

黒毛和種の不良形質に関する
遺伝育種学的研究

A genetic study on defective characteristics
in Japanese Black cattle

小山 秀美

2020

目次

用語一覧.....	1
要約	
要旨（日本語）	3
要旨（英語）	6
第1章 緒論.....	9
第2章 鹿児島県産黒毛和種で発生する損徴に関する遺伝的 パラメータの推定	
1. 緒言.....	17
2. 材料及び方法	
2-1. 供試材料	22
2-2. データの定義.....	23
2-3. データの編集.....	26
2-4. 分析方法	28
3. 結果及び考察	
3-1. 分散成分推定値	32
3-2. 各効果の推定値	35
3-3. 遺伝的趨勢.....	41
3-4. 損徴間の関連性	43
4. 小括.....	45

第3章 鹿児島県産黒毛和種で発生する白斑と枝肉形質の 関連性の調査

1. 緒言.....	47
2. 材料及び方法	
2-1. 供試材料	48
2-2. データの編集.....	49
2-3. 分析方法	55
3. 結果及び考察	
3-1. 分散成分推定値	57
3-2. 白斑と枝肉形質間の遺伝的趨勢.....	60
3-3. 白斑と枝肉形質間の関連性.....	63
4. 小括.....	67

第4章 黒毛和種で発生する白斑における分子遺伝学的研究

1. 緒言.....	69
2. 材料及び方法	
2-1. 供試試料	72
2-2. ゲノム DNA 抽出方法	
2-2-1. 牛肉サンプル	73
2-2-2. 鼻腔粘膜サンプル	73
2-3. ダイレクトシーケンス法.....	74
2-4. 対立遺伝子特異的 PCR 法 (AS PCR)	75
2-5. SNP チップを用いたジェノタイピング	76
2-6. クオリティーコントロール.....	76

2-7. 統計解析	77
3. 結果及び考察	
3-1.ダイレクトシーケンス法による <i>MITF</i> 遺伝子の変異の確認	78
3-2. AS PCR による <i>MITF</i> 遺伝子の変異の確認.....	79
3-3. 黒毛和種集団の遺伝子型の確認	80
3-4. GWAS による候補 SNP の探索	82
4. 小括.....	84
第5章 鹿児島県産黒毛和種で発生する死産に関する 遺伝的パラメータの推定	
1. 緒言.....	86
2. 材料及び方法	
2-1. 供試材料	89
2-2. データの編集.....	90
2-3. 分析方法	92
3. 結果及び考察	
3-1. 分析形質の概要	96
3-2. 分散（共分散）成分推定値.....	97
3-3. 各効果における推定値	100
3-4. 遺伝的趨勢.....	108
4. 小括.....	109
第6章 総括.....	112

謝辭..... 116

參考文獻..... 117

用語一覧

相加的遺伝分散	遺伝分散のうち、相加的な遺伝分散。
直接遺伝分散	父親から伝えられる相加的遺伝分散。
母性遺伝分散	母親から伝えられる相加的遺伝分散。
表型分散	遺伝分散と環境分散を足し合わせた分散。
永続的母性環境効果	母親の哺育能力などの環境効果及び相加的でない遺伝（卵細胞からのミトコンドリアや細胞質の遺伝）分散。
遺伝率	表型分散に対する遺伝分散の割合。
近交係数	近交度の度合いを示す数値
集団の有効サイズ	ある集団における、次世代への寄与のバラツキの大きさを示すもの。小さいほど近交度が進む。
95%最高事後密度区間 (HPD)	95%の確率で、事後確率が存在する区間。
閾値形質	ある一定のレベル（閾値）を超えると発生する形質。
遺伝ベース年	能力を偏差で表現する場合に用いる基準 (0) となる地点 (年) 。
EBV (推定育種価)	ある形質を遺伝的に発生する可能性（遺伝的能力）を示す数値。
%BV	EBV を確率で表したもの。閾値形質の EBV を示す場合に有効。
SBV (標準化育種価)	EBV を標準化したもの。単位やスケールの異なる形質を同時に比較する場合に有効。

遺伝的趨勢	ある集団の遺伝的なレベルの変化傾向を示すもの。
表型相関	形質 A と形質 B の見かけ上の相関。
遺伝相関	形質 A と形質 B の相関のうち、遺伝的な要因による相関。
一塩基多型 (SNP)	個体間においてゲノム DNA 上で 1 塩基が異なること。
ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR 反応)	ゲノム DNA の特定の領域を短時間で増幅させる方法。
対立遺伝子特異的 PCR 法 (ASPCR 法)	対立遺伝子特異的なプライマーを用いて、PCR 反応を行い、変異の有無を判定する方法。
ダイレクトシーケンス法	PCR 反応後に、直接鋳型として塩基配列を決定する方法。
ゲノムワイド関連解析	高密度の SNP 情報を用いて、量的形質と関連する SNP を網羅的に探索する方法。

要旨

黒毛和種は、脂肪交雑など肉質が非常に優れているという特徴を持つ日本固有の肉用種であるが、近年、黒毛和種における改良は、経済形質をさらに向上させると同時に、遺伝的不良形質を除外することも重要であるとされている。不良形質には、外貌上に関するもの、繁殖性に関するもの、枝肉に関するもの及び遺伝性疾患などがあり、これらが発生すると経済的な損失を被る場合がある。このうち、外貌上の不良形質である損徴（白斑、舌の異常及び乳頭の異常）については、黒毛和種でデータが蓄積されており、遺伝的な関与が示唆されているが、それを調べた報告はない。また、繁殖性における不良形質である死産は、発生率の報告がいくつかあるが、遺伝的な関与を示した報告は1つである（前田ら、2015）。そこで本研究では、黒毛和種で発生する遺伝的不良形質に関する知見を得ることを目的として、遺伝的不良形質の中でも損徴と死産について着目し、いくつかの遺伝育種学的な調査を行った。

まず、黒毛和種の損徴に関わる遺伝的要因の程度を明らかにすることを目的として、鹿児島県産黒毛和種の雌子牛の損徴（白斑、舌の異常及び乳頭の異常）データを用いて、遺伝的パラメータを推定した。なお、本研究で扱った損徴データは失格に至らなかった損徴もすべて含まれたものを供した。その結果、遺伝率は0.29（舌の異常）～0.76（白斑）と推定され、高い遺伝的要因の関与が示された。また、各損徴の特徴について、白斑は遺伝的な影響が大きく、舌の異常は遺伝と繁殖農家の両方が影響し、乳頭の異常は遺伝的な発生のしやすさに雌雄差が見られた。各損徴の遺伝的趨勢は、全てにおいて上昇傾向にあり、損徴間の相関では、白斑と舌の異常の間には有意な正の遺伝・表型相関が見られたことから、両者の関連性が示された。以上より、黒毛和種の損徴は遺伝的な改良が可能であることが示された。次に損徴の淘汰による経済形質への影響を評価するために、

白斑と枝肉形質（枝肉重量、ロース芯面積、バラの厚さ、皮下脂肪の厚さ及びBMS No）との関連性を調査した。その結果、白斑と枝肉形質の間の遺伝・表型相関は、全ての組み合わせで無相関と推定されたため、白斑の淘汰は枝肉形質に影響を与えないことが確認できた。さらに、西欧品種で白斑の有無と関連があると報告された *MITF* 遺伝子の変異 (g.32386957 A>T) が黒毛和種でも存在することを確認した上で白斑の有無との関連性を検討し、全染色体において、網羅的に遺伝子多型を解析することのできるゲノムワイド関連解析 (GWAS) によって白斑発生に関わる候補 SNP を探索した。その結果、*MITF* 遺伝子の変異 (g.32386957 A>T) が確認され、白斑群と正常群の遺伝子型構成に高度な有意差 ($p = 1.53 \times 10^{-6}$) があったことから、当該変異が黒毛和種の白斑の有無にも強く関連することを示した。しかし、一部で例外が確認されたことから、当該変異だけでは白斑発生の全てを説明できないことも示唆された。さらに、白斑について GWAS によって候補遺伝子を探索したが、白斑発生に関与する候補 SNP は得られなかった。

次に、黒毛和種で発生する死産についての遺伝的な知見を得るために、遺伝的パラメータを推定した。その結果、死産率は 1.8% (2010 年度) ~2.2% (2011 年度) であり、推定された死産の直接遺伝率及び母性遺伝率は、それぞれ $3.1\% \pm 1.0\%$ 及び $3.3\% \pm 1.6\%$ であり、遺伝的な要因が関連しているものの、その影響は小さいことが示唆された。また、死産は母体内などの環境や飼養環境についても死産発生の要因であること、種雄牛において遺伝的な発生のしやすさに差があることが確認された。さらに冬期の分娩時や、出生時母牛年齢は母牛が若齢または高齢なほど、雌子牛よりも体格の大きい雄子牛で、死産になりやすいことが示された。また、種雄牛及び母方祖父における死産の遺伝的趨勢は、年々上昇傾向であったことから経済形質との間に遺伝的な関連性がある可能性が示唆された。以上より、黒毛和種で発生する損徴と死産に関する知見を得ることができた。損

徴については遺伝的な影響が大きかったことから、種雄牛の育種価を用いることで掛け合わせによって発生を低減できる可能性がある。死産については、冬期や初産または高齢な母牛における分娩では、特に手厚い分娩介助を行うことで死産の低減が期待された。

以上の結果より、黒毛和種で発生する遺伝的不良形質である損徴と死産について、遺伝的改良の可能性を示すことができた。

A genetic study on defective characteristics in Japanese Black cattle

Hidemi Oyama

Japanese Black cattle is one of the Japanese original breeds “Wagyu” and the most popular beef cattle in Japan. However, recently, the defective characteristics have become a problem by reason of leading to economic losses of farmers, and it is important to investigate the defective characteristics to get the genetic insight. In this study, we focused on defective appearance and stillbirth in Japanese Black cattle.

