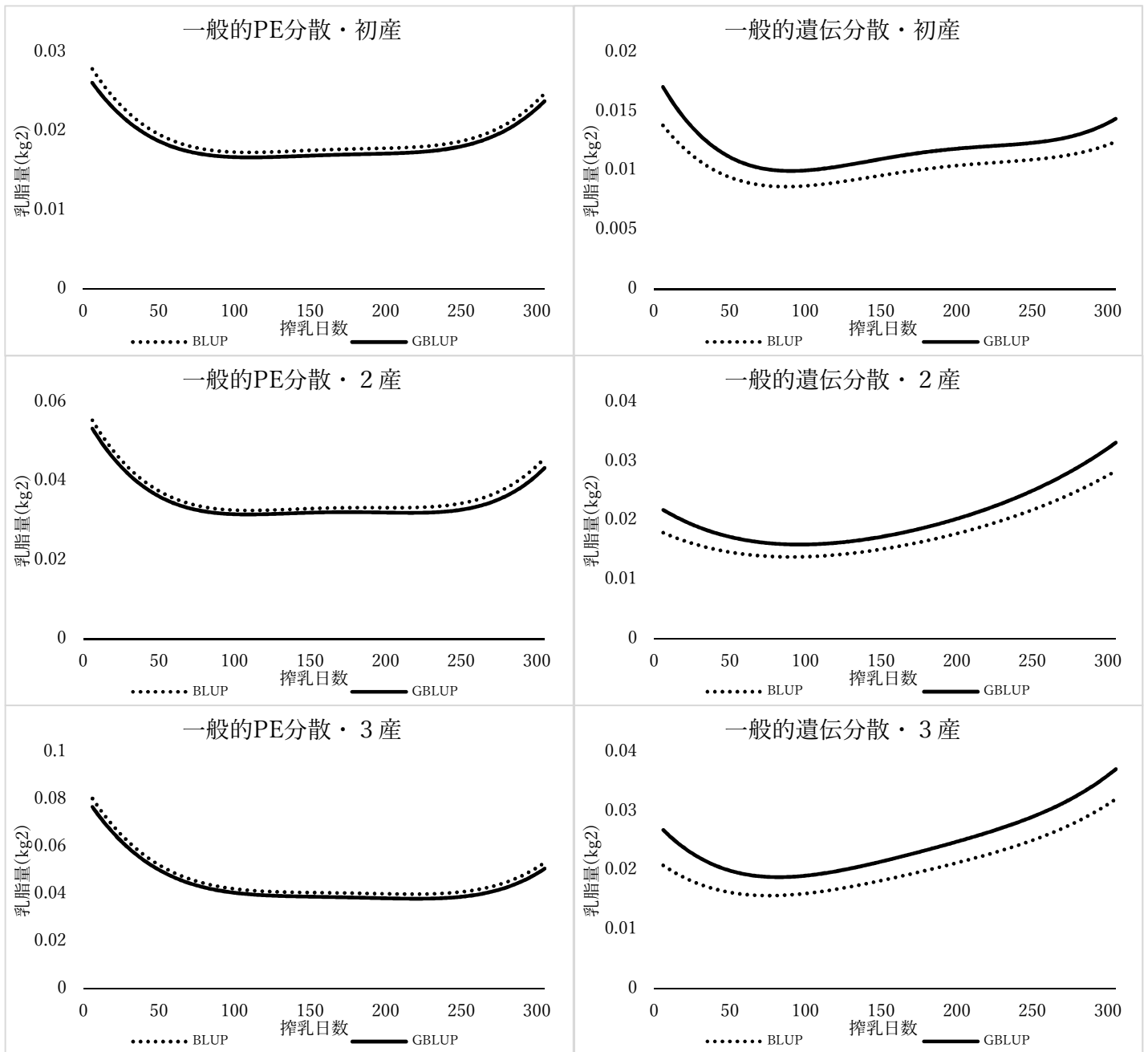
形質	産次	PE 分散		遺伝分散	
		t-BLUP	ss-GBLUP	t-BLUP	ss-GBLUP
乳量	初産	12.7352±0.1262	12.0682±0.1242	8.4948±0.1791	9.8181±0.1847
	2産	25.5819±0.2074	24.5632±0.2079	11.7565±0.2595	13.6958±0.2716
	3産	32.4993±0.2847	31.1106±0.2888	12.1769±0.3206	14.6778±0.3458
乳脂量	初産	0.019243±0.000183	0.018467±0.000180	0.010250±0.000228	0.011830±0.000234
	2産	0.036144±0.000316	0.034734±0.000318	0.017733±0.000377	0.020503±0.000400
	3産	0.045932±0.000465	0.043904±0.000471	0.020532±0.000518	0.024289±0.000558
乳タンパク量	初産	0.012504±0.000116	0.011925±0.000116	0.006248±0.000153	0.007367±0.000161
	2産	0.024188±0.000195	0.023238±0.000197	0.009774±0.000236	0.011563±0.000252
	3産	0.030439±0.000282	0.029155±0.000289	0.011043±0.000308	0.013368±0.000340
SCS	初産	1.2938±0.0089	1.2459±0.0094	0.2820±0.0094	0.3646±0.0109
	2産	1.6330±0.0122	1.5772±0.0125	0.4886±0.0132	0.5909±0.0146
	3産	1.9384±0.0189	1.8588±0.0191	0.6398±0.0210	0.7836±0.0226

図 4.1 一般的効果の分散推定値

(1)乳量

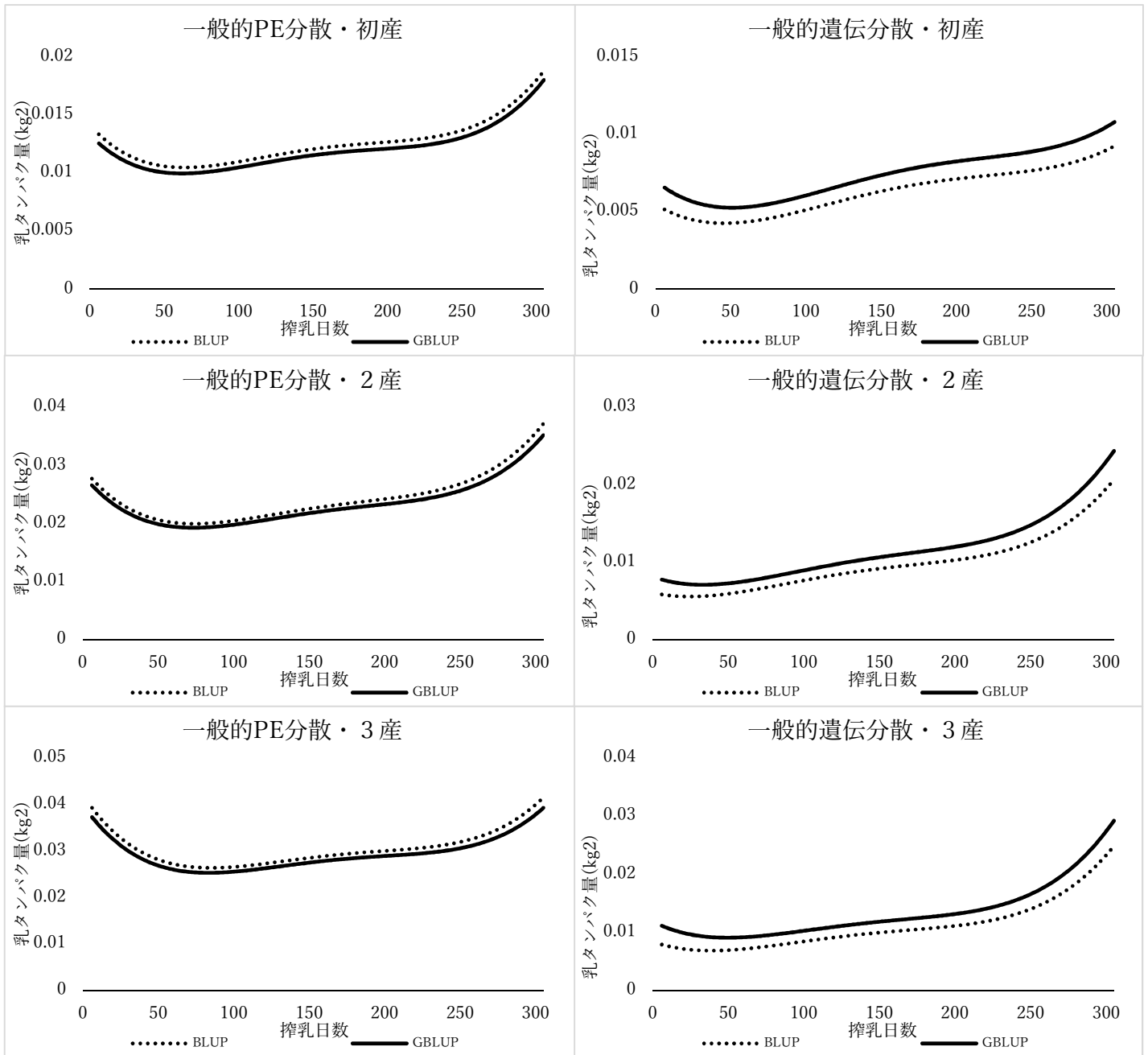


(2)乳脂量

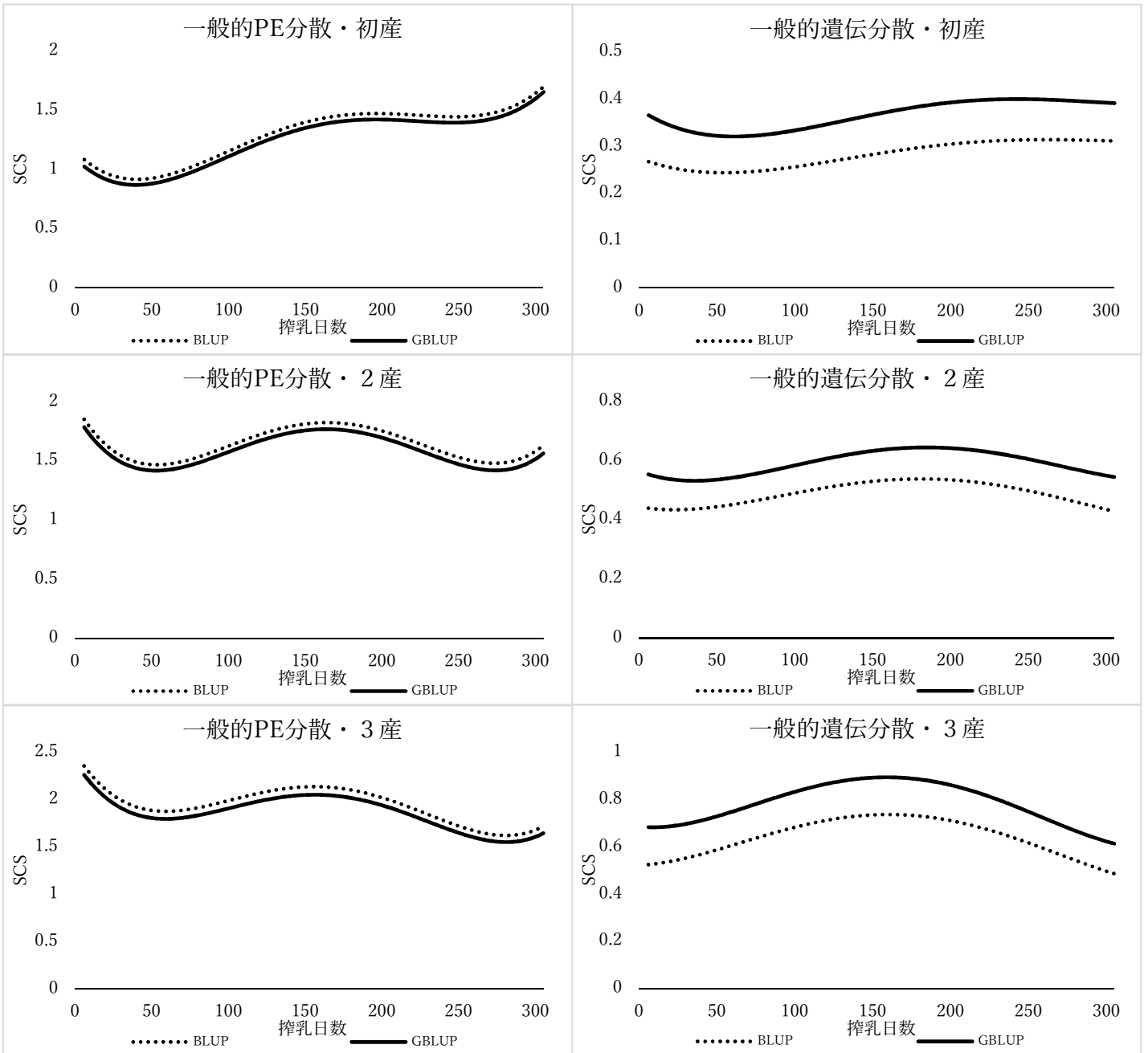




(3)乳タンパク量



(4)SCS



暑熱耐性の PE 分散および遺伝分散の THI に応じた変化を図 4.2 に示した。一般的に産次が進むにつれて、暑熱耐性の分散も大きくなる傾向がみられた。

一般的効果と暑熱耐性の PE および遺伝相関の、搾乳日数に応じた変化を図 4.3 に示した。乳量・乳脂量については乳期を通じて PE 相関、遺伝相関ともマイナスで、遺伝相関は乳期後半に -1 により近くなる傾向が見られた。一方 SCS については、乳期後半に遺伝相関が小さくなる傾向が見られた。

THI=閾値(一般的遺伝率)または 80 のときの総合遺伝率と THI=80 のときの暑熱耐性の遺伝率の乳期平均を表 4.6 に示す。また ss-GBLUP 法の総合遺伝率の搾乳日数に応じた変化を図 4.4 に示す。一般的に ss-GBLUP 法の遺伝率は t-BLUP 法より高く、乳量、乳成分量の総合遺伝率は産次が進むと少し小さくなるが、暑熱耐性の遺伝率は少し大きくなる傾向が見られた。

表 4.6 遺伝率 (乳期平均)

形質	産次	総合遺伝率				暑熱耐性の遺伝率(THI=80)	
		THI=閾値:一般的遺伝率		THI=80		t-BLUP	ss-GBLUP
		t-BLUP	ss-GBLUP	t-BLUP	ss-GBLUP		
乳量	初産	0.2935±0.0055	0.3317±0.0054	0.2831±0.0063	0.3302±0.0064	0.0294±0.0014	0.0442±0.0019
	2産	0.2439±0.0048	0.2784±0.0049	0.2427±0.0055	0.2809±0.0056	0.0167±0.0008	0.0231±0.0010
	3産	0.2142±0.0051	0.2521±0.0053	0.2050±0.0070	0.2507±0.0073	0.0372±0.0019	0.0547±0.0029
乳脂量	初産	0.2083±0.0042	0.2359±0.0042	0.2013±0.0047	0.2331±0.0049	0.0311±0.0015	0.0451±0.0021
	2産	0.2110±0.0040	0.2393±0.0041	0.1962±0.0042	0.2248±0.0044	0.0191±0.0009	0.0278±0.0013
	3産	0.2061±0.0047	0.2384±0.0048	0.1942±0.0048	0.2269±0.0051	0.0188±0.0009	0.0273±0.0013
乳タンパク量	初産	0.2225±0.0050	0.2577±0.0051	0.2278±0.0055	0.2684±0.0056	0.0337±0.0014	0.0469±0.0018
	2産	0.2045±0.0046	0.2375±0.0047	0.2081±0.0053	0.2437±0.0056	0.0249±0.0011	0.0347±0.0013
	3産	0.1935±0.0050	0.2298±0.0053	0.2015±0.0060	0.2426±0.0065	0.0384±0.0016	0.0535±0.0021
SCS	初産	0.1148±0.0037	0.1464±0.0042	0.1281±0.0041	0.1586±0.0045	0.0088±0.0007	0.0142±0.0009
	2産	0.1540±0.0040	0.1837±0.0043	0.2081±0.0053	0.1823±0.0044	0.0089±0.0005	0.0128±0.0008
	3産	0.1724±0.0053	0.2075±0.0056	0.2015±0.0060	0.2234±0.0063	0.0180±0.0013	0.0263±0.0018