Defective appearances, including white spotting (WS), tongue defect (TD), and nipple defect (ND) was reported that the annual incidences of these defects were increasing, and the incidence of heifer calves was significantly different between normal and defective dams in WS and TD ($p < 0.01$). This finding suggests that the genetic factor may strongly influence the incidence of appearance defects in Japanese Black cattle. Therefore, we estimated genetic parameters of defective appearances of Japanese Black heifer calves housed in the Kagoshima Prefecture. Variance and covariance were estimated using the Gibbs sampling algorithm. The estimated heritability ranged from 0.29 for TD to 0.76 for WS. Percent breeding value (%BV) estimates indicated high variation in WS and ND among sires, reflecting higher heritability. Furthermore, there was a positive linear relationship between the %BV estimate of a sire and the mean incidence rate of each defect in his female offsprings. TD was positively associated with other defects. Therefore, genetic factors strongly affect the incidence of defective appearances in Japanese Black cattle. Moreover, we investigated a relationship between WS and carcass traits. As a result,

phenotypic and genetic correlations between WS and carcass traits were non-correlated, suggesting non-relatedness. Furthermore, we investigated a relationship between a *MITF* gene SNP (g.32386957 A>T) related to WS in foreign breeds (Fontanesi et al., 2012) and WS in Japanese Black cattle bred in Kagoshima Prefecture. In addition, we explored candidate SNPs affecting WS by using genome-wide association study (GWAS). Genotyping was performed by direct sequencing and allele-specific PCR, respectively. As a result, we observed both alleles of the g.32386957 A>T SNP in this population. Furthermore, composition of the SNP genotypes was clearly different between non-spotted and spotted groups ($p = 1.53 \times 10^{-6}$), suggesting that the g.32386957 A>T SNP was also strongly associated with WS in Japanese Black cattle. Variation in the *MITF* gene clearly explained the differences between non-spotted and spotted phenotypes but, at the same time, it was also evident that this SNP does not completely link to the WS in Japanese Black cattle. Moreover, according to the result of GWAS, there was no significant SNP related to WS.

Reproductive ability is receiving increased attention from beef cattle producers in Japan due to the high production cost and insufficient supply of feeder calves in Japanese Black. Although the breed is regarded as a small type when compared to European breeds and expected to show less occurrence of dystocia, stillbirth can be one of the influential factors in calf production. However comprehensive research has not yet been conducted on the trait in Japanese Black. In this study, we estimated genetic parameters of stillbirth in Japanese Black cattle in Kagoshima. We defined stillbirth as calf mortality between 244 days after successful insemination and a day after parturition. The single-trait threshold sire-MGS model was used for parameter estimation. The annual incidence of stillbirth ranged from 1.8% to 2.2%. The estimated heritability both direct and maternal

for stillbirth was 3.1% and 3.3%, respectively. This estimate was lower than that previously reported in Japanese Black cattle.

第1章 緒論

和牛の一品種である黒毛和種は、日本固有の肉用種であり、飼養頭数で国内産肉用種の約95%を占める。黒毛和種の代表的な特徴は、脂肪交雑（いわゆる「サシ」）をはじめとする肉質が非常に優れている点であり、近年、貴重な遺伝資源として海外でも注目されている（農林水産省, 2019; 揖斐, 2010）。近年の黒毛和種の飼養動向は平成22年以降、減少傾向で推移していたが、繁殖雌牛の飼養頭数は、生産基盤強化対策の実施により平成28年以降は4年連続で増加している。飼養戸数は小規模層を中心に減少傾向を示しているが、一戸当たり飼養頭数は増加傾向で推移しており、大規模化が進展している。また、肥育もと牛となる黒毛和種子牛の取引価格は、平成13年度の国内BSEの発生等の影響により大きく下落したが、その後、回復傾向で推移しており、平成19年度以降は、枝肉価格の低下に伴い低下したが、繁殖雌牛の減少により子牛の分娩頭数が減少したことに加え、枝肉価格が上昇したことから、平成24年度以降は子牛価格も上昇している。しかしながら、平成28年度から繁殖雌牛頭数は増加に転じているものの、依然として黒毛和種子牛価格は高水準で推移しており、令和元年度第一四半期における平均価格は781,500円である（農林水産省, 2019）。このように、繁殖基盤の弱体化が懸念されていることから、繁殖性における新技術を活用した改良手法の導入や、飼養管理の改善等を通じた子牛の生産拡大を図っていく必要がある。

家畜の改良において登録事業は必要不可欠である。和牛の登録事業では、和牛を大事な資源として確保していくとともに、個体の能力や特徴を把握し、その能力を的確に活用していくことが重要であるとされている（全国和牛登録協会, 2019）。その歴史については家畜登録事業発達史（家畜登録団体中央協議会, 1980）で以下のような記載があり、Table 1-1 に概要をまとめた。和牛の登録事業は、日

本固有の品種の造成固定を目的として 1920 年から各県で開始された。これは、わが国の在来牛の能力向上を目的として 1900 年から実施された雑種繁殖奨励の影響により、不揃いとなった体型や外貌などの特徴を固定するために実施されたものである。なお、当時は現在の黒毛和種という品種名ではなく、改良の途上にある牛という意味で「改良和種」と呼ばれていた。登録事業における登録審査では、冒頭の外貌的特徴に加え、体尺測定値、血統情報及び役肉用牛として有益な経済形質について審査され、県単位で個体の選抜が実施された。なお、鹿児島県では 1924 年に審査標準は制定されたが、登録事業が始まったのは 1935 年であった。このように各県で登録審査が開始されたことによって、それぞれの県内で改良和種の特徴が統一されてきたが、全国的には一品種として統一されていなかった。そのため、1937 年に登録事業奨励規則が交付され、1940 年には中国和牛研究会が作成した和牛審査標準を基に制定された中央畜産会黒毛和種体格審査標準が施行されたことにより、国内で一元化された登録事業が開始された。その後、改良和種の改良と斉一化が全国的に急速に進んだことにより、既に固定種と見なし得るまでに改良されたものと認められ、1944 年に黒毛和種として品種登録された。1948 年からは、黒毛和種の登録団体として設立された公益社団法人全国和牛登録協会によって、審査標準に基づく審査や登録が現在に至るまで一元的に行われ、外貌的特徴や血統情報を含む個体情報が厳格に管理されている。

Table 1-1 和牛の登録事業の歴史（家畜登録団体中央協議会, 1980）

年代	内容
1900年－1912年	雑種繁殖奨励
1920年代	鳥取県を皮切りに各県で標準体型（審査標準）の作成及び登録事業開始
1935年	中国和牛研究会が和牛審査標準を試作
1937年	登録事業の一元化 <登録事業奨励規則の交付>
1940年	中央畜産会黒毛和種体格審査標準の施行
1944年	品種登録 <黒毛和種, 褐毛和種, 無角和種>
1948年	全国和牛登録協会の設立
1950年	家畜改良増殖法の施行