図 4.2 暑熱耐性の分散推定値

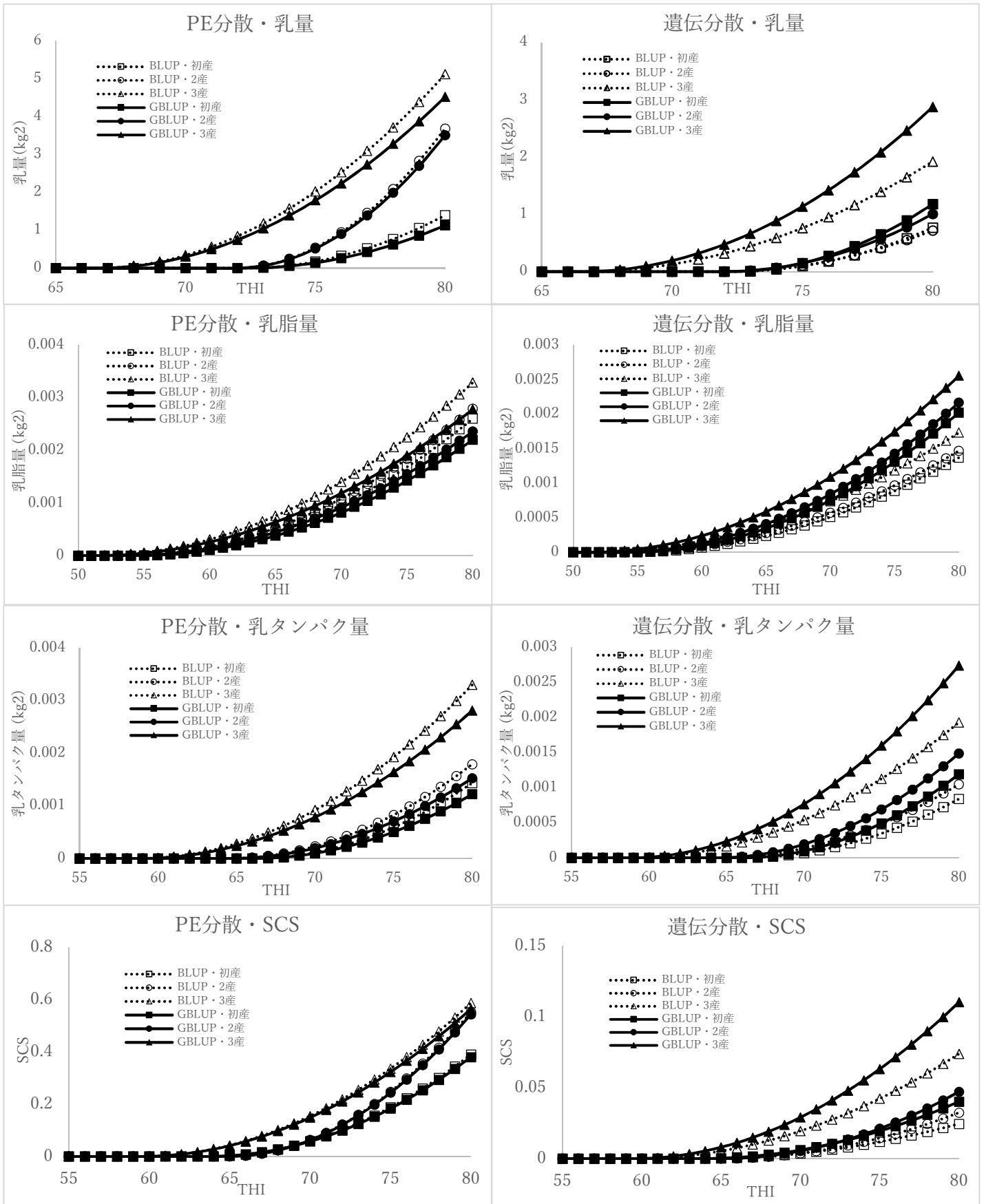
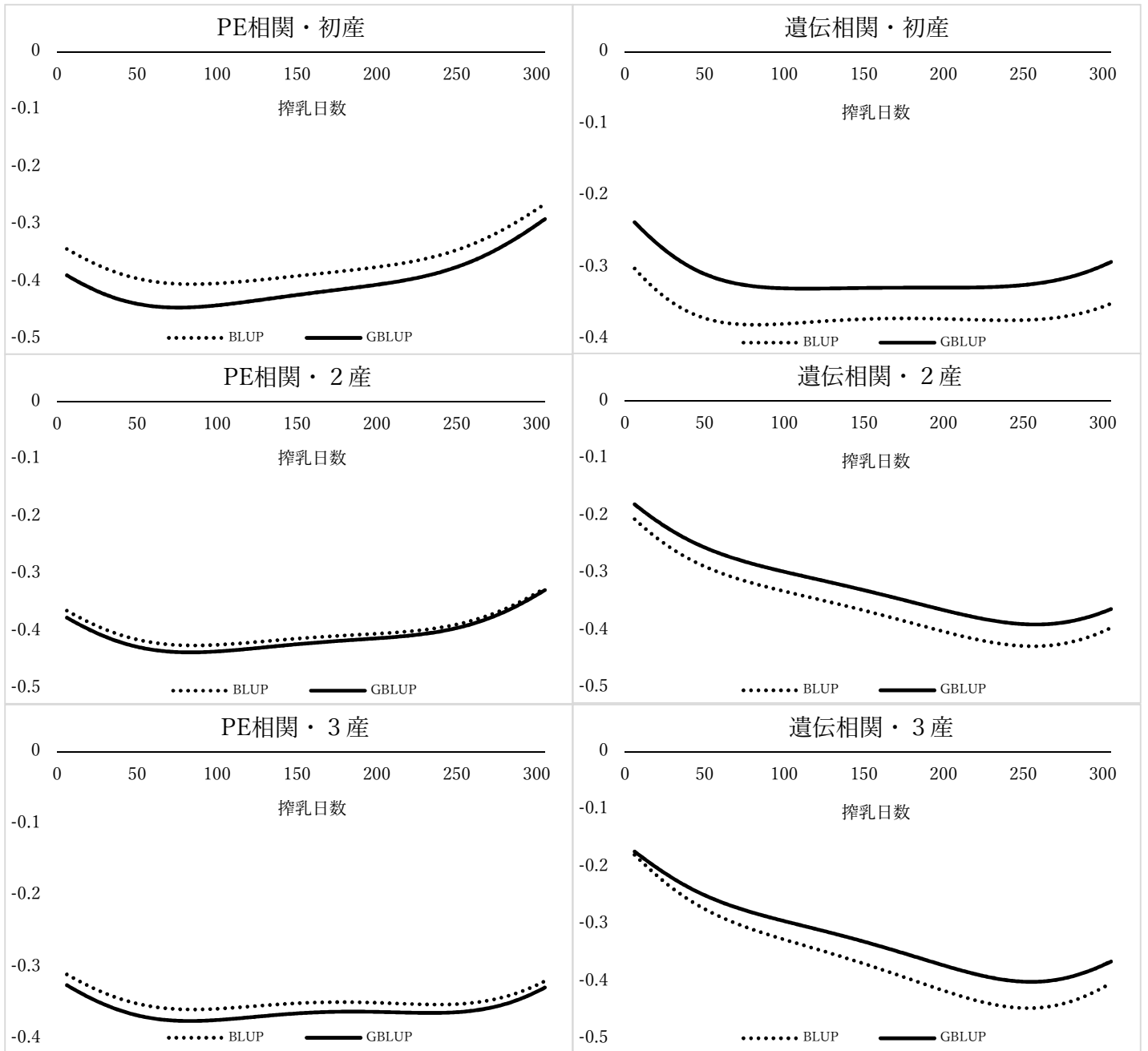
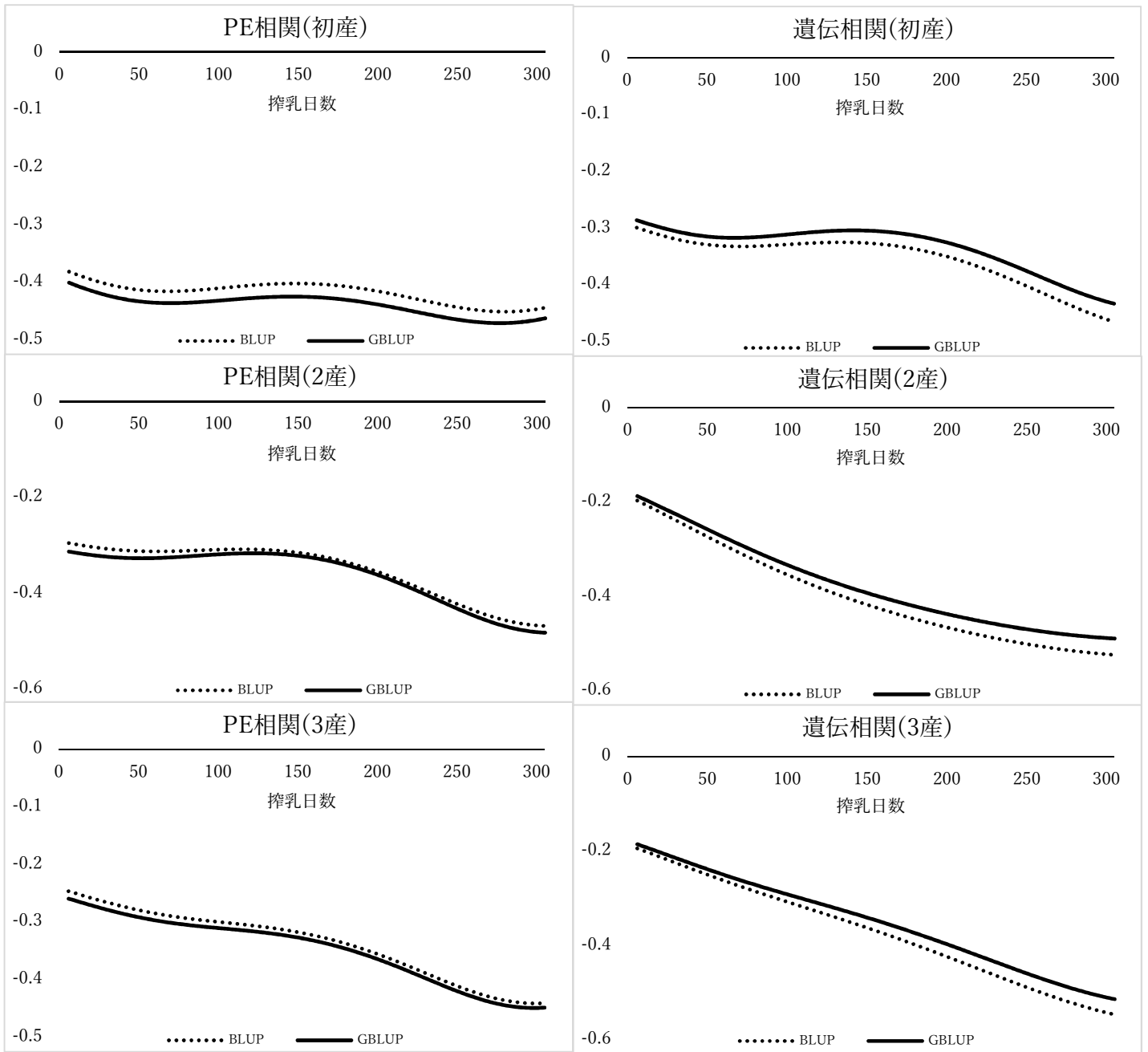


図 4.3 一般的効果と暑熱耐性の相関

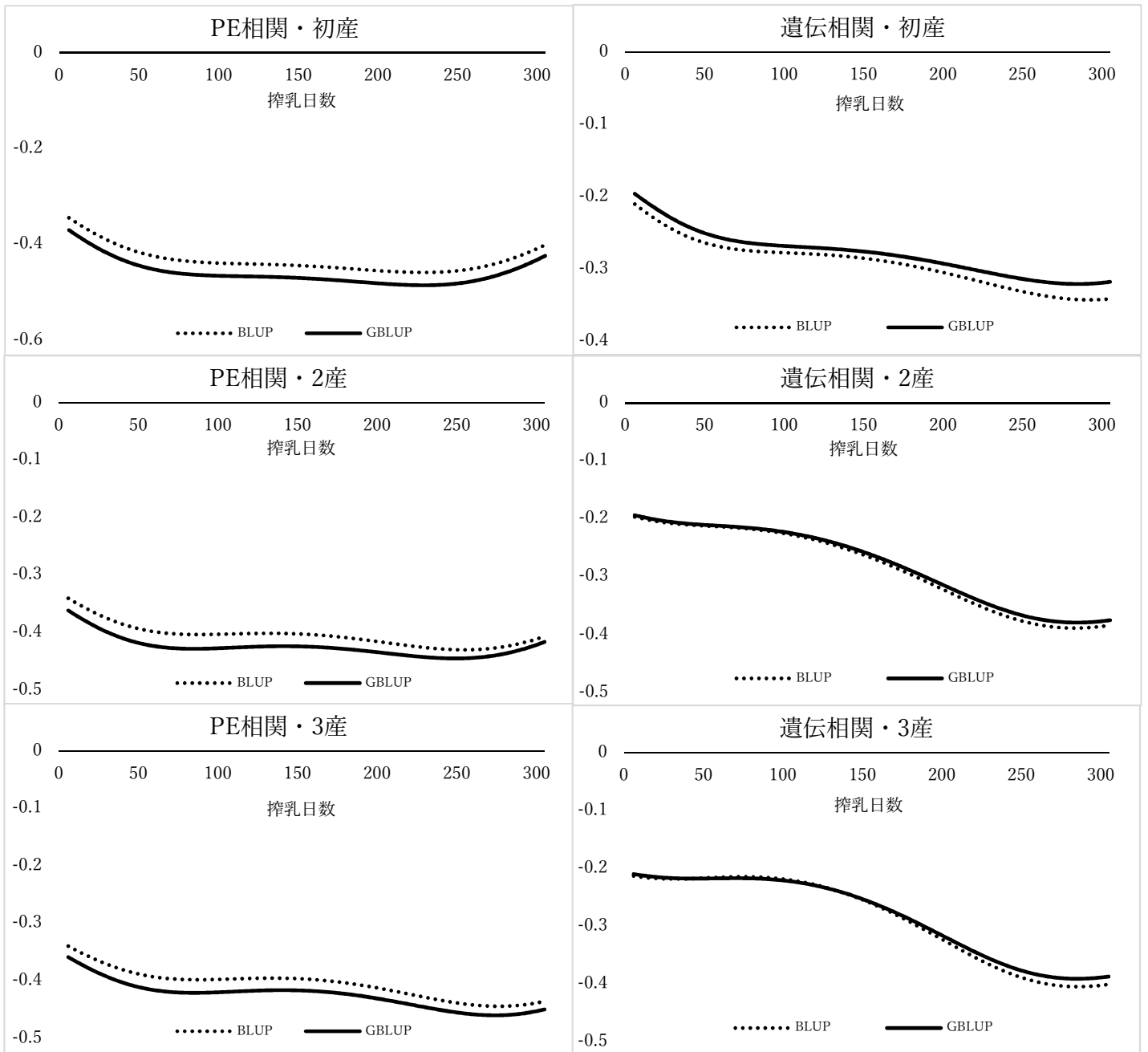
(1)乳量



(2)乳脂量



(3)乳タンパク量



(4)SCS

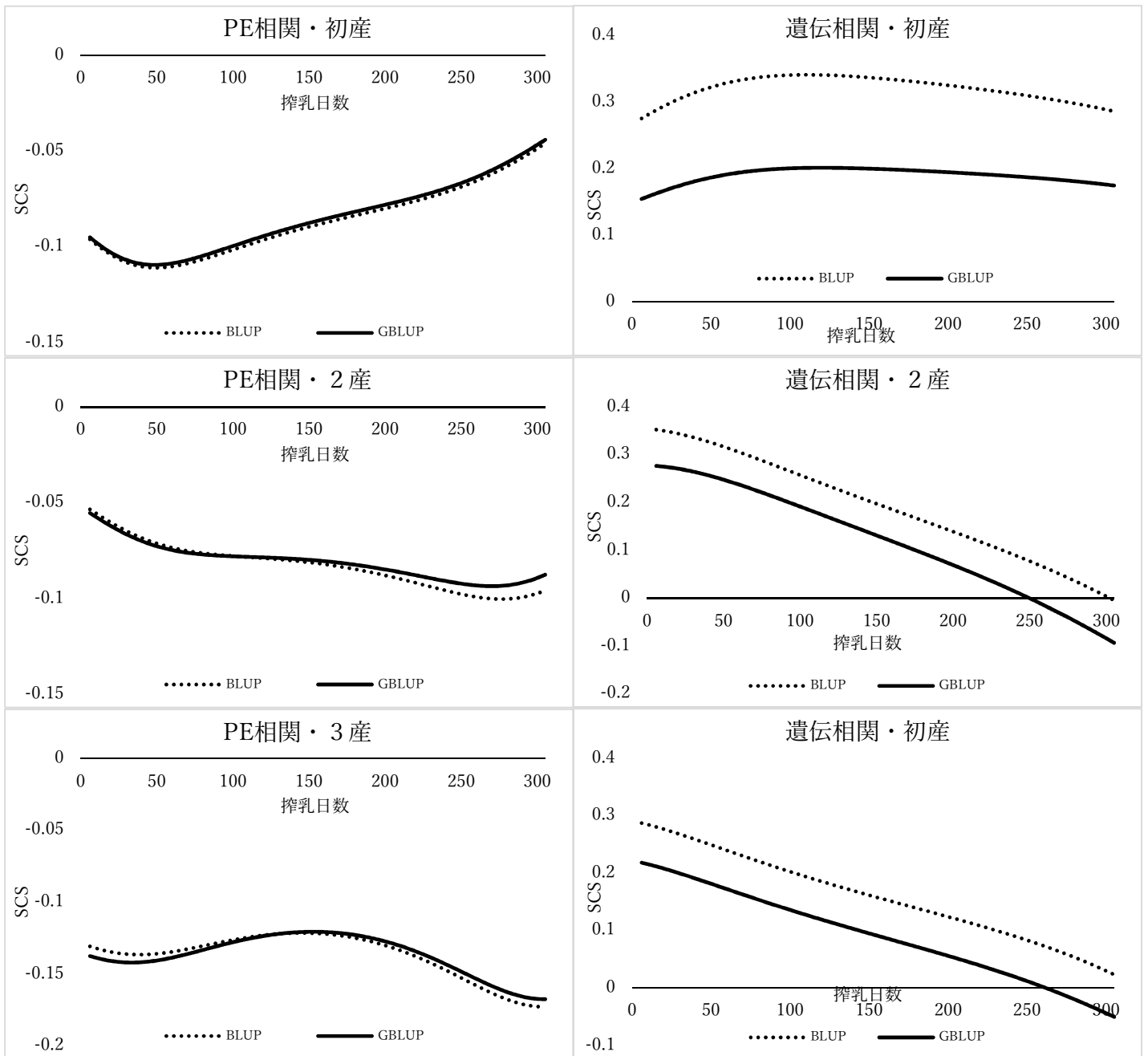




図 4.4 総合遺伝率(ss-GBLUP 法)

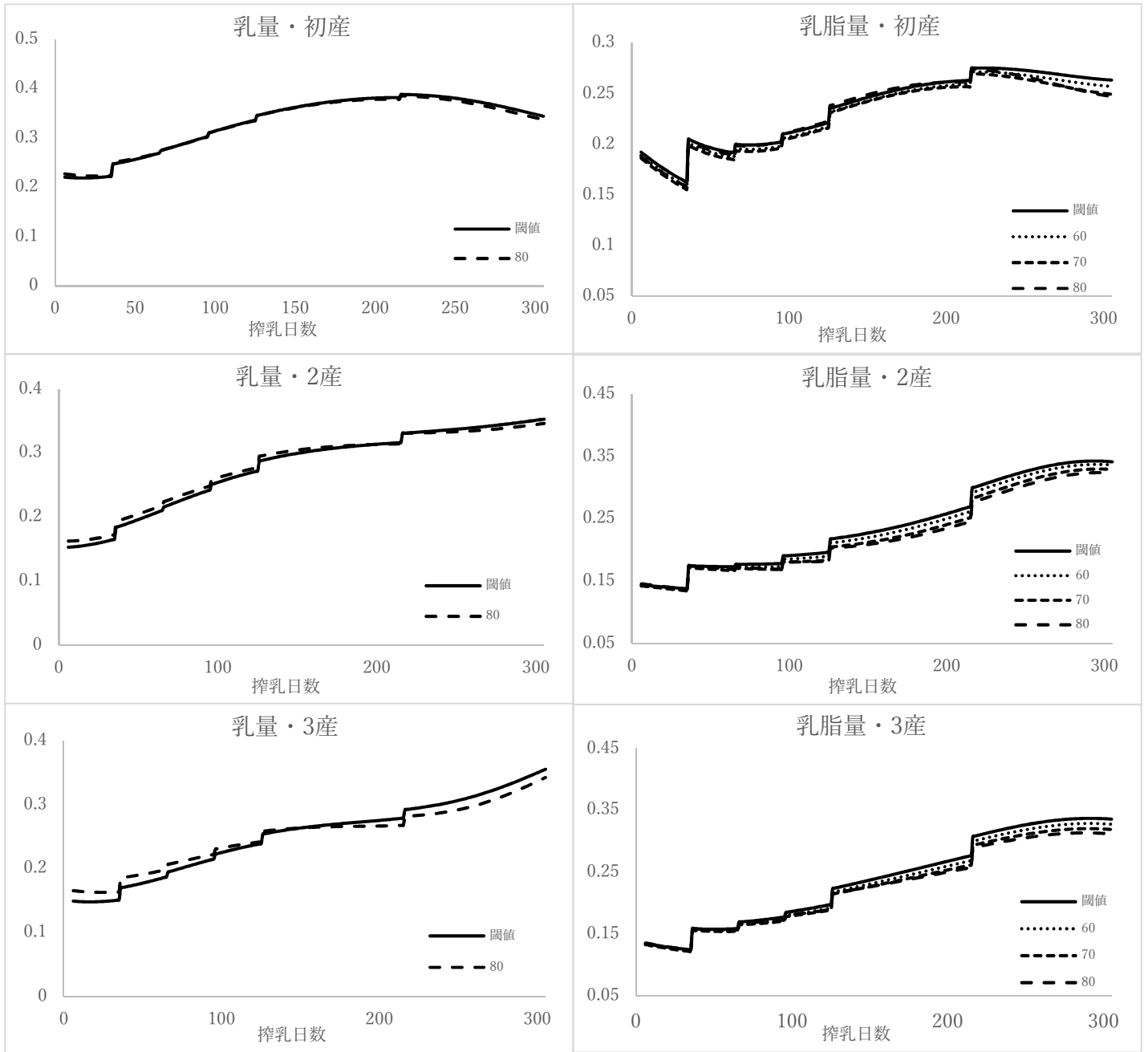
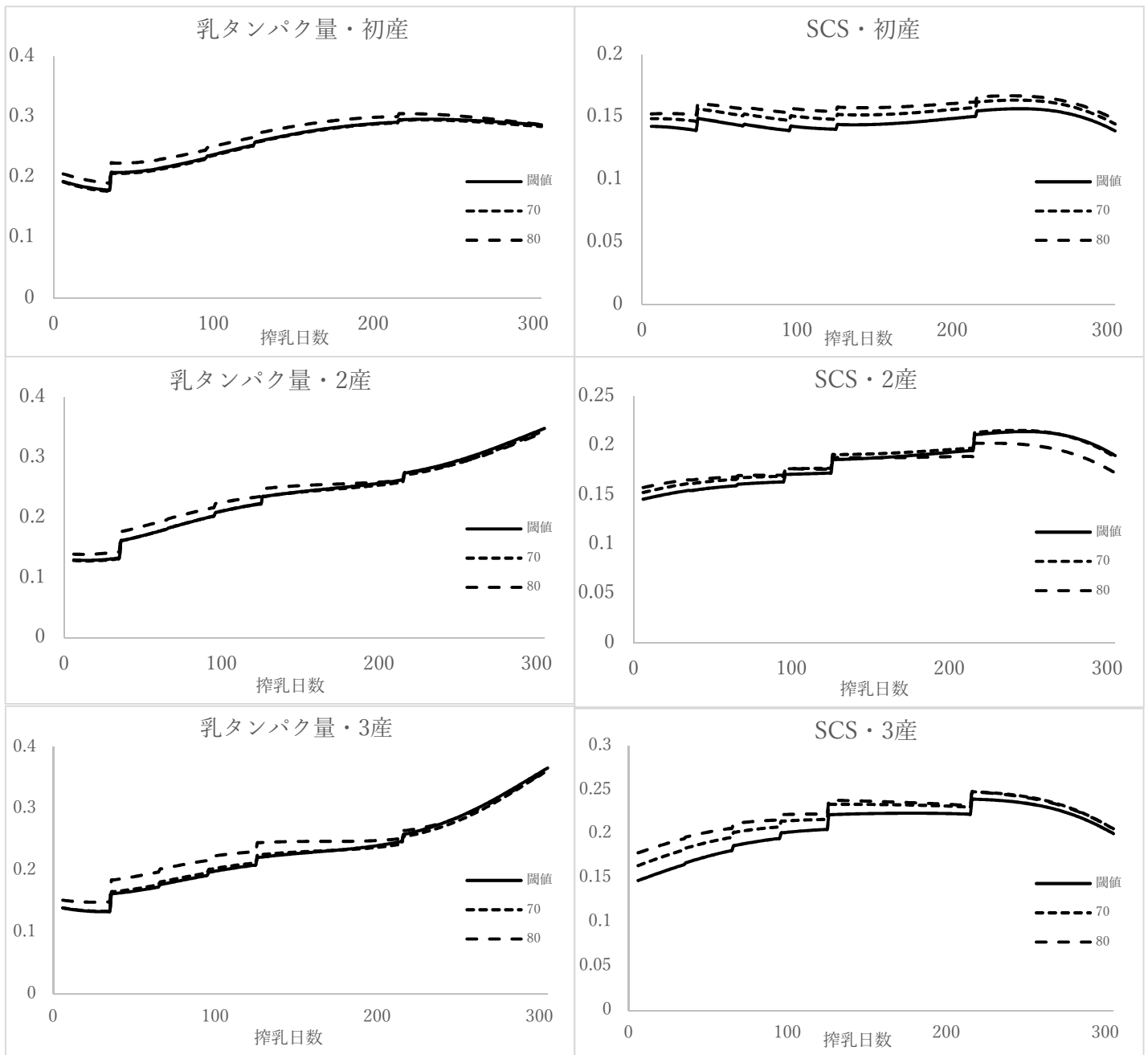


図 4.4 総合遺伝率(ss-GBLUP 法、続き)



#### 4.3.4 暑熱耐性の PE および GEBV の分布

全データを利用して得られた暑熱耐性の、ベース補正前の PE および検定牛または種雄牛の GEBV の分布を図 4.5 に示す。増加または減少の程度はわずかだが、THI の増加に伴って乳量・乳成分量が増加する(正の推定値)、あるいは SCS が減少する(負の推定値)個体が相当程度存在することがわかる。

図 4.5 暑熱耐性のベース補正前 PE/GEBV の分布

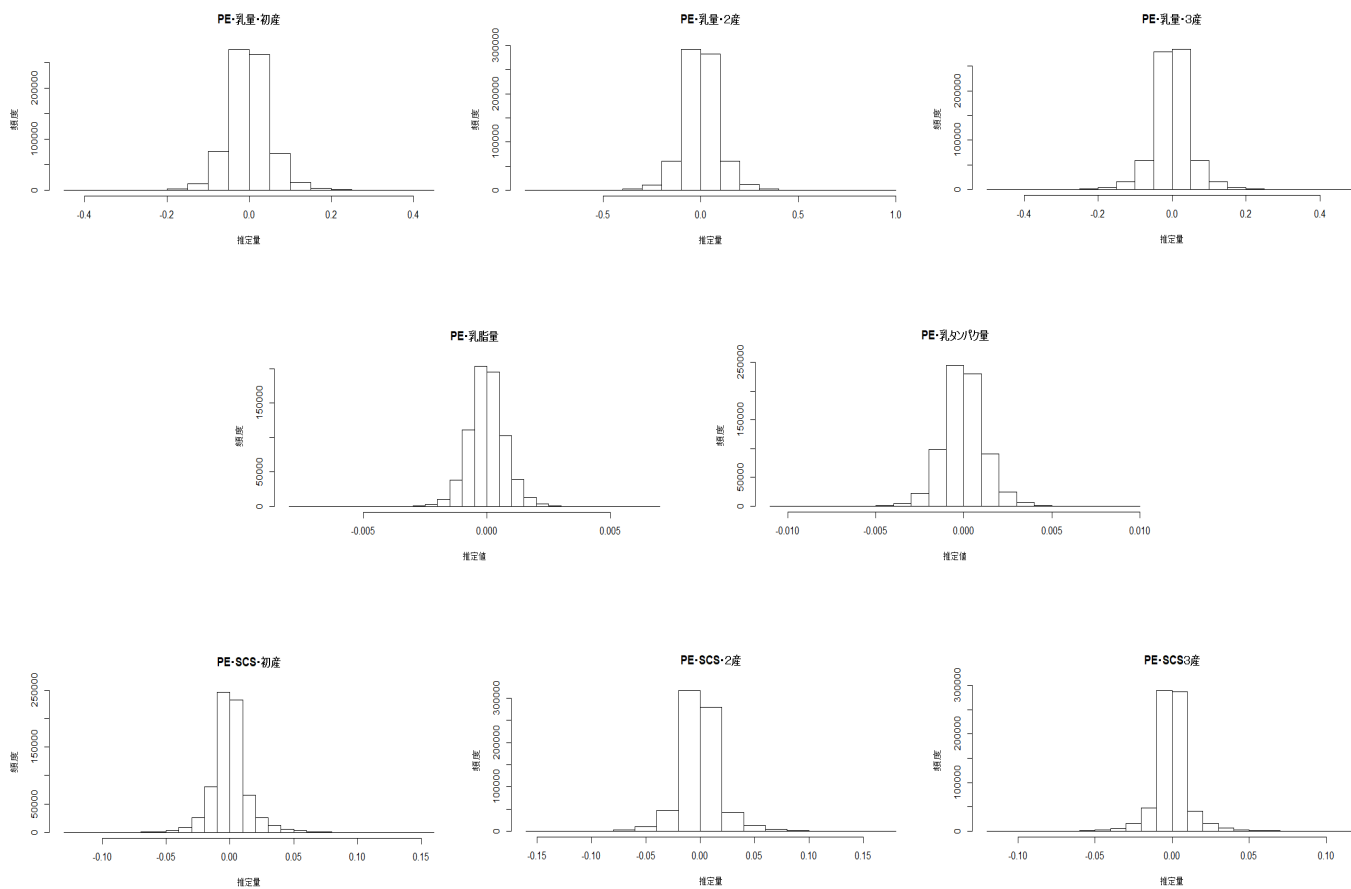
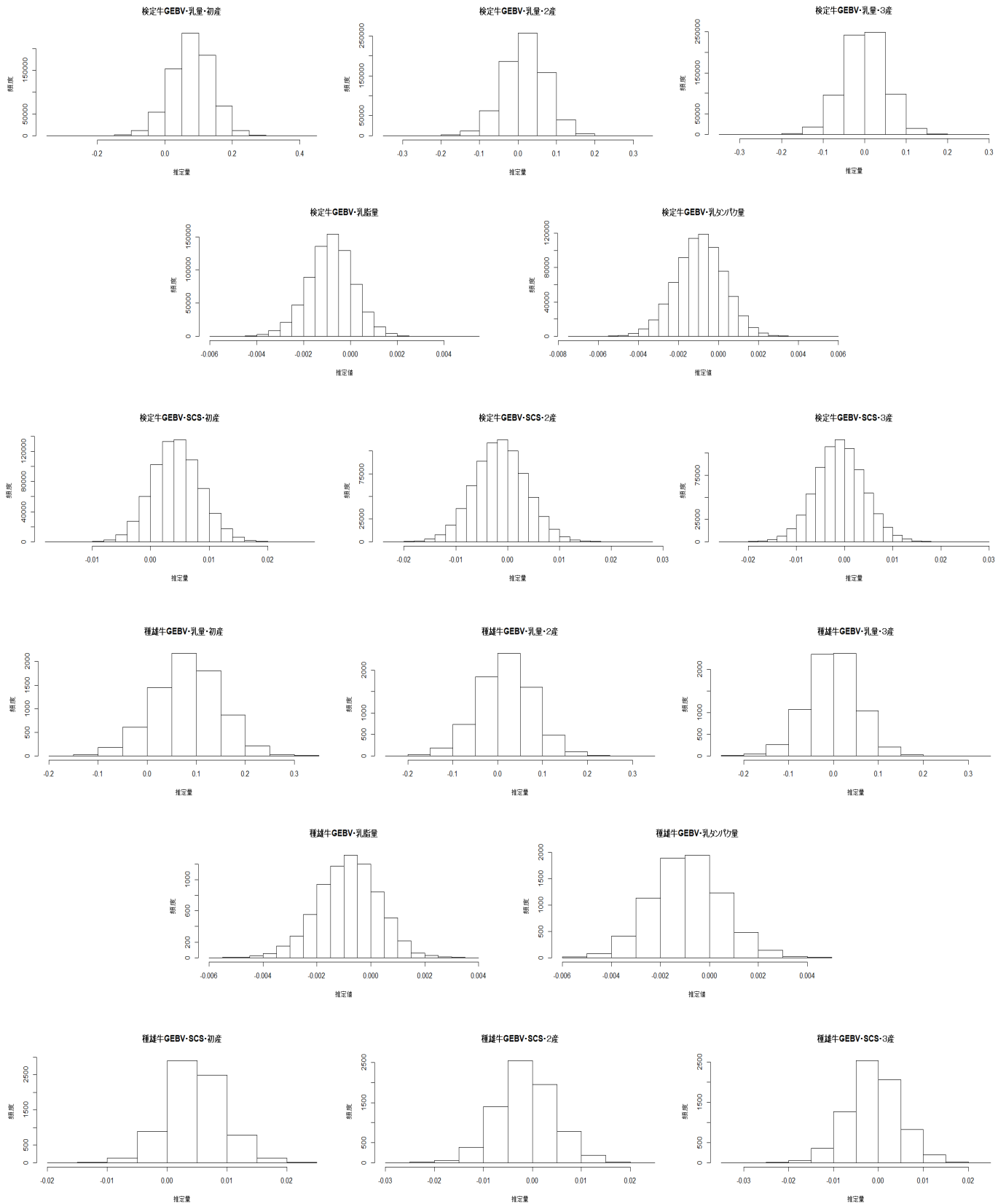