黒毛和種の改良は、1955年までは日本の風土に適した農用牛として、役肉兼用の牛を造成することを目的としていた。しかし、その後の高度経済成長に伴い、自動耕耘機といった農業機械の普及ならびに自動車による陸上輸送の発達によって家畜の役利用が急速に衰退し、さらに国内の牛肉需要が増加したことで、1962年に黒毛和種の用途が役肉兼用から肉専用へと変更された。1968年からは、日本特有の肉用種の確立を目的として増体（肉量）に重点を置いた改良が始まり、さらに1977年からは脂肪交雑を始めとする肉質形質についても改良が開始された。1991年からは、わが国においても黒毛和種の遺伝的能力評価法にアニマルモデルBLUP（best linear unbiased prediction; 最良線形不偏予測）法（Henderson, 1973）が採用されたことによって、枝肉形質の改良が飛躍的に進んだ（全国和牛登録協会, 1992; 全国和牛登録協会, 2007）。実際の改良について、家畜改良センター（2018）の報告を元に、平成14年度及び平成29年度における性別ごとの枝肉6形質の平均値をTable 1-2に示した。平成3年度の牛肉輸入自由化以降、輸入牛肉との差別化を目的として、皮下脂肪厚を除くすべての形質で改良が進んでおり、特にBMSは去勢で36.4%、雌で34.7%（BMS）の増加率を示し、急速に改良が進んだ。このように、枝肉形質の改良は一定のレベルまで到達しているが、飼料原料価格が上昇する中、生産コストを左右する肥育期間の短縮や、飼料利用性の向上が重要視されており、種畜の改良と飼養管理の改善を一層進める必要があるとされている（農林水産省, 2015）。

Table 1-2 和牛の登録事業の歴史（家畜改良センター, 2018）

形質名	性別	平成 14 年度	平成 29 年度
枝肉重量(kg)	去勢	437.5	499.9
	雌	383.7	442.7
ロース芯面積(cm ²)	去勢	52.6	63.1
	雌	51.2	61.1
ばらの厚さ(cm)	去勢	7.5	8.0
	雌	7.2	7.7
皮下脂肪厚(cm)	去勢	2.4	2.5
	雌	2.8	2.8
BMS(No)	去勢	5.3	7.2
	雌	5.2	7.0

しかしながら、このような改良の影響により、黒毛和種集団における近交係数が上昇傾向にあるという問題があり、和牛誌 第 290 号(全国和牛登録協会, 2019)において、現在の黒毛和種集団の有効サイズは約 27 頭と報告されている。それゆえ、黒毛和種の多様な育種資源確保のため、遺伝的多様性に配慮した種畜の選抜についても課題として挙げられており（農林水産省, 2015）、黒毛和種の経済形質をさらに向上させる改良を進めると同時に、不良形質を除外する改良を実施することも重要である。

不良形質とは、その形質が発生すると経済的な損失を被る形質のことで、外貌上に関するもの、繁殖性に関するもの、枝肉に関するもの及び遺伝性疾患などがある。

外貌上に関する不良形質とは、先天性奇形や、いわゆる損徴とよばれるものがある。損徴とは、無角や、被毛、皮膚および乳頭の変異などのことであり、被毛がわずかに褐色帯びる黒色であることや、有角であるといった外貌的特徴を持つ黒毛和種においては、品種の特性に負の影響を与えることが知られている。また、黒毛和種における全身褐色は *MSHR*（メラニン細胞刺激ホルモン受容体遺伝

子型)によって支配されていることが知られている。小山ら(2017)は、鹿児島県産黒毛和種の雌子牛で発生する損徴(白斑、舌の異常、乳頭の異常及び被毛の異常)について調査し、その発生率は年々増加傾向であること、損徴(白斑、舌の異常及び乳頭の異常)を持つ母牛は損徴の無いものよりも子牛の損徴発生率を有意に増加させることを報告した。

繁殖性に関わる不良形質とは、死産やフリーマーチンなどがある。フリーマーチンとは、ウシにおける異性複数産子(異性双子)を妊娠した場合、雌側産子の92~93%は生殖器に先天異常が起こり、不妊症となるものである。また、死産に関して小形ら(1995)は、山形県の1町内における黒毛和種子牛の死産発生率は2.4%と報告している。さらに、Cainら(1987)は過去60年に亘る調査によって、肉用子牛の周産期における死亡率が8.6%にも及び、これによる経済的損失が大きな割合を占めていることを報告している。

枝肉に関する不良形質には瑕疵がある。瑕疵とは枝肉の商品性を損なう異常肉のことである。具体的には、多発性筋出血(シミ)や枝肉水腫(ズル)、筋肉炎(シコリ)、外傷(アタリ)、割除(カツジョ)及びその他の6つに分類される。枝肉にこれらの瑕疵が発生すると見た目が悪くなるため、部分肉に整形する際に瑕疵の部位が取り除かれてしまい、牛枝肉取引において枝肉価格に負の影響を与える。Nishiら(2016)は、シミ、ズル、シコリ、アタリ及びカツジョの遺伝率を、それぞれ 0.24 ± 0.03 、 0.06 ± 0.01 、 0.18 ± 0.02 、 0.05 ± 0.01 及び 0.02 ± 0.01 と推定しており、シミとシコリについては遺伝的改良が可能であることを報告した。

遺伝性疾患とは、遺伝子の突然変異により発症する疾患(遺伝病)である。黒毛和種では常染色体劣性の単一遺伝子病について原因遺伝子の特定が進んでおり、既に原因遺伝子が判明した9種類(バンド3欠損症、血液凝固第13因子欠

損症、クローディン 16 欠損症、チェディアックヒガシ症候群、眼球形成異常症、モリブデン補酵素欠損症、IARS 異常症、前肢帯筋異常症及びバーター症候群 1 型) の疾患については、種雄牛及び候補種雄牛を対象に、遺伝子型検査が実施されている(農林水産省, 2014)。さらに、これらのうち 5 種類(バンド 3 欠損症、クローディン 16 欠損症、モリブデン補酵素欠損症、IARS 異常症及び血液凝固第 13 因子欠損症) の疾患については種畜検査において、判明した指定遺伝的不良形質に係る遺伝子型検査の有無及びその結果を、種畜証明書の特徴欄へ飼養者の合意のもと記載されることとなっており、疾患の予防だけでなく集団内での不良遺伝子の拡散を防いでいる(農林水産省, 2014)。これらの遺伝病は肉用牛の遺伝的不良形質のプロファイル(農林水産省, 2014)において詳細が公表されており、例えば、子牛虚弱症候群では、IARS 遺伝子のミスセンス変異(c.235G>C)が原因である。

しかしながら、黒毛和種で発生する不良形質に関する報告はまだ少なく、原因遺伝子が不明な遺伝性疾患や遺伝的不良形質も存在する。

鹿児島県の畜産は、温暖な気候や広大な畑地に恵まれるなど地域の特性を十分に活かして、全国有数の規模に発展している。その中でも肉用牛生産は、2018 年度における年間産出額が 1,258 億円と、本県の農業産出額(5,000 億円)の約 25.2%のシェアを占める基幹産業である。さらに、本県の黒毛和種の飼養頭数は、全国第 1 位の約 338,100 頭(2019 年 2 月 1 日時点)と全国の飼養頭数の約 13.5%を占めている(農林水産省, 2019)。また、本県の黒毛和種の出荷頭数は、全国第 1 位の約 42,994 頭と全国の飼養頭数の約 18.2%を占めている(日本食肉格付協会, 2019)。

そこで本研究では、鹿児島県産黒毛和種で発生する不良形質に関する知見を得ることを目的に、以下の 5 課題を検討した。まず、第 2 章では、鹿児島県産黒

黒毛和種で発生する損徴に関する遺伝的パラメータの推定を行い、損徴発生に遺伝的要因がどの程度関与しているのかを検討し、さらに損徴間の関連性を把握するため、遺伝相関及び表型相関を推定し、損徴発生による他の損徴への影響を検討した。第 3 章では、鹿児島県産黒毛和種で発生する白斑と枝肉形質の関連性を把握するため、白斑と枝肉形質の間の遺伝相関及び表型相関を推定し、白斑を遺伝的に淘汰した場合の経済形質への影響について検討した。第 4 章では、黒毛和種で発生する白斑における分子遺伝学的な調査を行い、外国品種で報告のある *MITF* 遺伝子上の変異が黒毛和種でも存在するか確認し、その遺伝子型と白斑の有無との関連性を検討した。さらに、ゲノムワイド関連解析によって、白斑発生に関与する候補 SNP を探索した。第 5 章では、鹿児島県産黒毛和種で発生する死産に関する遺伝的パラメータの推定を行い、死産発生に遺伝的要因がどの程度関与しているのかを検討した。

第2章 鹿児島県産黒毛和種で発生する損徴に関する遺伝的

パラメータの推定

1. 緒言

黒毛和種は、1944年に登録された品種であり、被毛が褐色を帯びた黒を呈し、有角であるといった外貌上にいくつかの特徴を持つ（全国和牛登録協会, 2017）。これらの特徴は、わが国で和牛の登録事業が開始された当時の審査標準に記載されており、黒毛和種としての重要な品種の特徴である。