図 4.5 暑熱耐性のベース補正前 PE/GEBV の分布(続き)



### 4.3.5 遺伝的趨勢

暑熱の影響をうけていない thermal neutral zone での GEBV (一般的 GEBV)と THI=80 のときの総合 GEBV および暑熱耐性の GEBV を 1 乳期の値に換算し 2010 年生まれの検定牛 GEBV または PE の平均をゼロとしてベース補正し、趨勢を示したものを図 4.6 および 4.7 に示す。1 乳期の値は乳量と乳成分は各産次の分娩後 6 日から 305 日までの 1 日あたりの GEBV の総和、SCS については 1 日あたりの GEBV の平均である。また暑熱耐性については、THI が 80 の環境に継続的にさらされる場合の推定値である。日本では実際にこうした状況におかれることはなく、誇張された値であることに注意する必要がある。

遺伝的趨勢は、日本の乳用牛全国評価と概ね同様の傾向が見られた。これは、各生年生まれの GEBV 平均の一次回帰から得た年あたり改良量(表 4.7)からもうかがえる。

暑熱耐性の遺伝的趨勢は、乳タンパク量において若干の改善傾向が見られるが、その他の形質では大きく振れ、一定の傾向は見られない。

表 4.7 年あたり改良量(一般的 GEBV)

		初産	2産	3産	全国評価 (2017-8月)
種雄牛 (2002-11年生)	乳量	45.4	54.3	57.1	57.5
	乳脂量	2.0	2.6	2.8	2.2
	乳タンパク量	1.4	1.8	1.8	2.2
	SCS	-0.015	-0.018	-0.017	
検定牛 (2005-14年生)	乳量	41.1	53.9	57.1	60.9
	乳脂量	1.6	2.1	2.4	2.0
	乳タンパク量	1.0	1.4	1.4	1.9
	SCS	-0.011	-0.011	-0.011	

全種雄牛を対象に順位付けを行った場合、THI が閾値以下の場合と 80 の場合で上位100頭がどの程度入れ替わるかを表 4.8 に示した。暑熱耐性の遺伝率は決して高くないが、種雄牛順位の入れ替わりは相当程度起こることがわかった。

表 4.8 種雄牛上位100頭の入替わり(THI<閾値 vs THI=80) (単位: 頭)

	初産	2産	3産
乳量	26	29	39
乳脂量	32	30	25
乳タンパク量	38	32	41
SCS	14	18	15

図 4.6 遺伝的趨勢

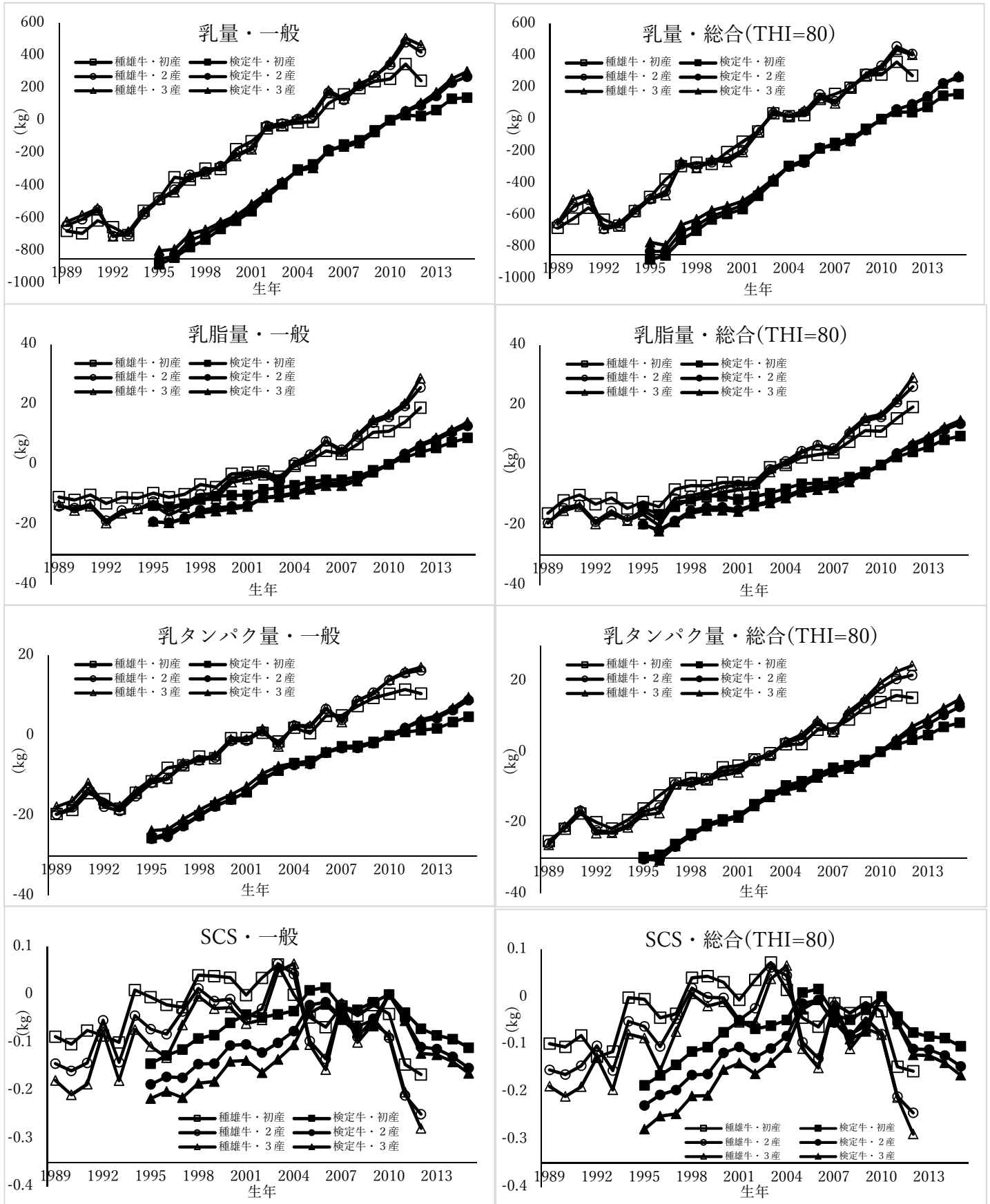


図 4.6 遺伝的趨勢(続き)

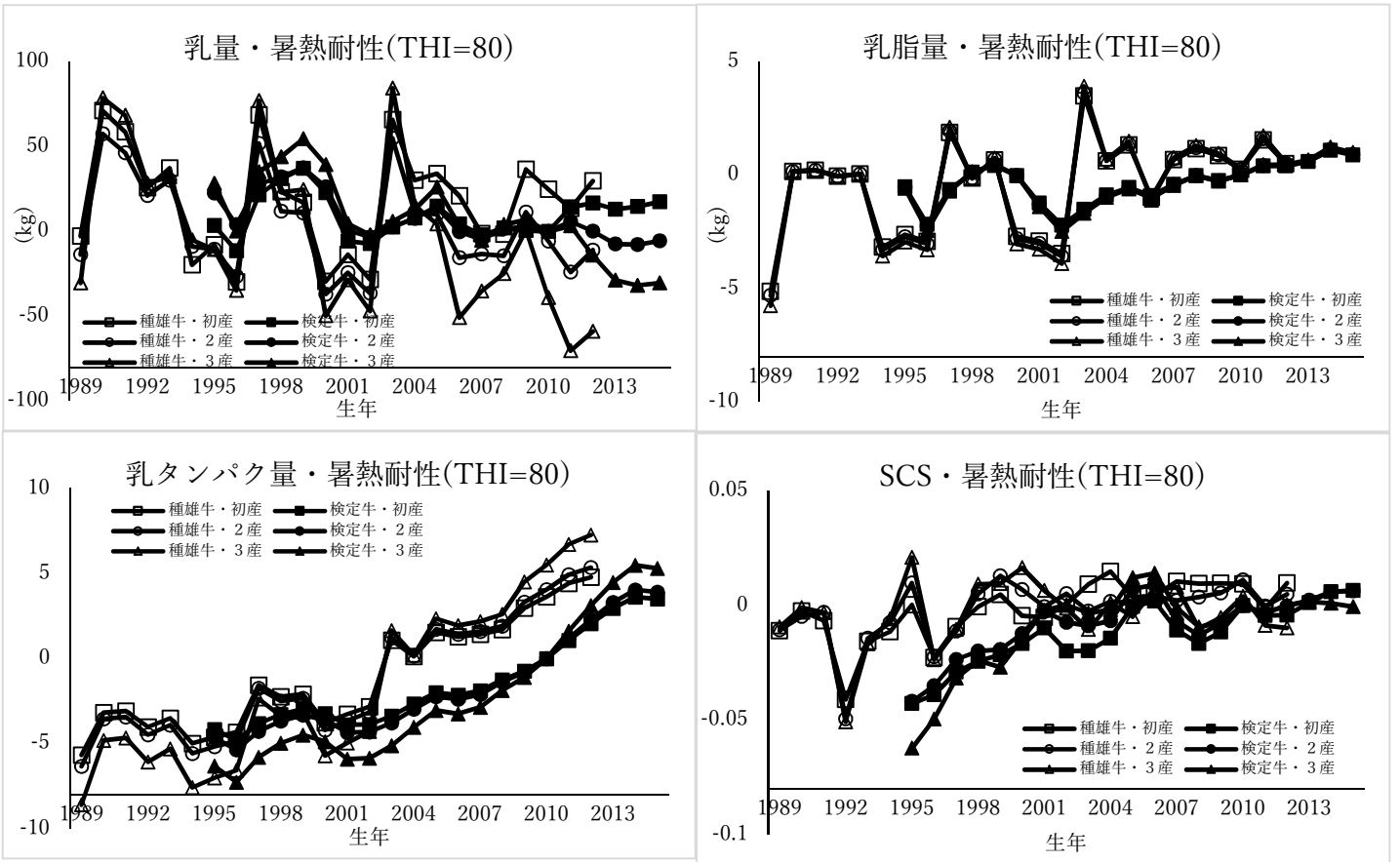


図 4.7 恒久的環境効果(PE)の趨勢

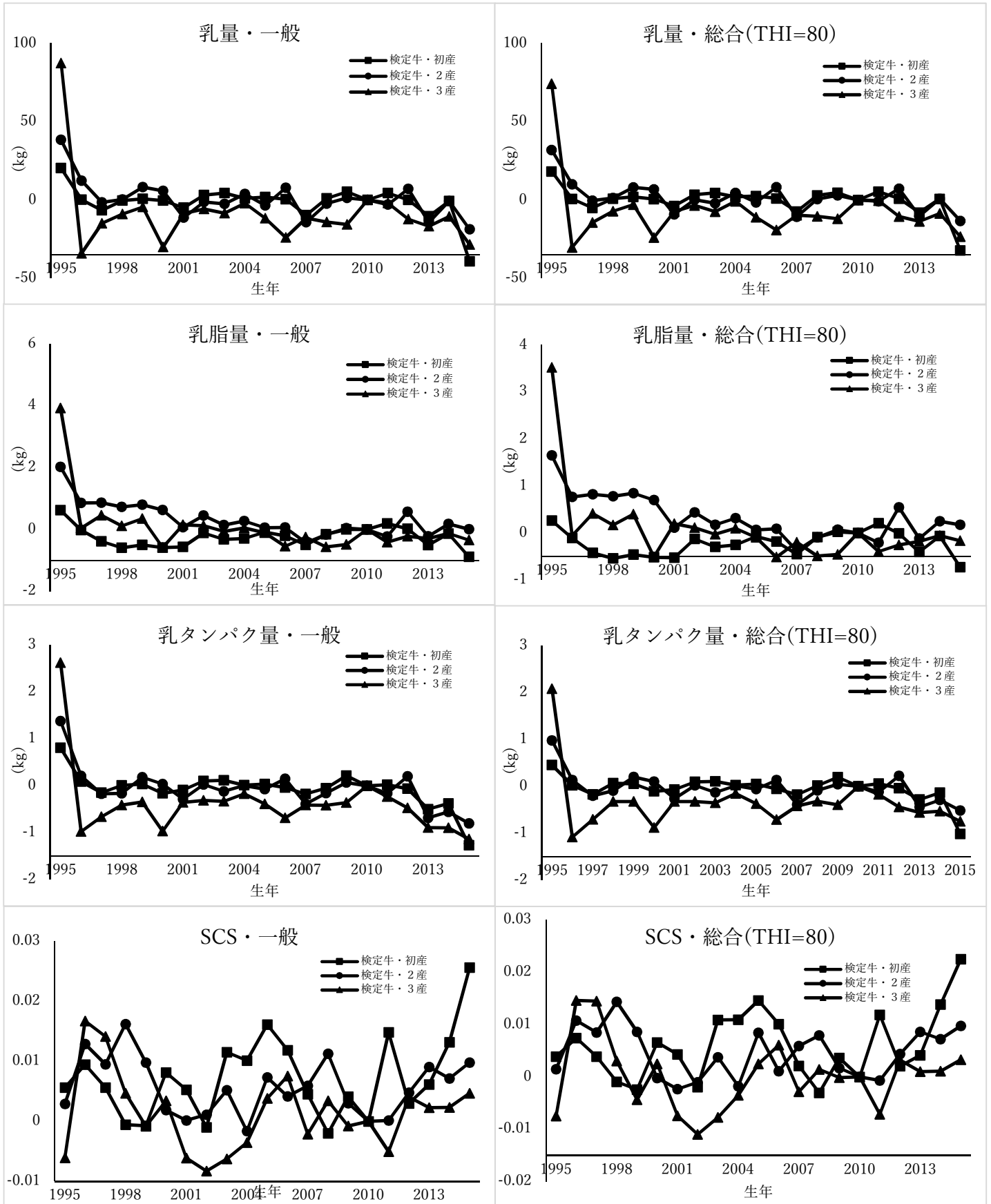
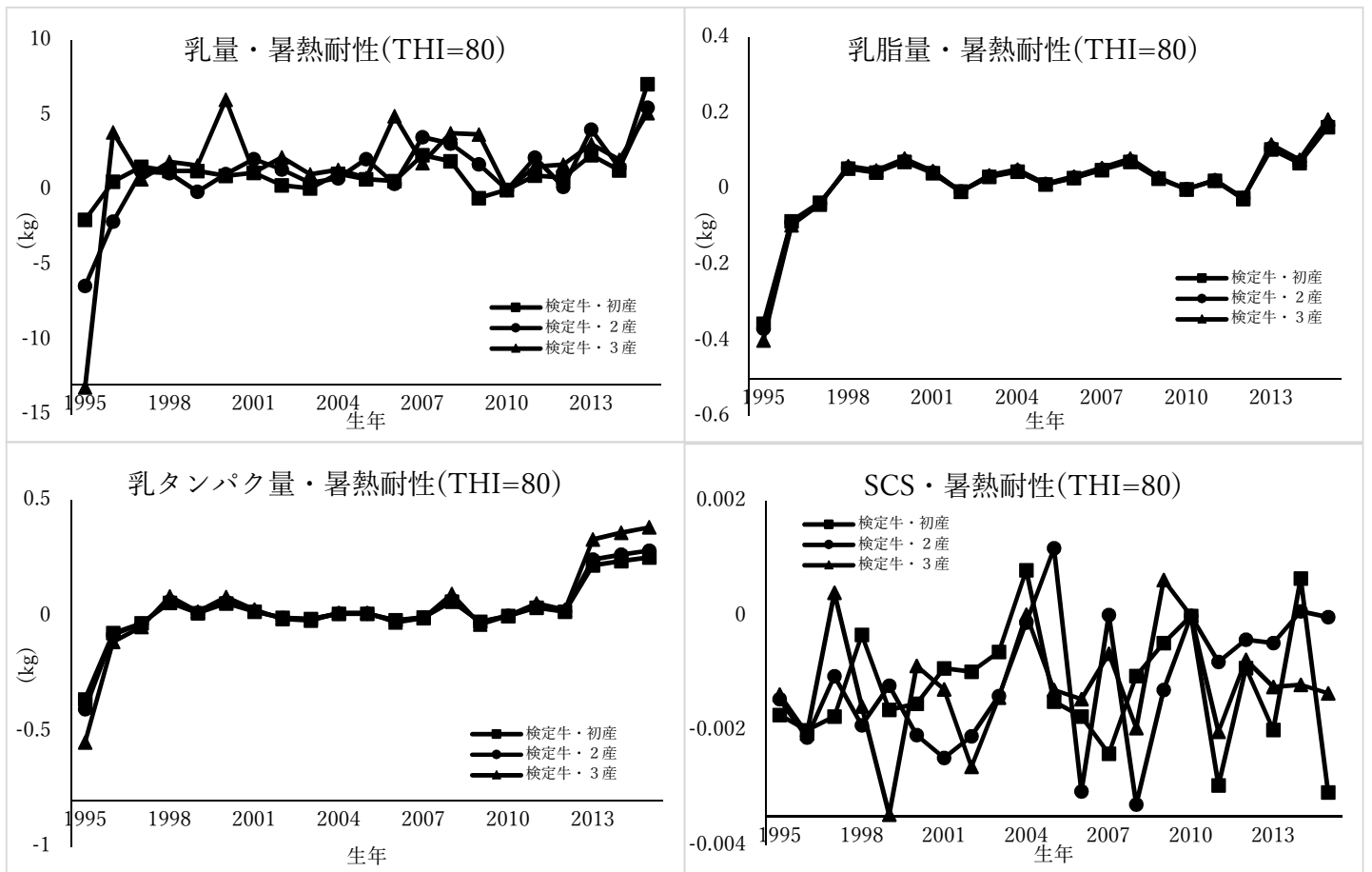




図 4.7 恒久的環境効果(PE)の趨勢(続き)



## 4.4 考察

### 4.4.1 暑熱耐性の閾値と傾きの推定

Ravagnolo ら (2000)はジョージア州の牛群検定記録による複数農場の記録を用い、1THI あたりの乳量、乳脂量、乳タンパク量の減少量を 0.2kg、0.012kg、0.009kg と報告している。一方、農場での実験的なデータを利用し Bouraoui ら(2002)は THI 当たりの乳量減少を0.41kg、West ら (2003)は 0.88kg と報告している。また Herbut と Angrecka (2012)は泌乳能力に応じて3群に分けた実験的データより、高・中・低泌乳群の 1THI 当たりの乳量減少をそれぞれ 0.36kg、0.28kg、0.18kgと報告している。更に Lambertz ら(2014)はフリーストール牛舎の屋根を断熱していない cold loose-housing と断熱している warm loose-housing のそれぞれに放牧の有無を加えた 4 区分で生産量の減少を調べた結果、乳量の減少は泌乳ステージに応じて最大 0.197kg、乳脂量の減少は最大 0.010kg、乳タンパク量の減少は 0.008kg、SCS の増加は最大 0.062 と報告している。

牛群検定記録と気象観測記録を用いた多数の農場データの分析では少数の農場での実験的データに比べて生産量の減少が小さく推定される傾向があり、Ravagnolo ら(2000)は、THI が実際に農場で測定した記録ではないことや、送風機などの対策によるノイズが原因ではないかと考察している。今回得られた結果は彼らと同様の記録を利用したより単純な分析であることから、減少量が過小評価されているわけではなく、用いたデータと統計モデルに応じた結果ではないかと考えられる。なお送風機などの対策によるノイズは、この後遺伝的効果を推定する際には、牛群・検定日・搾乳回数の効果に織り込まれると期待できる。

Armstrong (1994)は乳量の多い牛が暑熱影響を受けやすいことを報告しており、さらに、West(2003)は暑熱ストレスによって摂食・代謝量が減り、体内温度を下げるため泌乳組織以外への血流が増えることで乳の生産量も減ると説明している。今回、産次が進んで乳量や乳成分量が増えるにしたがい、暑熱に対する閾値が低くなり、1THI 当たりの生産量の減少も大きくなるということが日本の牛群検定記録からも明らかになったが、高泌乳群における暑熱対策の重要性が裏付けられたといえる。

### 4.4.2 遺伝的パラメータの推定

今回の分析で得られた遺伝率は、初産のみデータ(表 4.4)および初産から 3 産の3分割データ(表 4.6)の間で若干異なるが、閾値の設定をより厳密に行ったことや複数産次記録を利用した情

報量の増加が影響しているものと考えられ、後者のほうがより正確な推定値であると考えられる。先行研究で報告された総合遺伝率(表 4.9)と比べた場合はほぼ同様か若干高めであり、妥当な推定値であると考えられる。

しかし、日本の乳用牛全国評価の遺伝率は、乳量 0.500、乳脂量 0.498、乳タンパク量 0.429 (家畜改良センター, 2017)であり、類似の評価モデルを利用しているにもかかわらず今回得られた遺伝率はこれらより小さい。乳用牛全国評価では牛群内分散を前補正していることに加え、2000年以降に分娩した記録に限って採用したこと、北海道の記録を採用していないことから、集団が異なることが影響している可能性がある。暑熱の影響について検討する上で、北海道の記録追加は情報量の増加につながらないが、近年の温暖化によって北海道でも記録されている猛暑を考慮すると、北海道を含めた暑熱の分析は将来的に必要なと考えられる。いずれにしても、対象とする集団に応じて推定した遺伝的パラメータを用いて評価を行うのが基本であり、定期的な遺伝的能力評価を行う場合には全国の記録を用い、牛群内分散の前補正を実施したうえで、遺伝的パラメータの推定を行うべきである。

表 4.9 先行研究の総合遺伝率

	乳量	乳脂量	乳タンパク量	SCS
Ravagnolo and Misztal, 2000	0.16~0.21	0.13~0.15	0.15~0.21	-
Aguillar <i>et al.</i> , 2009	0.07~0.27	-	-	-
Brügemann <i>et al.</i> , 2011	-	-	0.02~0.23	-
Bernabucci <i>et al.</i> , 2014	0.09~0.23	0.13~0.23	0.10~0.18	0.07~0.13
Hammami <i>et al.</i> , 2015	0.19	0.16	0.15	0.08
Santana <i>et al.</i> , 2016	0.20~0.38	-	-	0.13~0.23
本研究(THI=閾値)	0.252~0.332	0.236~0.239	0.230~0.258	0.147~0.208

今回利用した統計モデルでは個体固有の効果として、PE と GEBV の2つの効果を推定している。PE 分散と遺伝分散は形質および搾乳日数を通じて一貫して PE 分散の方が大きい。特に暑熱耐性の PE 分散が遺伝分散より大きいことから、様々な相加的遺伝効果以外の個体固有の効果の蓄積が暑熱耐性に影響していることがうかがえる。

一般的効果と暑熱耐性の遺伝相関は SCS を除き、先行研究と同様マイナスと推定された。すなわち、暑熱耐性の遺伝的改良に重点を置きすぎると一般的な遺伝的効果を下げることにつながるから注意を要する。本研究では THI が 80 のときの遺伝分散などを標記しているが、日本では7、8月の真夏に、THI が 80 を超える日が宮崎で 19 日、鹿児島では 53 日も存在することから、本研究ではこの値を一つの目安として表示した。乳期を通じて THI が 80 の環境に置かれると

いう仮定は極端だが、夏の生産量維持を目標とするのであれば一つの目標値になるかもしれない。いずれにしても、一般的効果と暑熱耐性の効果のバランスをとるためには目標とする THI を定め、一般的効果と暑熱耐性の効果の両方を織り込んだ総合 GEBV によって順位付けを行なうのが適当ではないかと考えられる。

SCS を除き、一般的効果の遺伝分散や遺伝率は泌乳後期になるに従い大きくなり、泌乳持続性の遺伝的効果によって、ばらつきが出てくるのではないかと考えられる。また、THI の上昇に伴い暑熱耐性の遺伝分散は大きくなるが、SCS を除き一般的効果と暑熱耐性の遺伝相関がマイナスであるために打ち消しあい、これらの形質の総合遺伝分散および遺伝率は小さくなる。一方 SCS では相関が正であるため、総合遺伝分散および遺伝率は大きくなる。

ゲノム情報を用いた ss-GBLUP 法による分散成分推定値と t-BLUP 法による推定値と比較した場合、遺伝分散については ss-GBLUP 法の推定値が t-BLUP 法よりも大きく、PE 分散については ss-GBLUP 法の推定値が t-BLUP 法よりも小さくなった。ss-GBLUP 法のようなゲノミック評価においては t-BLUP 法では考慮することのできないメンデルアンサンプリングの効果を考慮することができ、より正確な推定が可能になる (Daetwyle ら, 2007)、あるいは、遺伝率の低い形質を含め、形質間のバランスをとりつつ持続可能な改良が可能になる (Boichard ら, 2016) といわれている。本研究では t-BLUP 法ではとらえることができず PE に含まれていた分散の一部を ss-GBLUP 法によって遺伝分散としてとらえることができたと考えられ、暑熱耐性のように遺伝率が低い形質で ss-GBLUP 法はより大きな効果を発揮しうることが示唆された。

合理的な遺伝的パラメータが推定できたことから、シングルステップ法による暑熱耐性のゲノミック評価は可能であると考えられる。

#### 4.4.3 GEBV を利用した分析

本研究では暑熱耐性の PE および GEBV が正の値、すなわち、THI の増加にともなって乳量等が増える個体が相当程度存在することが明らかになった。変量回帰モデルでは回帰係数に 0 を中心とした正規分布を仮定していることから、推定値がこのような値になるのは必然であると考えられる。ルジャンドル多項式を用いた場合であっても、分布の過程は同様であることから、程度に差はあるとしても同じ問題を持っているものと考えられるが、先行研究にはこのような問題意識からの考察はない。Hammami ら(2015)は統計モデルの右辺に一次のルジャンドル多項式を加え、全データに共通の THI に応じた効果を含めている。このような効果を含めた場合、PE や GEBV は THI

による共通の効果を補正した上で得られていると考えられるが、すでに存在する牛群・検定日・搾乳回数の効果と暑熱耐性の PE 又は GEBV の間の交絡に加え、全体に影響する大きな交絡を含むことになることから、分散成分の推定が難しくなるといった問題が生じる可能性も考えられる。

Hammami ら(2015)は、C18:0、C18:1 cis9、飽和脂肪酸、1価不飽和脂肪酸脂肪酸、多価不飽和脂肪酸、長鎖不飽和脂肪酸が THI の上昇に伴って増えることを報告しており、また、Liu ら(2017)は THI の上昇に伴って短鎖および中鎖脂肪酸を含むトリアシルグリセロールが減少し、長鎖脂肪酸を含むトリアシルグリセロールが増えることを報告している。こうした THI の上昇に伴って増える乳成分を生産する能力が高い個体と低い個体がいるならば、THI の上昇に伴って生産量が増える現象は説明できるのかもしれない。しかし、Bainbridge ら(2016)は奇数分枝脂肪酸の泌乳ステージに応じた増減について説明する中で、これらは第四胃の細菌や原虫によって生産されると説明しており、遺伝的な効果としてとらえるならばその様式は母性遺伝と考えるのが妥当であろう。

個体の順位付けができればよい、と割り切れば、THI の上昇に伴う乳量等の上昇は無視しても構わないのかもしれないが、評価値の利用者である酪農家や技術者に説明する上では困難を伴うことが想定されることから、実用化のためにはこの問題を解決するのが望ましいと考えられる。

遺伝率が異なるにもかかわらず、総合 GEBV の遺伝的趨勢は日本の乳用牛全国評価と同様となり、推定は合理的に行われたことが伺える。また暑熱耐性の改良を行っていないことから、遺伝的趨勢に一定の傾向が見られない形質については、暑熱耐性を考慮することで改善を図る必要があると考えられる。一方乳タンパク量については、従来目標としてきた他の形質との遺伝相関でプラスの傾向が出たものと考えられ、他の形質との相関を詳しく調べれば、効率的な改良が期待できるかもしれない