鹿児島県（本県）では、和牛の外貌上の不良形質である損徴は、1924年に制定された鹿児島県役肉用牛標準体型において審査標準に組み込まれた（全国和牛登録協会鹿児島県支部, 1989）。本審査標準では、異毛色（全身刺毛を含む）、恥骨部（牝）乳房以外の白斑、白舌、株骨、面旋欠及び牝の陰毛甚だしく白きもの及び豚尻の6項目が失格として扱われていた。その他の県では、Table2-1に示したように、1928年に制定された広島種標準体型では、異毛色、恥骨部・乳房以外の白斑及び舌全部白きもの、1932年に改正された兵庫県の登録規程である審査員執務規定では、白舌または赤舌、羽換肩、豚尻、乳房または睾丸前の小白斑を除く異毛色のあるもの及び蹄の変形または悪質のもの、1933年に改正された鳥取県の標準体型では、異毛色、恥骨部・乳房部以外の白斑、舌全部白きもの及び豚尻などが失格とされ、県によって項目に若干の違いはあるものの、損徴は同様に不良形質として扱われていたことが確認できる。その後の登録事業の一元化に伴い、1940年に制定された中央畜産会黒毛和種体格審査標準において、上記の各県における失格項目についても集約され、異毛色、恥骨部（牝）・乳房部（牝）以外の白斑、痣の大なるもの及数多きもの、全身刺毛、白舌・口接舌、株骨及び豚尻の7項目が採用された（家畜登録団体中央協議会, 1980）。現在に

至るまで、経済的損失の程度によって失格となるものや審査評点において減率対象となるもの等、損徴の取扱いが細分化されるなど、審査標準に一部改正があったものの、黒毛和種としての品種の特性は変わらず維持されており、これらの損徴情報は血統情報等とともに全国和牛登録協会にて管理されている（家畜登録団体中央協議会, 1980; 全国和牛登録協会, 2017）。

現在の黒毛和種における損徴に関する審査標準は、和牛登録事務必携（全国和牛登録協会, 2017）において、【第1類】明らかに単純劣性の遺伝子によるとされているもの（無毛、先天性盲目、単蹄等）、【第2類】遺伝的なものと思われるが、その遺伝様式が判然とせず、単純劣性と判定しえないもの（無尾、小眼球）、【第3類】遺伝的なものと思われるが、その遺伝様式が判然とせず、かつ、この形質の発現によって生じる経済的価値の損失が、他の類に比較し小さいものと思われるもの（異毛色、乳房部・恥骨部以外の顕著な白斑、乳頭数不足等）の3種類に分類されている。このうち、失格として扱われるものは異毛色、乳房部（雌）・恥骨部（雄）以外の顕著な白斑、乳頭数不足及び正常乳頭の癒着等があり、50%以上の減率の審査項目のあるものもこれに該当する。減率の審査項目には、(イ) 被毛・皮膚の異常：毛色が淡いもの（季節的な淡色で程度の甚だしくないものを除く）、全身刺毛（特に甚だしくない刺毛は除く）、鰻線・背赤（季節的なもの、放牧によるもの及び顕著でないものを除く）、底すだれ（局部的または季節的なものを除く）、痣（小痣）を除く、糊口・鰻線・鉢巻・内股淡色、白角等のうち2つ以上を合わせ備えたもの、蜂目・耳内赤・乳頭赤・肛門赤等のうち2つ以上合わせ備えるか、またはこれらのいずれかと、尾房褐・鉢巻・鰻線等のいずれかを合わせ備えたもの、乳房部（雌）・恥骨部（雄）以外に小白斑のあるもの、(ロ) 乳頭の異常：4本の乳頭のうち1～4本が短小なもので、いずれかの乳頭端も孔（点）のあるもの、(ハ) 望見または触査によって季肋骨の異常が認められる場

合：季肋骨の異常としての減率はないが、中軀全体として減率される、(二) 舌の異常：乳房部・恥骨部以外の白斑があるか、または甚だしい白角の場合にのみ舌色を検し、白舌（桃舌）または口接と、小白斑または白角との両者が存する場合などについての審査されている。

本研究では、損徴の中でも白斑、舌の異常（奥接・中接・縁接・先接・白舌）及び乳頭の異常（乳頭数不足・乳頭接近・乳頭癒着・乳頭根癒着・乳頭短小）の3種に着目した。白斑は、審査標準のみならず、家畜改良増殖法施行規則（農林水産省, 1950）第七条第二項の規定に基づく同条第一項の種畜の等級の判定（農林水産省, 1984）においても、黒毛和種の品種の要件として「恥骨部以外に顕著な白斑のないこと。」と記載（平成 24 年 4 月 1 日農林水産省告示第 9 号（農林水産省, 2012b））の施行に伴い、現在は廃止）されており（農林水産省, 2012a）、品種の特徴を損なう形質として淘汰されてきた損徴である。白舌以外の舌の異常（奥接、中接等）及び乳頭の異常（乳頭癒着、乳頭数不足、乳頭短小）は、1950年代から追加された損徴である（家畜登録団体中央協議会, 1980）。このうち、白斑と乳頭の異常は登録審査時に失格となる場合があり、繁殖農家にとって経済的損失につながる可能性がある。

これまでに我々は、鹿児島県産黒毛和種の雌子牛における白斑、舌の異常及び乳頭の異常の発生率が年々上昇傾向にあること、白斑と舌の異常において、それらの損徴を発生している母牛と正常な母牛から生まれた子牛の発生率には有意差があることを報告した（小山ら, 2017）。これは、黒毛和種で発生するこれらの損徴が現在でも完全には淘汰されていないことや、損徴の発生には遺伝的な影響が大きい可能性があることを示している。さらに、白斑を持たない父牛と白斑をもつ母牛の間に生まれた後代の発生率には有意差があり、単一遺伝子による影響ではないことを報告した（小山ら, 2017）。哺乳動物における毛色の遺伝は

いくつかの大きな影響がある遺伝子座によって支配されていると考えられている。しかしながら、毛色は複合体構造を示す形質の調査モデルとされており、遺伝子型と表現型の間には近い関係性があるとされている (Protas ら, 2008; Hayes ら, 2010)。それゆえ、本研究では、白斑を量的形質として扱った。Ihara ら (2006) は、連鎖解析によって黒毛和種で発生する乳頭数不足の発生は、いくつかの遺伝子座が有意に関連する可能性があることを明らかにした。しかしながら、損徴発生に遺伝的な要因がどの程度関与するのかは明らかにされていない。そのため、本研究では鹿児島県産黒毛和種の雌子牛集団の遺伝的パラメータを推定した。

Table2-1 審査標準における損徴の歴史（家畜登録団体中央協議会, 1980）

年代	損徴	
	団体名【審査標準】	失格等
1924年	鹿児島県【鹿児島県役肉用牛標準体型】	異毛色（全身刺毛を含む），恥骨部（牝）乳房以外の白斑，白舌，株骨，面旋欠及び牝の陰毛甚だしく白きもの及び豚尻
1928年	広島県【広島種標準体型】	異毛色，恥骨部・乳房以外の白斑及び舌全部白きもの
1929年	兵庫県【但馬種牛登録に関する諸規定】	一般毛色：黒，褐，簾，雑毛，斑（黒以外は失格とすべき）等
1932年	兵庫県【審査員執務規程】	白舌または赤舌，羽換肩，豚尻，乳房または睾丸前の小白斑を除く異毛色のあるもの及び蹄の変形または悪質のもの
1933年	鳥取県【鳥取県の標準体型】	異毛色，恥骨部・乳房部以外の白斑，舌全部白きもの及び豚尻
1935年	中国和牛研究会【和牛審査標準】	異毛色，恥骨部・乳房部以外の白斑，舌全部白きもの及び豚尻
1940年	中央畜産会【中央畜産会黒毛和種体格審査標準】	異毛色，恥骨部（牝）・乳房部（牝）以外の白斑，痣の大なるもの及数多きもの，全身刺毛，白舌，・口接舌，株骨及び豚尻
1948年	全国和牛登録協会【黒毛和種審査標準】	異毛色，恥骨部（牝）・乳房部（牝）以外の白斑，白舌及び豚尻

2. 材料及び方法

2-1. 供試材料

材料には、公益社団法人全国和牛登録協会鹿児島県支部にて保存されている、1998年7月から2016年4月までに生まれた鹿児島県産黒毛和種雌子牛771,830件における、子牛検査時の損徴記録を含む子牛登記情報（以下、子牛データ）を用いた。このうち、損徴を持たない個体（以下、正常）は714,065件、損徴を持つ個体（以下、損徴）は57,765件であった（Table 2-2）。なお、本研究で扱った損徴は失格に至らなかったものもすべて含まれている。

Table 2-2 Data structure of calves.

Trait	Normal calves	Defective calves	Incidence (%)
WS	743,537	28,293	3.81
TD	748,911	22,919	3.06
ND	765,277	6,553	0.86
Total	714,065	57,765	8.09

No. of calves, 771,830.

2-2. データの定義

- (1) 白斑：白斑とは、通常黒色の被毛が斑状に白くなり、その中の皮膚がピンク色となる損傷である（Figure 2-1）。審査標準において、乳座・乳房部（恥骨部）以外の白斑は、子牛検査時で鶏卵大（及び登録審査時で拳大）以上の大きさで失格として扱われ、さらに失格とならない鶏卵大未満（及び拳大以上）の小白斑がある場合には、減率加算（2～10%）の対象となる（全国和牛登録協会, 2017）。ただし、乳座・乳房部（恥骨部）における白斑（Figure 2-2）は、その大きさに関係なく登録可能である。なお、本データでは乳座・乳房部（恥骨部）の白斑も含まれていた。



Figure 2-1 White spotting



Figure 2-2 White spotting on udder

(2) 舌の異常：舌の一部あるいは全体が白くなるものであり（Figure 2-3）、本研究では奥接（おくつぎ）・中接（なかつぎ）・縁接（ふちつぎ）・先接（さきつぎ）・白舌（しろした）をまとめて舌の異常とした。審査標準において、舌の異常は失格にはならず、また単体で発生しても乳座・乳房部以外の白斑等と併発している場合は減率加算（2～20%）の対象となる（全国和牛登録協会, 2017）。



Figure 2-3 Tongue defect (white color showed defective area)

(3) 乳頭の異常：本研究では乳頭数不足・乳頭接近・乳頭癒着・乳頭根癒着・乳頭短小の5種類をまとめて乳頭の異常とした。乳頭数不足（Figure 2-5）とは通常4本ある乳頭数が2本や3本と不足してしまっているもの、乳頭接近（Figure 2-6）とは乳頭同士が通常よりも接近しているもの、乳頭癒着（Figure 2-7）とは乳頭同士が癒着したもの、乳頭根癒着（Figure 2-8）とは乳頭の基部が癒着しているもの、乳頭短小とは乳頭が通常よりも短くなっているものを表す。審査標準では乳頭数不足及び乳頭癒着は失格として扱われ、乳頭短小及び乳頭根癒着は減率加算（乳頭短小：2～20%、乳頭根癒着：一律20%）の対象となる（全国和牛登録協会, 2017）。



Figure 2-4 Normal teats

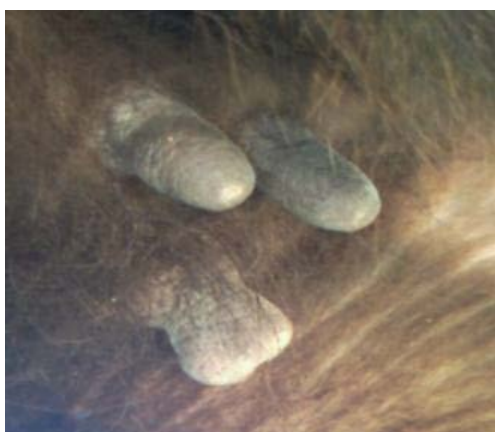


Figure 2-5 Teat absence



Figure 2-6 Abnormal teat location (1)

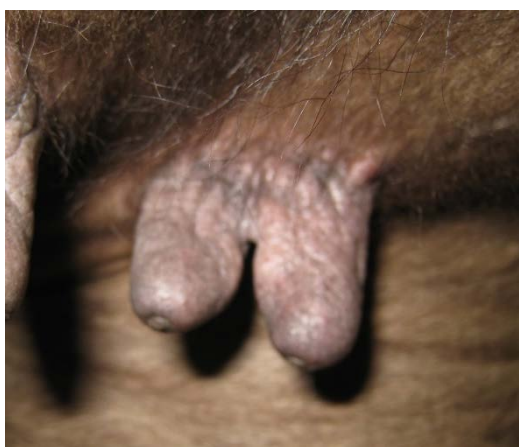


Figure 2-7 Abnormal teat location (2)



Figure 2-8 Abnormal teat location (3)

2-3. データの編集

損徴の有無は不連続分布を示すことから、Wright (1934) によって提示されたライアビリティ (Liability) の概念に基づく理論に従い、正常を「0」、損徴を「1」とした2値の閾値形質として扱った。この理論では、形質の不連続な発現を引き起こす背景として、閾値の背後に連続的な変異があると仮定するものであり、この隠れた連続変異がライアビリティである (揖斐ら, 2005)。つまり、このライアビリティが閾値を下回るときに正常となり、閾値を超えた場合には損徴が発生することを示す。

次に、子牛データ 771,946 件のうち、以下に該当する個体のデータを削除対象とした。

- ・ 出生時母牛年齢が 1 歳未満または 17 歳以上のもの。
- ・ 出生年月が 1,000 頭未満のもの。
- ・ 生産頭数が 50 頭未満の農家。
- ・ 後代頭数が 20 頭未満の父牛 (種雄牛)。

削除後のデータ数は 553,437 件となり、各損徴における内訳を Table 2-3 に示した。さらに、553,437 件の雌子牛の登録番号を追跡調査したところ、本データ中で 88,317 件が母牛となっており、それらの後代記録は 266,786 件含まれていた。そこで、これら 88,317 件の母牛についても、雌子牛と同様に白斑、舌の異常及び乳頭の異常をそれぞれ、正常を「0」、損徴を「1」として整理した (Table 2-4)。

Table 2-3 Data structure of calves.

Trait	Normal calves	Defective calves	Incidence (%)
WS	533,121	20,316	3.81
TD	535,933	17,504	3.27
ND	548,497	4,940	0.90
Total	510,677	42,760	8.37

No. of calves, 553,437.

Table 2-4 Data structure of dams had own calf data.

Trait	Normal dams	Defective dams	Incidence (%)
WS	85,449	2,868	3.36
TD	85,903	2,414	2.81
ND	88,138	179	0.20
Total	82,856	5,461	6.59

No. of dams, 88,317.

2-4. 分析方法

分析には、複形質閾値アニマルモデルを用いて遺伝的パラメータを推定した。アニマルモデル (Figure 2-9) とは、増体能力や泌乳能力などのように、対象個体自身が記録を持っている場合に対象個体自身の育種価を予測するためのモデルである (佐々木, 1994)。

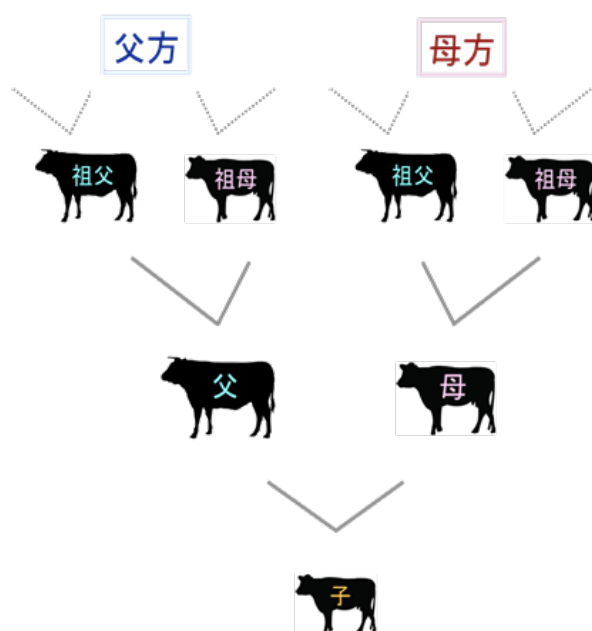


Figure 2-9 Diagrammatic illustration of animal model.

なお、分析に用いたモデルは以下の通りである。

$$U_{ijklm} = \mu + BYS_i + F_j + b_{1.1} \cdot IBC_k + b_{2.1} \cdot CAD_l + b_{2.2} \cdot CAD_l^2 + u_m + e_{ijklm}$$

$$Y_{ijklm} = \begin{cases} 0 & \text{if } U_{ijklm} \leq T \\ 1 & \text{otherwise} \end{cases}$$

ここで、 Y_{ijklm} は k 番目の雌子牛における損徴の閾値記録、 U_{ijklm} はライアビリティ、 T は閾値、 μ は全平均、 BYS_i は i 番目の出生年季節の母数効果、 F_j は j 番目の繁殖農家の変量効果、 IBC_k は k 番目の雌子牛の近交係数、 CAD_l は l 番目の出生時母牛年齢、 $b_{1.1}$ は子牛の近交係数に対する 1 次偏回帰係数、 $b_{2.1}$ 及び $b_{2.2}$ は出生時母牛年齢に対する 1 次及び 2 次偏回帰係数； u_k は m 番目の相加的遺伝効果； 及び e_{ijklm} は残差を示す。

分析に用いた各効果の水準数及び平均値±標準偏差を Table 2-5 に示した。なお、血統情報は 1975 年まで遡った。

分散（共分散）の推定には、Gibbs sampling を用いたベイズ推定法を行う、BLUPF90 ファミリーの THRGIBBS1F90 プログラム（Misztal ら, 2002； Tsuruta ら, 2006）を使用した。なお、このプログラムでは 0 は欠損値として扱うため、分析時には正常を「1」、損徴を「2」に変換した。分析には、毎回の残差分散を 1.00 に固定して 400,000 回の単連鎖を行い、最初の 100,000 回のサンプルを burn-in として破棄し、その後の 300,000 回のサンプルを事後平均の算出に用いた。分析の収束状況の確認には、トレースプロットによって視覚的に調査することのできる BLUPF90 ファミリーの POSTGIBBS1F90 プログラム(Misztal ら, 2002)を用いた。

Table 2-5 Levels, mean and SD of each effects.