遺伝率が大きくないにもかかわらず、THI が閾値以下のときと 80 のときで上位にランキングする種雄牛を比較した場合、相当の入れ替わりがあることが明らかになった。ランキングを分析するには評価値信頼度を含めた分析が好ましいが、一般供用する種雄牛を選定する場合に暑熱耐性の影響を含めた総合 GEBV を利用する意味はあるものと考えられる。

#### 4.4.4 評価手法の改善と今後の展望

本研究では、計算をなるべく単純にするため、THI の影響を個体ごとの直線回帰でモデル化し、すべての個体に同じ閾値を仮定した。Ravagnolo と Misztal (2000)、Aguilar ら(2009)、Bernabucci

ら(2014)といった報告がこのモデルを採用しており、理論的に理解しやすく魅力的であるが、遺伝分散が THI の上昇とともに必ず大きくなること、生物学的な変化が漸進的で滑らかであることを考えると制限が多いモデルといえる。一方、Hayes ら(2003)、Brügemann ら(2011)、Hammami ら(2013)、Carabaño ら(2014)、Nguyen(2016)といった多くの報告では、THI の影響を個体ごとのルジャンドル多項式でモデル化している。この場合、すべての個体で同じ閾値を仮定する必要はなく、生物学的な変化を滑らかに表すことができるが、情報量が少ない両端の値で非現実的な当てはまりが起ることが指摘されている(Carabaño ら, 2017)。Carabaño ら(2016)は周辺密度の対数(logarithm of marginal density)および将来の記録の予測能力によって両者を比較した場合に様々な気候下においてルジャンドル多項式を用いたほうが当てはまりがよいことを報告している。全体としては二つのモデルとも選抜指標をえることができるとされている(Carabaño ら, 2017)が、制限が少ないルジャンドル多項式の利用も今後検討すべきであろう。

今回採用しているモデルでは、泌乳ステージにかかわらず暑熱の影響は一定としている。しかしながら、初産よりも乳量が増える2産3産の方が暑熱の影響が大きいと考えるのと同様、泌乳のピーク時の方が乳量減少の影響は大きいと考えるのが自然であり、今回の分析モデルによって得られた暑熱耐性の効果はその一部であると考えられる(Misztal ら, 2006)。できればこうした点も含めた分析ができるのが望ましい。しかしながら飼養環境が様々な農家で月1回測定される乳量などの情報と、気象官署の気温・湿度による分析では、暑熱耐性という生物学的に複雑な現象を分析するには依然として情報不足かもしれない。

暑熱耐性については、乳量等の減少を指標とした分析だけでなく体温に着目した研究もおこなわれており、Mariasegaram ら(2007)は 20 番染色体上に存在する slick hair gene を暑熱耐性に関係する突然変異として報告している。Dikmen ら(2013; 2015)は直腸温や呼吸数、発汗率などの記録から GWAS によって候補遺伝子を探索し、SLC01C1 というサイロキシンの運搬に関係し、代謝率と体温に関係遺伝子が暑熱耐性に関係することを報告している。GWAS を用いた分析は Deb ら(2013)、Hayes ら(2009)、Howard ら(2014)にも報告されているが、遺伝子の検出も容易ではない。

暑熱耐性が代謝と深い関係にあることから、バイオマーカーを用いた研究もおこなわれたが、血中のバイオマーカーを用いるにはコストがかかる。一方乳汁中のバイオマーカーはこれより容易に分析することができ、Hammami ら(2015)が報告している中赤外線を用いて測定した脂肪酸組成はバイオマーカーとして利用できる可能性がある。また Tian ら(2016)は、血しょう中にも乳汁中にも存在する 10 のバイオマーカーが暑熱耐性に関係していると報告している。オミックスの時代と

なった今、得られる様々な情報を有効に活用した分析により、暑熱耐性の問題にあらたな展開があるかもしれない。

#### 4.5 摘要

ss-GBLUP 法によって暑熱耐性の効果を含めた遺伝的パラメータの推定に成功し、おおむね、日本の全国評価や先行研究と矛盾のない結果が得られたことから、暑熱耐性を考慮した ss-GBLUP 法による遺伝的能力評価は可能であると考えられる。しかしながら実用化のためには、暑熱耐性の GEBV が正の値になる問題を解決する必要があると考えられる。

## 5. 総合考察

育種改良の分野では、1920 年ごろに Fisher(1918)、Wright(1921)らが量的遺伝学の基礎を確立して以降、統計学的手法による研究が進んだ。Henderson(1953)以降 MME を利用した研究が進み、REML 法といった現在も広く用いられている分散成分の推定法が実用化され、現在に至っている (Searle, 1991)。一方 1990 年代になると PCR 法の普及と様々な遺伝子マーカーの発見によって、これらを利用した MAS の実用化が検討された。様々な影響が複雑に絡み合う経済形質についても、DNA の解析ですべてが明らかになると期待されていたが、生物学的な現象は複雑で、残念ながら今日においても実用に足る成果をあげたとはいえない。その原因の一つは、関係者が4つの塩基の組み合わせがすべてを決定するというわかりやすい説明を受け入れる一方、MASにおけるマーカー遺伝子型と経済形質との関連はごく単純な統計学的分析に基づいていたという点を重視していなかったためではないかとも思われる。

2010年前後から DNA マイクロアレイを用いて配列情報が簡単かつ大量に得られるようになり、これを統計学的手法に活用し、いわば統計学的手法と遺伝子配列を利用した手法を融合したゲノミック評価が行われ、Henderson 以来の流れが一つの大きな変化を迎えている。本研究では DNA マイクロアレイを用いて得たゲノム情報を利用した GEBV 計算法の中でも、家畜育種の分野で近年最も注目されている ss-GBLUP 法を用い、重要性が指摘されながら遺伝率が低いなどの要因によって分析が進められていなかった牛の経済形質のうち、種雄牛の精液性状と乳用牛の暑熱耐性に関する分析を行った。

20 年前にはスーパーコンピュータと呼ばれた大型汎用計算機でさえ持つことが難しかったギガ単位のメモリーを、現在ではタワー型の PC があたり前に持つようになり、CPU の処理速度の向上とあいまって複雑な分析が研究室のデスクの傍らで実施可能になっている。また、分析用のソフトウェアも優れたものが公開され、利用可能であるために理論的背景をあまり重視しなくても分析を簡単に進められるようになってきているが、分析が困難に差し掛かった際にはその理論的背景に立ち戻って考察し、問題を解決する必要がある。第2章では研究の一助として、DNA マイクロアレイで得られるゲノム情報を MME で利用するために必要なゲノミック関係行列の作成法、ss-GBLUP 法で利用する混合行列  $H$  の分子血縁行列とゲノミック関係行列からの作成法、大規模データ利用した分析に有用な公開ソフトウェアとその計算理論といった技術的な説明を文献レビューとして取りまとめた。



第3章では種雄牛の精液性状について、ss-GBLUP 法を用いた分析を行った。畜産の分野では繁殖性は経済性に影響を与える大きな問題であり、精液性状は繁殖性向上のための要因の一つであるが、様々な要因が複雑に絡み合う繁殖性のなかで精液性状はそのごく一部であり遺伝率も低いと考えられてきたことから盛んに研究されることはなかった。人工授精に用いる凍結精液が十分な繁殖成績を上げるのは商品として当然のことであるといった考えや、個体差を見出すことによって経済的に優れた点があっても精子活力の低い牛は使われにくくなるといった懸念も存在したかもしれない。繁殖性の向上に対する様々なアプローチの一つとして今回、精液性状について分析した結果から明らかになったことの一つは、いわゆる近交退化の問題であった。優れた種雄牛の集中利用によって成果を上げてきた牛の遺伝的改良だが、様々な効果を総合的に考慮することが今後ますます重要であり、精液性状のような効果もその一端を担うことができる可能性があるのではないだろうか。

第4章において検討した乳用牛の暑熱耐性に関する改良は、西南暖地の日本の酪農家から、20年以上前から要請されていた課題だが、残念ながら当時はその糸口を見出すのさえ難しかった。近年、地球温暖化が顕在化すると同時に巨大な人口を抱えるアジア地域において牛乳乳製品の需要が増えており、酪農生産の環境への適応に関する問題として、その重要性は以前よりも高まっている。本研究では ss-GBLUP 法という新しいゲノミック評価の手法を用いてこの課題に挑戦し、試行錯誤を重ねながら分散成分の推定に成功した。しかしながら、得られた推定値を生物学的な合理性から検討したところ、実用化に向けて解決すべき問題があることが明らかになった。糸口さえつかめなかった問題は、一步前進したと思われるが、引き続き、合理的な選抜指標を得るための研究を続ける必要がある。

ゲノム情報は今後ますます安価かつ大量に得られるようになり、動物、植物を問わず生物学的発見の基盤としてのゲノミック評価(Hickey ら, 2017)が、育種改良をはじめとしたさまざまな場面で利用されていくことだろう。また近い将来、解析速度の向上とも相まって、環境要因だけでなく他のオミックス情報を加えた統合モデリングへと発展し、内容はますます複雑化するものと考えられる。こうした複雑な分析により、未解明の様々な生物学的現象が解明されることによって、動植物の生産活動だけでなく、医療や工業的分野でもさらなる進展が見られるかもしれない。そのためには、産業への応用を念頭に置いた実データの分析において、統計学的手法の合理性、生物学的な合理性、そして経済的な合理性を、すべて 100%ではなくとも適切に、バランスをとりながら満たすことが求められる。時代の流れがますます早くなる中においても、忘れられている課題があれ

ば、広い視野を持ってその解決に取り組むことが、今後の科学の発展に必要ではないかと考えられる。

## 6. 全体摘要

BLUP法は牛の遺伝的能力を推定する上で欠かせない手法だが、近年、DNAマイクロアレイの発達によってSNP(一塩基多型)情報が比較的簡単に計測できるようになり、本牛またはその後代から経済形質が測定されるまで、両親の平均でしか得ることができなかった子の遺伝的能力を、ゲノム関係行列を利用したBLUP(GBLUP)法によって、生まれてすぐに、より正確に把握できるようになってきている。様々な国で実用化が進む GBLUP 法について、米国では、雄牛の選抜サイクルを従来の後代検定(娘牛の成績から雄牛の能力を推定)より短縮することで改良上の成果を上げており、娘牛妊娠率といった遺伝率の低い形質で従来法より有効であると報告されている。

近年では GBLUP 法の中でも、表現型値、血統、ゲノム情報といった様々な情報を一括で利用し、1つの混合モデル方程式で計算するシングルステップ GBLUP(ss-GBLUP)法が盛んに研究されている。本研究では、重要性が指摘されながら遺伝率が低いなどの要因によって分析を進めることができなかった牛の経済形質のうち、種雄牛の精液性状と乳用牛の暑熱耐性について、ジョージア大学が公開している BLUPF90 ファミリープログラムを用い、将来の普及が期待される ss-GBLUP 法を活用した分析と検討をおこなった。

### 黒毛和種およびホルスタイン種の精液性状に関する分析

凍結精液による人工授精の普及に伴い、牛の遺伝的改良は雄牛に強い選抜圧をかけることで推進され、乳量の飛躍的増加といったかたちで生産性向上に貢献してきた。しかし、近年では繁殖成績の低下といった課題にも直面している。

娘牛妊娠率は繁殖成績に関係する雌側の遺伝的要因を表したものであるが、繁殖成績には精子活力といった雄側の要因も関係する。しかし、ss-GBLUP 法を用いた分析は未だ行われていない。そこで、日本の主要品種であるホルスタイン種と黒毛和種種雄牛の精液性状について、ss-GBLUP 法を用いて環境要因を含めた包括的分析を実施した。遺伝的パラメータの推定には平均情報行列を用いた制限付き最尤推定法を用いた。

予備分析として、1~3歳および4~6歳の2つの年齢グループ間の遺伝相関を推定したところ、精液量および採取直後の活力において、精子数および凍結融解後活力よりも低い値が推定された。また凍結融解後活力を含めたモデルと含めないモデルを比較したところ、採取直後の活力の推定育種価に、凍結に供する精液の事前選抜による偏りは生じていなかった。こうした結果に加え、今後ゲノム選抜により若齢種雄牛評価値の重要性が増す事情も考慮し、若齢種雄牛の記録

のみを用い、凍結融解後活力を含めたモデルにより分析を進めた。

季節的効果および飼養管理効果に対応する同期グループ効果の変化から、季節的な環境変化に対するホルスタイン種の感受性は黒毛和種よりも大きいと考えられたが、その変化は同期グループ効果全体のばらつきより小さかった。採精直後および凍結融解後活力の同期グループ効果には近年改善傾向がみられ、より良い飼養管理および凍結融解手法によって季節的な影響は緩和可能ではないかと考えられた。

黒毛和種およびホルスタイン種のすべての形質において近交退化がみられたことから、一般に推奨されているように、近交係数の高い候補種雄牛の選定は避けるべきである。精液性状による種雄牛の選定が行われていないが、年あたり改良量はマイナスであった。推定された遺伝率はその他の経済的に重要な形質と同程度であった。

ss-GBLUP 法により、古典的 BLUP 法よりも正確な育種価を推定できたことから、ゲノム情報の利用は、精液性状に関する種雄牛の遺伝的効果を推定するうえでも有用であると考えられた。

#### ホルスタイン種の暑熱耐性に関する分析

世界的な主要品種であるホルスタイン種は産乳能力が極めて高く、寒さに強いが暑さに弱いといわれている。放牧酪農を行うオセアニアや施設整備の難しい途上国では暑さに強い品種との交雑が行われることがあるが、産乳能力は著しく低下してしまうことから、わが国をはじめとした先進国ではファンやフォガーによる対策が主であり遺伝的改良はあまり試みられていない。そうした中で豪州のグループは 2016 年、ゲノム情報を使ったマルチステップゲノミック BLUP 法による研究成果を発表し、同国は暑熱耐性による遺伝的能力評価を開始している。しかし、ss-GBLUP 法を用いた研究は未だ報告されていない。

本研究では暑熱指標として、先行研究で多く用いられている温度湿度指数(THI)をもちいた。この THI は、日本気象協会が発表している不快指数と同じである。農家における THI の計算には、警報注意報発令地域に従ってマッチングした気象官署の気温と湿度を用いた。また暑熱ストレスは、ストレス閾値を超えたときの乳量、乳脂量、乳タンパク量および体細胞数の変化としてとらえ、日本の遺伝的能力全国評価の変量回帰検定日モデルの相加的遺伝効果と恒久的環境効果(PE)に追加した線形回帰効果として、ss-GBLUP 法により分析した。遺伝的パラメータの推定にはギブスサンプリングを用いた。

予備分析として、豪州のグループと同様、検定日を含む4日前までの THI 平均値を暑熱指標と

し、2015年11月までに収集した初産記録のうち、遺伝子型記録を持つ牛を飼養する233牛群の記録を用いて ss-GBLUP 法により遺伝的パラメータを推定したところ、ギブスサンプリングは問題なく収束した。一般的遺伝分散に暑熱耐性の遺伝分散を加えた総合遺伝分散は総合 PE 分散より小さく、相加的遺伝効果以外の様々な個体固有の効果が暑熱耐性に影響していることが示唆された。先行研究と同様、乳量および乳成分量については一般的効果と暑熱耐性の間に負の遺伝相関が推定され、今回得られた暑熱耐性のゲノミック推定育種価(GEBV)を用いて選抜を行った場合、総合的な泌乳形質の改良に負の影響を与えることが示唆された。遺伝的改良には暑熱耐性の GEBV ではなく総合 GEBV を用いるべきであろう。

次に、2017年5月までに収集された初産から3産の記録を使い、日本の先行研究に基づいて、乳量、乳成分量については検定日の2~4日前、SCSについては検定日の1~12日前の平均 THI を暑熱指標とし、R の segmented パッケージを用いた折れ線回帰分析によって産次別にストレス閾値と1THI 当たりの減少量を推定した。産次が進んで乳量や乳成分量が増えるに従い閾値は低くなり、1THI 当たりの生産量の減少も大きくなったことから、高泌乳群における暑熱対策の重要性が裏付けられた。