Effects	Levels	Mean \pm SD
Birth year- season	71	-
Reproductive farm	3,545	-
Pedigree information	771,252	-
Inbreeding coefficient of calf	-	5.44 \pm 4.20
Calving age of the dam	-	6.72 \pm 3.53

また、推定育種価（EBV）の遺伝ベースは 2006 年に設定し、この年に生まれた雌子牛の EBV 平均値を 0 に置き換え、全個体における EBV から偏差を取った。

その後、Van Tassell ら（2003）及びCole ら（2007）の方法を参考として、上記の EBV を %BV に変換した。算出方法は以下の通りである。

$$\%BV = (1 - F[-EBV + F^{-1}(1 - x^*)]) \times 100$$

ここで、%BV は EBV を実際のスケールに戻した各損徴の発生率（%）、 F は標準正規分布の累積分布関数、 F^{-1} は F の逆関数、 EBV は遺伝ベース調整後の推定育種価、 x は分析に用いた各損徴の発生率を示す。なお、概略図は Figure 2-10 の通りである。

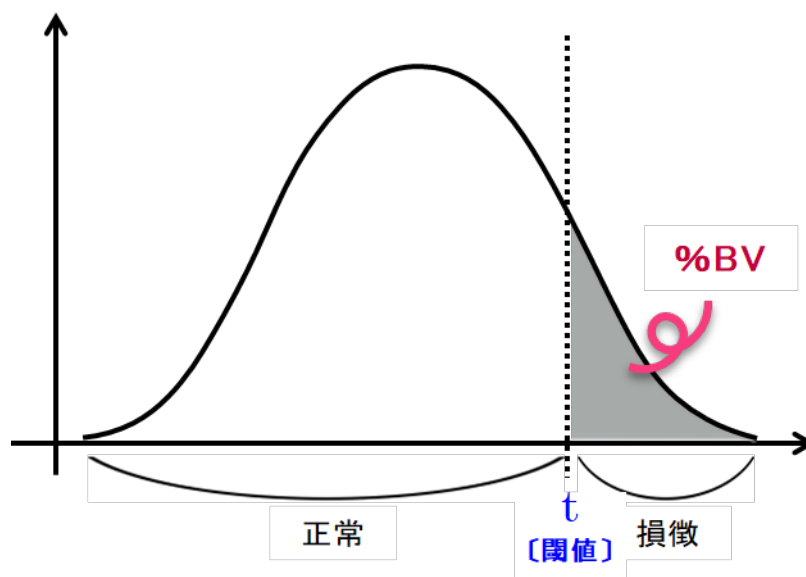


Figure 2-10 Diagrammatic illustration of %BV.

3. 結果及び考察

3-1. 分散成分推定値

推定された分散（共分散）成分の結果を Table 2-6 に示した。繁殖農家分散は 0.03（TD）から 0.26（WS）の範囲であり、WS 及び TD はほとんど 0 だった。遺伝分散は 0.51（TD）から 3.38（WS）の範囲だった。

表型分散に対する繁殖農家分散の割合は WS、TD 及び ND でそれぞれ 0.01、0.15 及び 0.01 だった。このことから、TD の発現には、遺伝的な効果と繁殖農家の効果の両方が影響していることが示唆された。しかしながら、TD については子牛検査時に記録されていないことがある可能性があり、それらによって各分散成分に影響が出ているかもしれない。なぜなら、TD の検査は、基本的に牛舎の中で、子牛の口を開けてその有無を確認する。そのため、他の損徴の検査と比較すると確認しにくいのもかもしれない。さらに、Randhawa ら

（2009）は、バッファローにおける尋常性白斑の発生は、グリシン酸銅の非経口摂取及び酸化亜鉛の経口摂取と銅を摂取させることによって、ほとんど完全に臨床的回復し、さらに再発を防ぐことができると報告している。尋常性白斑とは、主に鼻鏡や舌といった無毛部皮膚において後天的に白斑を発症するものであり（迫ら, 1983）、本研究における TD の特徴と一致する。このことから、Randhawa ら（2009）の結果は、TD が環境的な要因によって発生する可能性があることを示している。

遺伝率は WS、TD、ND でそれぞれ 0.76、0.29 及び 0.50 であり、黒毛和種で発生する損徴は遺伝的要因が強く関係していることが示唆された。しかしながら、WS 及び ND において、表型分散に対する繁殖農家分散の割合がほとんど 0 であったため、遺伝率が 1.0 になることが期待されたが、それぞれ 0.79 及び

0.50 と推定された。一般的に、黒毛和種のような単色種で発生する白斑は劣勢遺伝子 s によって発現することが知られているが、多くの例外があることが報告されている (Olson, 1999)。それゆえ、WS の発生には一定の水準の優性遺伝効果が影響している可能性がある。しかしながら、本研究においては相加的遺伝効果のみを考慮しており、優性遺伝効果はモデルに加えていないため、今後は優性遺伝効果についても検証する必要がある。さらに、1924 年より開始された黒毛和種で発生する白斑の改良は、審査標準の中では牛を望見した際に、その白斑が明らかであるか否かによって失格あるいは減率加算として扱われてきたように、望ましくない形質として淘汰されてきた。これらの影響によって白斑の大きさが小さくなっている可能性がある。つまり、子牛検査において、ごく小さい白斑は人の目では見つけることができず、記録として残されていない可能性があり、このような誤差が遺伝分散に含まれていないことが影響しているかもしれない。他方、ND の類似の研究として、Brka ら (2002) は副乳頭の遺伝率を、ジャーマンシンメンタル種及びジャーマンブラウンスイス種でそれぞれ、0.45 及び 0.43 と報告しており、この結果は本研究の ND の遺伝率と比較するとわずかに低かった。ND については、本研究ではデータ数の都合上、乳頭数不足、乳頭接近、乳頭癒着、乳頭根癒着及び乳頭短小の 5 種類をまとめて 1 形質として扱っていることが影響している可能性がある。今後は、さらにデータを蓄積した上で、乳頭数不足、乳頭接近、乳頭癒着、乳頭根癒着及び乳頭短小それぞれについて遺伝的パラメータを推定する必要がある。さらに、黒毛和種における乳頭数不足について連鎖解析をした結果、いくつかの遺伝子座が有意に関連していると報告されているため (Ihara ら, 2006)、ND の発現における遺伝機構についても調査する必要がある。

Table 2-6 Variance components and heritability of each appearance defect

Trait	Genetic variance [†]	Farm variance [†]	Residual variance ^{†‡}	Phenotypic variance [†]	Heritability [†]
WS	3.38 ± 0.25	0.05 ± 0.01	1.00 ± 0.00	4.43 ± 0.26	0.76 ± 0.01
TD	0.51 ± 0.04	0.26 ± 0.01	1.00 ± 0.00	1.77 ± 0.04	0.29 ± 0.01
ND	1.06 ± 0.17	0.03 ± 0.01	1.00 ± 0.00	2.09 ± 0.17	0.50 ± 0.04

[†]Mean±SD. [‡]Residual variance was fixed at 1.00 within the analysis. WS, white spotting. TD, tongue defect. ND, nipple defect.