こうして推定された閾値を用い、2017年5月までに収集された初産から3産の記録を3分割してまず、古典的 BLUP 法により遺伝的パラメータの推定を行った。乳脂量および乳タンパク量については、産次別に暑熱耐性の効果を推定した場合ギブスサンプリングが収束しなかったことから、産次共通の効果としたモデルで推定を行った。古典的 BLUP 法と ss-GBLUP 法で推定された分散を比較したところ、ss-GBLUP 法の一般的遺伝分散および総合遺伝率は古典的 BLUP 法より大きく、ss-GBLUP 法の一般的 PE 分散は古典的 BLUP 法より小さくなった。また産次が進むにつれて、暑熱耐性の分散は大きくなる傾向が見られた。この結果から、ss-GBLUP 法では、古典的 BLUP 法でとらえることができずに PE に含まれていた分散の一部を遺伝分散としてとらえることができたと考えられ、遺伝率が低い形質での ss-GBLUP 法の有用性が確認された。

さらに、2017年5月までに収集された初産から3産の記録を用いて推定した暑熱耐性の PE および GEBV の分布を確認したところ、推定値が正、すなわち THI の増加にともなって乳量および乳成分量が増加する個体が相当存在することが明らかになった。実用化に当たってはこの問題を解決する必要がある。一般のおよび総合遺伝効果による遺伝的趨勢は、日本の乳用牛全国評価と概ね同様であったが、暑熱耐性の遺伝的趨勢は乳タンパク量において若干の改善傾向が見られるものの一定の傾向は見られず、暑熱耐性の考慮により改善を図る余地があると考えられた。

全種雄牛を対象に THI が閾値以下の場合と 80 の場合で上位 100 頭の入替わりを調べたところ、形質と産次によって 14 から 41 頭という、相当程度の順位の入替わりが見られた。この結果から、暑熱耐性の影響を考慮した総合 GEBV による選抜は有効であると考えられる。

## 結論

精液性状の積極的な遺伝的改良は行われていなかったが、検討したすべての形質で負の遺伝的趨勢と、近交係数の上昇による好ましくない効果がみられた。近交係数の高い雄牛の利用をなるべく避けると同時に ss-GBLUP 法による選抜を行うことにより、古典的 BLUP 法よりも効率的に、繁殖成績に関係する精子活力の向上や、負の遺伝的趨勢の緩和を効率的に実現できる可能性がある。

暑熱耐性に関する改良は、西南暖地の日本の酪農家から 20 年以上前から要請されていた課題だが、近年では、地球温暖化が顕在化すると同時に巨大な人口を抱えるアジア地域において牛乳乳製品の需要が増えており、酪農生産の環境への適応に関する問題としてその重要性は以前よりも高まっている。暑熱耐性の効果を含めた遺伝的パラメータの推定に成功し、おおむね、日本の全国評価や先行研究と矛盾のない結果が得られたことから、実用化に向けて検討しなければならない問題は残されているものの、暑熱耐性を考慮した ss-GBLUP 法による遺伝的能力評価は可能であると考えられる。

## 7. 謝辞

本研究を遂行し論文を執筆するにあたり、指導教官である東京大学大学院農学生命科学研究科 生産・環境生物学専攻生物測定学研究室の岩田洋佳准教授からは多くのご指導およびご助言を頂いた。この場を借りて深く感謝の意を表したい。また同研究室の岸野洋久教授および大森宏助教にも研究を進めるにあたりご助言をいただいたことにここで謝意を表す。

本論文の副査を務めていただいた岸野洋久教授、同専攻育種学研究室の井澤毅教授、帯広畜産大学生命・食品科学研究部門家畜生産科学分野の萩谷功一准教授、および東北大学大学院農学研究科資源生物学専攻動物遺伝育種学分野の上本吉伸准教授には有益なご指摘を数多くいただくとともに、特に萩谷准教授には本研究遂行上のアドバイスをいただきながら原著論文の共著者とさせていただいたことに深く感謝する。

本研究は、様々な記録と分析用プログラムの提供およびその利用に関する助言なしに遂行することは不可能であった。まず、牛群検定記録を提供いただくとともに産業ニーズにあった研究遂行にあたってご支援をいただいた(一社)家畜改良事業団の守部公博専務、安森隆則改良部長、相原光夫情報分析センター部長、足達和徳改良部次長はじめ本部の皆様、博士論文取りまとめにあたり得難いアドバイスを頂いた同団家畜改良技術研究所の富樫研治所長、種雄牛の精液性状に関する記録と黒毛和種の血統およびゲノム情報をご提供いただき、その整理に当たって数々の疑問に的確にご回答いただいた絹川将史博士はじめ同研究所の皆様、ホルスタイン種の血統情報とゲノム情報を提供いただいた(一社)日本ホルスタイン登録協会の栗田純専務理事、渥美正総務部長、小山田雅樹主任、分析上のアドバイスいただいた同協会北海道支局の河原孝吉博士、馬場俊見博士はじめ協会の皆様、そして、研究遂行上のアドバイスをいただいた(独)家畜改良センターの佐藤英明前理事長、本研究を進めるにあたりデータ整理と分析用プログラムの提供でご支援いただいた同センターの大澤剛史博士をはじめ情報分析課の皆様に、この場を借りて謝意を表したい。また、分析用プログラムの利用と、最新の研究についての得難いアドバイスをいただいた、ジョージア大学動物育種遺伝グループの鶴田彰吾博士および増田豊博士、二十年前のカナダ留学時の師であり、十年以上のブランクを埋めるにあたり数々の教材を提供いただいた、ゲルフ大学の Larry R Shaeffer 名誉教授、博士論文取りまとめにあたりアドバイスを頂いたバージニア工科大学の師田郷太助教授に感謝申し上げたい。

本研究はそのきっかけもまた、ユニークなものであった。家畜の統計遺伝学を研究する研究室が限られる中、人事院の行政官国内研究員制度によって生産・環境生物学専攻の博士後期課

程社会人特別選抜第一号となるにあたっては、(一社)家畜改良事業団の松本成生氏、風間辰也元電算センター部長に糸口を作っていただき、また、大学で再び研究するにあたっては、学部卒業時に在籍した東京大学大学院農学生命科学研究科獣医学専攻獣医解剖学教室の金井克晃准教授、九郎丸正道前教授はじめ同教室の皆様に精神的な支えと、研究対象となった精液性状と深く関係する精子発生についてのアドバイスをいただいた。この場を借りて感謝申し上げたい。

最後に、社会人課程博士としての研究活動を支援していただいた生物測定学研究室の鐘ヶ江弘美特任助教、佐々木三枝子事務員はじめ、人生半世紀近くを過ぎて大学での生活を再開した人間を温かく迎え入れてくれた生物測定学研究室の皆様、そして何より、社会人を経て同研究室に所属して博士号を取得した先人であり、本研究の遂行にあたり全面的な支援をいただいた、農業・食品産業技術総合研究機構次世代作物開発研究センターの小野木章雄主任研究員に感謝を申し上げる次第である。



## 8. 参考文献

Aguilar, I., I. Misztal, D. L. Johnson, A. Legarra, S. Tsuruta, and T. J. Lawlor. 2010(a). Hot topic: A unified approach to utilize phenotypic, full pedigree, and genomic information for genetic evaluation of Holstein final score. *J. Dairy Sci.* 93: 743–752.

Aguilar, I., I. Misztal, and S. Tsuruta. 2010(b). Short communication: Genetic trends of milk yield under heat stress for US Holsteins. *J. Dairy Sci.* 93: 1754–1758.

Aguilar, I., I. Misztal, A. Legarra, and S. Tsuruta. 2011. Efficient computation of the genomic relationship matrix and other matrices used in single-step evaluation. *J. Anim. Breed. Genet.* 128: 422–428.

Aguilar, I., I. Misztal, and S. Tsuruta. 2009. Genetic components of heat stress for dairy cattle with multiple lactations. *J. Dairy Sci.* 92: 5702–5711.

Armstrong, D.V. 1994. Heat stress interaction with shade and cooling. *J. Dairy Sci.* 77: 2044–2050.

Bainbridge, M.L., L.M. Cersosimo, A-D.G. Wright, and J. Kraft. 2016. Content and composition of branched-chain fatty acids in bovine milk are affected by lactation stage and breed of dairy cows. *PLoS One.* 2016 Mar 1; 11(3): e0150386.

Barrett, R., M. Berry, T. F. Chan, J. Demmel, J. M. Donato, J. Dongarra, V. Eijkhout, R. Pozo, C. Romine, and H. Van der Vorst. 1994. *Templates for the solution of linear systems: Building blocks for iterative methods.* Soc. Industrial Appl. Math. (SIAM) Philadelphia, PA.

Bearden H. J. and J. W. Fuquay. 2004 *Applied animal reproduction*, 6<sup>th</sup> ed. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ.

- Bernabucci, U., S. Biffani, L. Buggiotti, A. Vitali, N. Lacetera, and A. Nardone. 2014. The effects of heat stress in Italian Holstein dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 97: 471–486.
- Boonkum, W. I. Misztal, M. Duangjinda, V. Pattarajinda, S. Tumwasorn, and J. Sanpote. 2011. Genetic effects of heat stress on milk yield of Thai Holstein crossbreds. *J. Dairy Sci.* 94: 487–492.
- Bohmanova, J. I. Misztal, S. Tsuruta, H.D. Norman, and T.J. Lawlor. 2008. Short communication: Genotype by environment interaction due to heat stress. *J. Dairy Sci.* 91: 840–846.
- Boichard, D., V. Ducrocq, P. Croiseau, S. Fritz. 2016. Genomic selection in domestic animals: principles, applications and perspectives. *C. R. Biologies* 339: 274–277.
- Bouraoui, R., M. Lahmar, A. Majdoub, M’N. Djemali, and R. Belyea. 2002. The relationship of temperature-humidity index with milk production of dairy cows in a Mediterranean climate. *Anim. Res.* 51: 479–491.
- Browning, B. L., and S. R. Browning. 2009. A unified approach to genotype imputation and haplotype-phase inference for large data sets of trios and unrelated individuals. *Am. J. Hum. Genet.* 84: 210–223.
- Brügemann, K., E. Gernand, U.K. von Borstel and S. König. 2011. Genetic analyses of protein yield in dairy cows applying random regression models with time-dependent and temperature  $\times$  humidity-dependent covariates. *J. Dairy Sci.* 94: 4129–4139.
- Carabaño, M.J., K. Bachagha, M. Ramón, and C. Díaz. 2014. Modeling heat stress effect on Holstein cows under hot and dry conditions: Selection tools. *J. Dairy Sci.* 97: 7889–7904.

Carabaño, M.J., B. Logar, J. Bormann, J. Minet, M.L. Vanrobays, C. Díaz, B. Tychon, N. Gengler, and H. Hammami. 2016. Modeling heat stress under different environmental conditions. *J. Dairy Sci.* 99: 3798–3814.

Carabaño, M.J., M. Ramón, C. Díaz, A. Molina, M.D. Pérez-Guzmán, and J.M. Serradilla. 2017. Breeding for resilience to heat stress effects in dairy ruminants. A comprehensive review. *J. Anim. Sci.* 95: 1813–1826.

Coster, A. 2015. Package 'pedigree'. Downloaded from <https://cran.r-project.org/web/packages/pedigree/pedigree.pdf> on September 9, 2016.

Daetwyler, H.D., B. Villanueva, P. Bijma and J.A. Woolliams. 2007. Inbreeding in genome-wide selection. *J. Anim. Breed. Genet.* 124: 369-376.

Deb, R., B. Sajjanar, U. Singh, S. Kumar, M.P. Brahmane, R. Singh, G. Sengar, and A. Sharma. 2013. Promoter variants at AP2 box region of Hsp70.1 affect thermal stress response and milk production traits in Frieswal cross bred cattle. *Gene* 532: 230–235.

Dekkers, J.C.M. 2004. Commercial application of marker- and gene-assisted selection in livestock: Strategies and lessons. *J. Anim. Sci.* 82: 313-328.

Dikmen, S., J.B. Cole, D.J. Null, and P.J. Hansen. 2013. Genomewide association mapping for identification of quantitative trait loci for rectal temperature during heat stress in Holstein cattle. *PLoS One* 8:e69202.

Dikmen, S.S., X.-z. Wang, M.S. Ortega, J.B. Cole, D.J. Null, and P.J. Hansen. 2015. Single nucleotide polymorphisms associated with thermoregulation in lactating dairy cows exposed to heat stress. *J. Anim. Breed. Genet.* 132: 409–419.

Everett, R. W., B. Bean and R.H. Foote. 1978. Source of Variation of semen output. *J. Dairy Sci.* 61: 90–95.

García-Ruiza, A., J. B. Cole, P. M. VanRaden, G. R. Wiggans, F. J. Ruiz-López, and C. P. Van Tassell. 2016. Changes in genetic selection differentials and generation intervals in US Holstein dairy cattle as a result of genomic selection. *PNAS* 113: E3995–E4004.

Hammami, H., J. Bormann, N. M'hamdi, H. H. Montaldo, and N. Gengler. 2013. Evaluation of heat stress effects on production traits and somatic cell score of Holsteins in a temperate environment. *J. Dairy Sci.* 96: 1844–1855.

Hammami, H., J. Vandenplas, M.-L. Vanrobays, B. Rekik, C. Bastin, and N. Gengler. 2015. Genetic analysis of heat stress effects on yield traits, udder health, and fatty acids of Walloon Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 98: 4956–4968.

Hagiya, K., I. Bamba, T. Osawa, Y. Atagi, and T. Yamazaki. Length of lags in responses of milk yield and somatic cell score on test day to heat stress in Holsteins. *Anim. Sci. J.* (accepted).

Hayes, B.J., P.J. Bowman, A. J. Chamberlain, K. Savin, C.P. van Tassell, T.S. Sonstegard, and M. E. Goddard. 2009. A validated genome wide association study to breed cattle adapted to an environment altered by climate change. *PLoS ONE* 4(8):e6676.

Hayes, B.J., M. Carrick, P. Bowman, M.E. Goddard. 2003. Genotype  $\times$  environment interaction for milk production of daughters of Australian dairy sires from test-day record. *J. Dairy Sci.* 86: 3736–3744.

Henderson, C.R. 1953 Estimation of variance and covariance components. *Biometrics* 9:

226–252.

Henderson, C.R. 1976. A simple method for computing the inverse of a numerator relationship matrix used in prediction of breeding values. *Biometrics* 32: 69–83.

Herbut, P. and S. Angrecka 2012. Forming of temperature-humidity index (THI) and milk production of cows in the free-stall barn during the period of summer heat. *Anim. Sci. Papers and Rep.* 30: 363–372.

Hickey, J.M., T. Chiurugwi, I. Mackay, W. Powell and Implementing Genomic Selection in CGIAR Breeding Programs Workshop Participants. 2017. Genomic prediction unifies animal and plant breeding programs to form platforms for biological discovery. *Nature Genetics* 49: 1297–1303.

Howard, J.T., S.D. Kachman, W.M. Snelling, E.J. Pollak, D.C. Ciobanu, L.A. Kuehn, and M.L. Spangler. 2014. Beef cattle body temperature during climatic stress: A genomewide association study. *Int. J. Biometeorol.* 58:1665–1672.

Inoue, K., M. Kobayashi, N. Shoji, and K. Kato. 2011. Genetic parameters for fatty acid composition and feed efficiency traits in Japanese Black cattle. *Animal* 5: 987–994.

IPPC 2014. *Climate Change 2014: Synthesis Report of the IPCC Fifth Assessment Report (AR5)*

Jamrozik, J. and L.R. Schaeffer. 1997. Estimation of genetic parameters for a test day model with random regressions for yield traits of first lactation holsteins. *J. Dairy Sci.* 80: 762–770.