3-2. 各効果の推定値

本データ中に後代を 20 頭以上生産しており、かつ推定育種価 (EBV) の正確度が 0.90 以上の父牛における %BV の範囲は、WS、TD 及び ND でそれぞれ 0.0% ~95.4% (n=214)、0.0% ~34.2% (n=142) 及び 6.0%~99.6% (n=102) だった。また、本データ中に後代を 5 頭以上生産しており、かつ本データ中に自身の子牛検査時の記録のある母牛 (n=17,449) における %BV の範囲は、WS、TD 及び ND でそれぞれ 0.0% ~100.0%、0.1% ~34.6% 及び 0.0%~31.9% だった。次に、各損徴におけるこれらの父牛及び母牛の %BV について、それぞれ Figure 2-11 及び Figure 2-12 の通りヒストグラムを作成した。WS において、父牛及び母牛の %BV には個体によって大きな差があることが示されたことから、雌雄間で同様の傾向があることが確認された。さらに WS においてヒストグラムの形状を確認したところ、父牛及び母牛の約半数以上 (父牛 : 57.0% 及び母牛 : 47.6%) の個体は %BV が 10% 未満であることが示された。また、TD においては、父牛及び母牛の %BV は 35% 未満であり、そのヒストグラム形状は両者の大半 (父牛 : 89.4% 及び母牛 : 98.4%) の %BV が 10% 未満であることが示された。このような結果となった理由として、1924 年から始まった黒毛和種の審査において、WS と TD が望ましくない形質として淘汰されてきたためであるかもしれない。他方、ND における %BV では、父牛間に大きな差が確認された一方で、母牛では %BV のほとんどが 10% 未満と、父牛に比べて個体差が小さくなっていたことから、性別間で差が確認された。これは、乳徴の選抜圧が性別によって異なることが関係しているかもしれない。例えば審査標準において、雌では乳徴に対する重み付けが 7 ポイントである一方で、雄では 4 ポイントとされており (全国和牛登録協会, 2017)、このことが性別間差に関連している可能性がある。今後は、ND の発生に関する候補遺伝子の特定するために、さらなる調査が必要である。

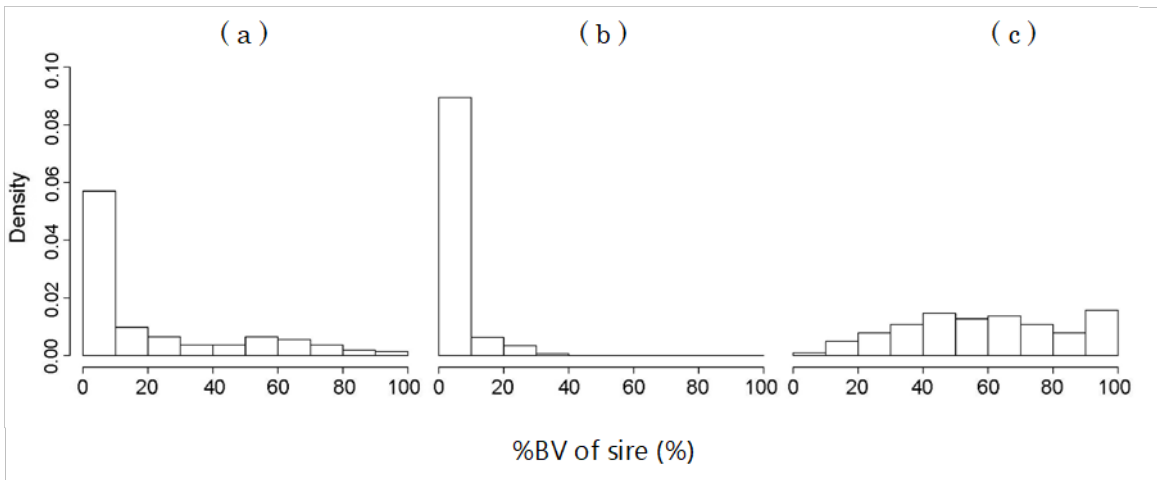


Figure 2-11 Distribution of the %BV estimates of defective appearances for sires.
 (a), white spotting (n =216). (b), tongue defect (n =145). (c), nipple defect (n =115).

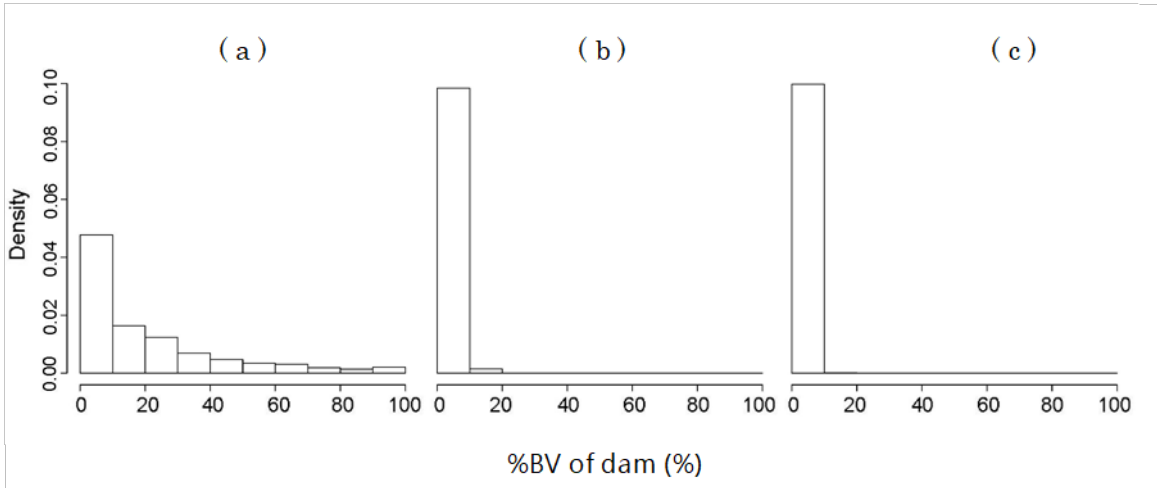


Figure 2-12 Distribution of the %BV estimates of defective appearances for dams
 (n = 17,449).
 (a), white spotting. (b), tongue defect. (c), nipple defect.

上記の父牛（WS：n=214、TD：n=142 及び ND：n=102）の%BV とそれらの娘牛の平均損徴発生率との関係を Figure 2-13 に示した。両者の間には正の線形の関係が認められた（t-test for regression coefficient: $p < 0.01$ ）。なお、各損徴における決定係数（ R^2 ）は WS で 0.742、TD で 0.481 及び ND で 0.350 だった。

以上の結果から、損徴のある種雄牛は基本的に選抜されないものの、各損徴の発生に関わるいくつかの原因遺伝子を保因している可能性が示唆された。

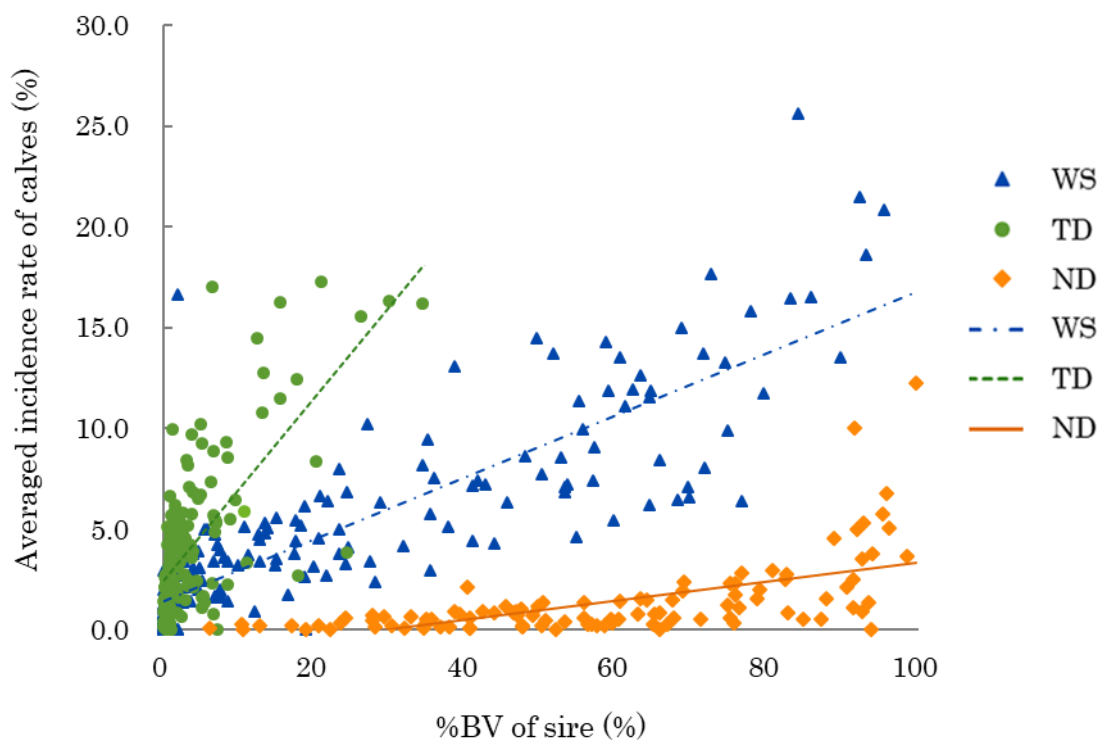


Figure 2-13 Distribution of incidence of defective appearances in calves with the %BV of sires.

WS, white spotting. TD, tongue defect. ND, nipple defect.