Jensen, J., E.A. Mäntysaari, P. Madsen, and R. Thompson. 1997. Residual maximum likelihood estimation of (Co)variance components in multivariate mixed linear models using

average information. *J. Ind. Soc. Agri. Stat.* 49: 215–236.

Karoui, S., C. Diaz, M. Serrano, R. Cue, I. Celorrio, and M. J. Carabaño. 2011. Time trends, environmental factors and genetic basis of semen traits collected in Holstein bulls under commercial conditions. *Anim. Reprod. Sci.* 124: 28–38.

Kawahara, T., Y. Gotoh, K. Hagiya, M. Suzuki, and M. Sogabe. 2002. Calculation of inbreeding coefficients using incomplete pedigrees and its influence on inbreeding depression and breeding value for milk production in Hokkaido Holstein populations of Japan (In Jpn.). *Nihon Chikusan Gakkaiho* 73: 249–259.

Kawakami, J., T. Hanamura, K. Hagiya, H. Hayakawa, T. Baba, and M. Suzuki. 2016. Estimates of heritability and repeatability of semen characteristics in Holstein bulls (in Jpn). *Nihon Chikusan Gakkaiho* 87: 101–106.

Lambertz, C., C. Sanker and M. Gauly. 2014. Climatic effects on milk production traits and somatic cell score in lactating Holstein-Friesian cows in different housing systems. *J. Dairy Sci.* 97: 319–329.

Lande, R. and R. Thompson. 1990. Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits. *Genetics.* 124: 743–756.

Legarra, A., I. Aguilar and I. Misztal. 2009. A relationship matrix including full pedigree and genomic information. *J. Dairy Sci.* 92: 4656–4663.

Legarra, A. and V. Ducrocq. 2012. Computational strategies for national integration of phenotypic, genomic, and pedigree data in a single-step best linear unbiased prediction. *J. Dairy Sci.* 95: 4629–4645.

Legarra, A., O.F. Christensen, I. Aguilar and I. Misztal. 2014. Single step, a general approach for genomic selection. *Livest. Sci.* 166: 54–65.

Lidauer, M.H., P. Madsen, K. Matilainen, E.A. Mäntysaari, I. Strandén, R. Thompson, J. Pösö, J. Pedersen, U.S. Nielsen, J-Å. Eriksson, K. Johansson and G.P. Aamand. 2009. Estimation of variance components for Nordic red cattle test-day model: Bayesian Gibbs sampler vs. Monte Carlo EM REML. *Interbull Bulletin* 40: 37–41.

Liu, Z., V. Ezernieks, J. Wang, N.W. Arachchillage, J.B. Garner, W.J. Wales, B.G. Cocks and S. Rochfort. 2017. Heat stress in dairy cattle alters lipid composition of milk. *Sci. Rep.* 7: 961.

Liu, Z., P.M. VanRaden, M.H. Lidauer, M.P. Calus, H. Benhajali, H. Jorjani and V. Ducrocq. 2017. Approximating genomic reliabilities for national genomic evaluation. *Interbull Bulletin* 51: 75–85.

Lucy, M. C. 2001. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: Where will it end? *J. Dairy Sci.* 84: 1277–1293.

Mariasegaram, M., C.C. Chase Jr, J.X. Chaparro, T.A. Olson, R.A. Brenneman and R.P. Niedz. 2007. The *slick* hair coat locus maps to chromosome 20 in Senepol-derived cattle. *Animal Genetics* 38: 54–59.

Martini, J.W.R., M.F. Matias, C.A. Garcia-Baccino, E.C.G. Pimentel, S. Munilla, A. Rogberg-Munoz, R.J.C. Cantet, C. Reimer, N. Gao, V. Wimmer and H. Simianer. 2018. The effect of the  $\mathbf{H}^{-1}$  scaling factors  $\tau$  and  $\omega$  on the structure of  $\mathbf{H}$  in the single-step procedure. *Genet. Sel. Evol.* 50: 16–24.

Mathevon, M., M. M. Buhr, and J. C. M. Dekkers. 1998. Environmental, management, and genetic factors affecting semen production in Holstein bulls. *J. Dairy Sci.* 81: 3321–3330.

Maximini L., B. Fuerst-Waltl, B. Gendler, and R. Baumung. 2011. Inbreeding depression on semen quality in Austrian dual-purpose Simmental bulls. *Reprod. Dom. Anim.* 46: 102–104.

Meyer, K. and R. Thompson. 1984. Bias in variance and covariance component estimators due to selection on a correlated traits. *Z. Tierz. Zuechtungsbiol.* 101 : 33–50.

Meyer, K. B. Tier and A. Swan. 2018. Estimates of genetic trend for single-step genomic evaluations. *Genet. Sel. Evol.* 50: 39–49.

Misztal, I. 1999. Model to study genetic component of heat stress in dairy cattle using national data. *J. Dairy Sci.* 82 (Suppl.1): 32.

Misztal, I., S.E. Aggrey and W.M. Muir. 2013. Experiences with a single-step genome evaluation. *Poultry Sci.* 92: 2530–2534.

Misztal, I., I. Aguilar, A. Legarra and T.J. Lawlor. 2010. Choice of parameters for single-step genomic evaluation for type. *J. Dairy Sci.* 93 (Suppl. 1): 166.

Misztal, I., J. Bohmanova, M. Freitas, S. Tsuruta, H.D. Norman, and T.J. Lawlor. 2006. Issues in genetic evaluation of dairy cattle for heat tolerance. *Proc. 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, August 13-18, 2006, Belo Horizonte, MG, Brasil.*

Misztal, I., H.L. Bradford, D.A.L. Lourenco, S. Tsuruta, Y. Masuda, A. Legarra and T.J. Lawlor. 2017. Studies on inflation of GEBV in single-step GBLUP for type. *Interbull Bulletin.* 51: 38–42.

Misztal, I., S. Tsuruta, I. Aguilar, A. Legarra, P.M. VanRaden and T.J. Lawlor. 2013. Methods to approximate reliabilities in single-step genomic evaluation. *J. Dairy Sci.* 96: 647–



654.

Misztal, I., S. Tsuruta, T. Strabel, B. Auvray, T. Druet, and D.H. Lee. 2002. BLUPF90 and related programs (BGF90) Proc. 7<sup>th</sup> World Congr. Genet. Appl. Livesto. Prod.

Misztal, I., S. Tsuruta, D. Lourenco, Y. Masuda. 2018. Manual for BLUPF90 family of programs. Downloaded from [http://nce.ads.uga.edu/wiki/lib/exe/fetch.php?media=blupf90\\_all7.pdf](http://nce.ads.uga.edu/wiki/lib/exe/fetch.php?media=blupf90_all7.pdf) on December 7, 2018.

Muggeo, V.M.R. 2008. Segmented: An R package to fit regression models with broken-line relationships. R News 8/1, 20–25. Viewed on 12 January 2018 from <http://cran.r-project.org/doc/Rnews/>.

Nguyen, T.T.T., P.J. Bowman, M. Haile-Mariam, J.E. Pryce, and B.J. Hayes. 2016. Genomic selection for tolerance to heat stress in Australian dairy cattle. J. Dairy Sci. 99: 2849–2862.

Nguyen, T.T.T., P.J. Bowman, M. Haile-Mariam, G.J. Nieuwhof, B.J. Hayes and J.E. Pryce. 2017. Short communication: Implementation of a breeding value for heat tolerance in Australian dairy cattle. J. Dairy Sci. 100: 1–6.

Nickerson, D.M., D.E. Facey and G.D. Grossman. 1989. Estimating physiological thresholds with continuous two-phase regression. Physiol. zool. 62: 866–887.

Nishimura, K., T. Honda, and K Oyama. 2010. Genetic variability of semen characteristics in Japanese Black bulls. Anim. Genet. 38: 73–76.

Nogi, T., T. Honda, F. Mukai, T. Okagaki, and K. Oyama. 2011. Heritabilities and genetic correlations of fatty acid compositions in longissimus muscle lipid with carcass traits in Japanese Black cattle. J. Anim. Sci. 89:615–621.

Nomura, T., T. Honda, and F. Mukai. 2001. Inbreeding and effective population size of Japanese Black cattle. *J. Anim. Sci.* 79: 366–370.

NRC. 1971. A guide to environmental research on animals. Natl. Acad. Sci. Washington D.C.

Onogi, A., A. Ogino, T. Komatsu, N. Shoji, K. Shimizu, K. Kurogi, T. Yasumori, K. Togashi, and H. Iwata 2014. Genomic prediction in Japanese Black cattle: Application of a single-step approach to beef cattle. *J. Anim. Sci.* 92: 1931–1938.

Paldusova, M., T. Kopec, M. Hosek, and L. Machal 2015. The effect of inbreeding depression on semen production in the Czech Fleckvieh bulls. *Mendelnet 2015*: 147–151.

Pereira J. A. C., M. Suzuki, K. Hagiya, T. Yoshizawa, S. Tsuruta, and I Misztal. 2001. Method R Estimates of Heritability and Repeatability for Milk, Fat and Protein Yields of Japanese Holstein. *Anim. Sci. J.* 72: 372–377.

Quaas, R.L. 1976. Computing the Diagonal Elements and Inverse of a Large Numerator Relationship Matrix. *Biometrics* 32: 949–953.

Ravagnolo, O. and I. Misztal. 2000. Genetic component of heat stress in dairy cattle, parameter estimation. *J. Dairy Sci.* 83: 2126–2130.

Rozzi, P. and L.R. Schaeffer. 1996. New deregression procedures used on type traits. A paper presented at the INTERBULL workshop, November 25–26, 1996, Verden, Germany.

Sánchez, J.P., I. Misztal, I. Aguilar, B. Zumbach, and R. Rekaya. 2009. Genetic determination of the onset of heat stress on daily milk production in the US Holstein cattle. *J. Dairy Sci.* 92: 4035–4045.

Santana, M.L., A.B. Bignardi, R.J. Pereira, G. Stefani, L. El Faro. 2016. Genetics of heat tolerance for milk yield and quality in Holsteins. *Animal* 11: 4–14.

Schaeffer, L.R. 1987. Estimation of variance components under a selection model. *J. Dairy Sci.* 70: 661–671.

Searle, S. 1991. C.R. Henderson, the statistician; and his contributions to variance components estimation. *J. Dairy Sci.* 74: 4035–4044.

Sellem, E., M.L.W.J. Broekhuijse, L. Chevrier, S. Camugli, E. Schmitt, L. Schibler, and E.P.C. Koenen. 2015. Use of combinations of in vitro quality assessments to predict fertility of bovine semen. *Theriogenology* 84: 1447–1454.

Smith, B. A., J. S. Brinks, and G. V. Richardson. 1989. Relationships of sire scrotal circumference to offspring and growth. *J. Anim. Sci.* 67: 2881–2885.

Snoj, T., S. Kobal, and G. Majdic. 2013. Effects of season, age, and breed on semen characteristics in different *Bos Taurus* breeds in a 31-year retrospective study *Theriogenology* 79: 847–852.

Sorensen, D.A. and B.W. Kennedy. 1984. Estimation of genetic variances from unselected and selected populations. *J. Anim. Sci.* 59: 1213–1223.

Strandén, I. and O.F. Christensen. 2011. Allele coding in genomic evaluation. *Genet. Sel. Evol* 43: 25–35.

Strandén, I. and M. Lidauer. 1999. Solving large mixed linear models using preconditioned conjugate gradient iteration. *J. Dairy Sci.* 82:2779–2787.

Suzuki, M. and L. D. Van Vleck. 1994. Heritability and repeatability for milk production traits of Japanese Holsteins from an animal model. *J. Dairy Sci.* 77: 583–588.

Takeda K., K. Uchiyama, M. Kinukawa, T. Tagami, M. Kaneda and S. Watanabe. 2015. Evaluation of sperm DNA damage in bulls by TUNEL assay as a parameter of semen quality. *J. Reprod. Dev.* 61: 185–190.

Thom, E.C. 1959. The discomfort index. *Weatherwise* 12: 57-61.

Tian, H., N. Zheng, W. Wang, J. Cheng, S. Li, Y. Zhang, and J. Wang. 2016. Integrated metabolomics study of the milk of heatstressed lactating dairy cows. *Sci. Rep.* 6:24208.

Togashi K., K. Moribe, S. Iwama, S. Matsumoto, S. Yamaguchi, K. Adachi, T. Takahashi, S. Saito, T. Nobukuni, T. Yamazaki, and T. Ikeda. 2016. Genotype-by-environment interaction on genetic relationships between lactation persistency and conception measures in Japanese Holstein cows. *Livest. Sci.* 183: 40–47.

Tsuruta S., I. Misztal and I. Strandén. 2001. Use of the preconditioned conjugate gradient algorithm as a generic solver for mixed-model equations in animal breeding applications. *J. Anim. Sci.* 79: 1166–1172.

VanRaden, P. M. 2008. Efficient methods to compute genomic predictions. *J. Dairy Sci.* 91: 4414–4423.

VanRaden, P. M. and R. Wiggans 1991. Derivation, calculation, and use of national animal model information. *J. Dairy Sci.* 74: 2737–2746.

Wang, H. and I. Misztal 2011. Comparisons of numerator and genomic relationship matrices.

J. Anim. Sci. 89(E-Suppl. 1): 163.

West, J.W. 2003. Effects of heat-stress on production in dairy cattle. J. Dairy Sci. 86: 2131–2144.

West, J.W., B.G. Mullinix, and J.K. Bernard 2003. Effects of hot, humid weather on milk temperature, dry matter intake, and milk yield of lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 86: 232–242.

Wiggans, G.R., T.A. Cooper, P.M. VanRaden and J.B. Cole. 2011. Technical note: Adjustment of traditional cow evaluations to improve accuracy of genomic predictions. J. Dairy. Sci. 94: 6188–6193.

Williams J.L. 2005. The use of marker-assisted selection in animal breeding and biotechnology. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 24: 379–391.

Wilmink, J.B.M. 1987. Adjustment of test-day milk, fat and protein yield for age, season and stage of lactation. Livest. Prod. Sci. 16: 335–348.

Yousef, M.K. 1985. Stress physiology in livestock. CRC Press. Boca Raton. FL.

家畜改良センター. 2017. 乳用牛評価報告 第 37 号

[http://www.nlbc.go.jp/kachikukairyo/iden/nyuyogyu/aohon/evreport\\_37.pdf](http://www.nlbc.go.jp/kachikukairyo/iden/nyuyogyu/aohon/evreport_37.pdf)

2018 年 12 月 7 日閲覧

全国和牛登録協会. 2018. 全国和牛登録協会について

[http://cgi3.zwtk.or.jp/?page\\_id=1244](http://cgi3.zwtk.or.jp/?page_id=1244) 2018 年 12 月 7 日閲覧

畜産技術協会. 2004. 牛の人工授精マニュアル

[http://jlta.lin.gr.jp/report/detail\\_oversea\\_pdf/kaigai\\_m034.pdf](http://jlta.lin.gr.jp/report/detail_oversea_pdf/kaigai_m034.pdf) 2018年12月7日閲覧

乳用牛群検定全国協議会. 2017. 暑熱対策や寒冷対策に気象情報を利用しよう 酪農用の地域別気象情報(カウダス)を公開しました

[http://liaj.lin.gr.jp/japanese/heikin\\_cowdas/amedas.pdf](http://liaj.lin.gr.jp/japanese/heikin_cowdas/amedas.pdf) 2018年12月7日閲覧

日本ホルスタイン登録協会. 2018. 登録団体の変遷 <http://hcaj.lin.gr.jp/01/1-2.pdf>  
2018年12月7日閲覧

農林水産省. 2018. バター不足に関するQ&A

[http://www.maff.go.jp/j/chikusan/gyunyu/attach/pdf/antei\\_kyokyu-44.pdf](http://www.maff.go.jp/j/chikusan/gyunyu/attach/pdf/antei_kyokyu-44.pdf)

2018年12月7日閲覧