各損徴における繁殖農家の BLUP の幅は、WS、TD 及び ND でそれぞれ 1.14、2.69 及び 0.72 であり、これらは繁殖農家分散の大きさが反映されており、TD は繁殖農家間の差が大きかった (Figure 2-14)。

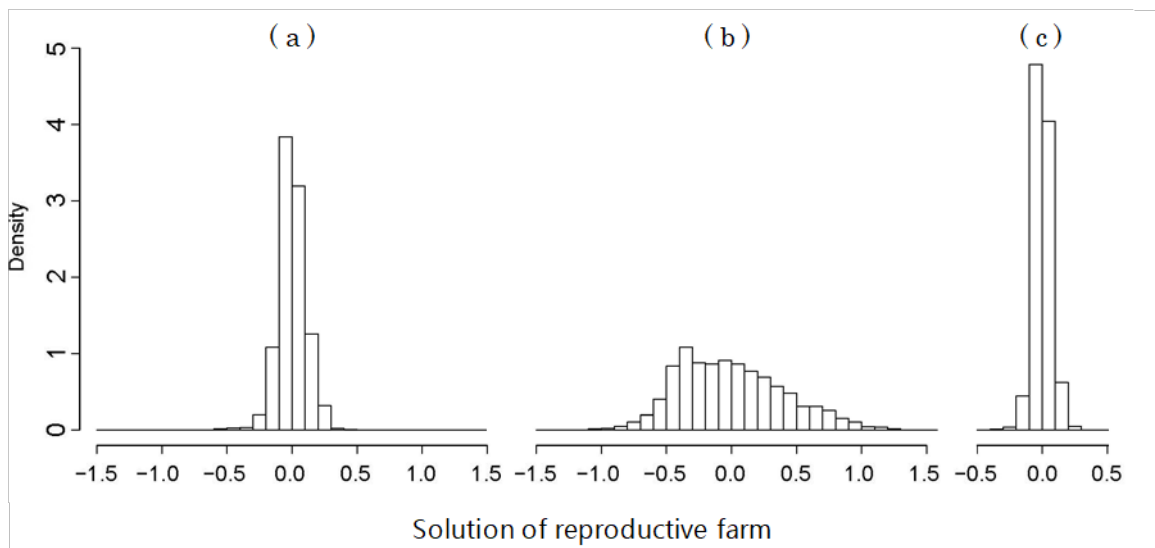


Figure 2-14 Distribution of the solutions of reproductive farm in defective appearances.

(a), white spotting. (b), tongue defect. (c), nipple defect.

各損徴における出生年季節の BLUE 及び子牛の発生率を Figure 2-15 及び Figure 2-16 に示した。出生年季節の BLUE の範囲は、0.99 (WS) から 1.52 (ND) であり、1988 年から 2015 年にかけて増加傾向を示した。これは、発生率の推移とも同様の傾向があり、我々の以前の報告と一致した (小山ら, 2017)。

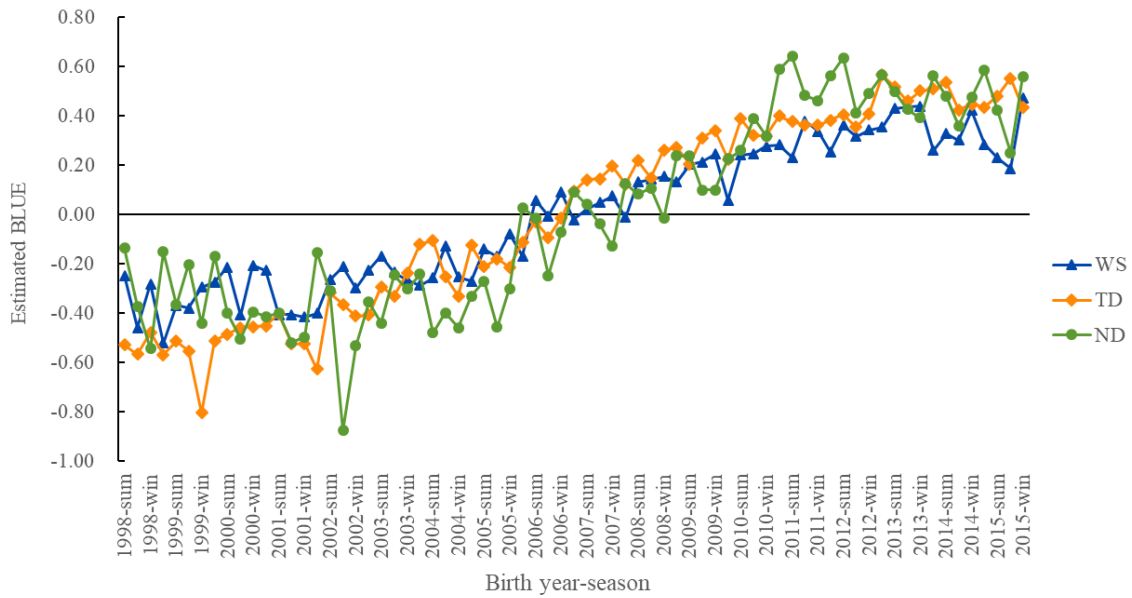


Figure 2-15 Relationship between defective appearances and the solutions of birth year-season.

sum, summer. win, winter.

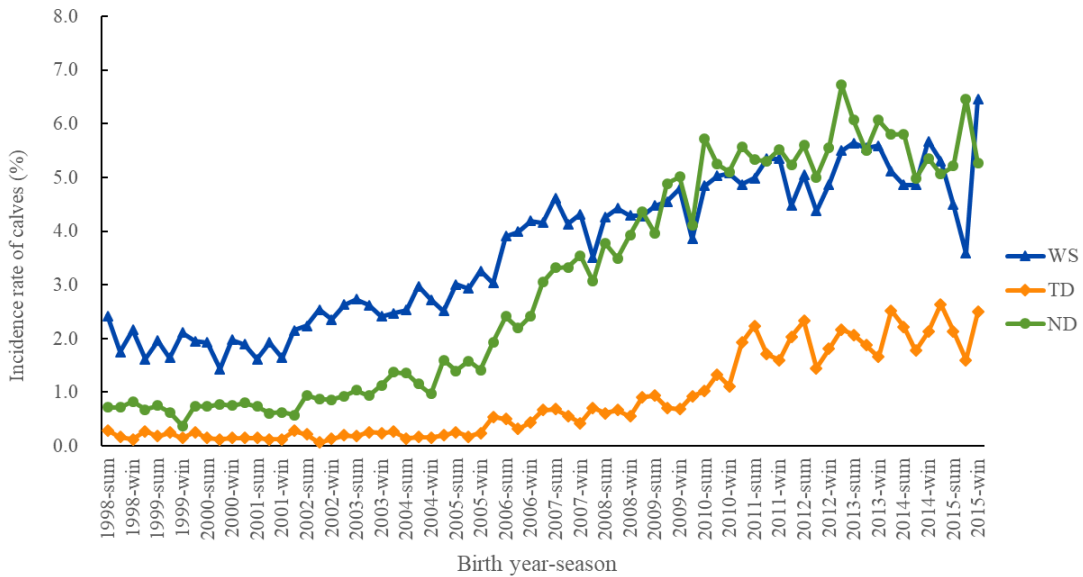


Figure 2-16 Relationship between defective appearances and incidence rate of calves of birth year-season.

sum, summer. win, winter.

各損徴における子牛の近交係数及び分娩時母牛年齢の一次（二次）回帰係数を Table 2-7 に示した。子牛の近交係数及び出生時母牛年齢における傾きは-0.01 (ND) から 0.08 (WS) 及び 0.01 (ND) から 0.00 (TD) であり、どの損徴においてもごく小さく、損徴の発生にはあまり影響しないことが示唆された。

Table 2-7 Estimated regression coefficients of defective appearances.

Trait	IBC		CAD	
	Linear	Linear	Linear	Quadratic
WS	-0.001±0.002	0.006±0.003	0.001±0.000	
TD	0.000±0.001	-0.008±0.002	0.002±0.000	
ND	0.007±0.003	0.003±0.003	0.000±0.001	

Mean±SD. IBC, inbreeding coefficient of calf. CAD, calving age of dam

3-3. 遺伝的趨勢

種雄牛及び雌牛における各損徴の遺伝的趨勢を Figure 2-17 及び Figure 2-18 に示した。なお、これらは種雄牛及び雌牛の生年ごとの水準数が 20 件以上である 1975 年から 2009 年の間とした。種雄牛における遺伝的趨勢は、WS で 1.90%～34.48%、TD で 0.59%～3.36% 及び ND で 0.28%～2.78%、雌牛においては WS で 3.05%～25.44%、TD で 0.49%～3.10% 及び ND で 0.26%～1.27% であり、種雄牛及び雌牛の全損徴で、有意に上昇している傾向が確認された (t-test for regression coefficient: $p < 0.01$)。なお、雌牛と比較して、種雄牛の回帰式が上下に変動している傾向が見られるが、これは生年ごとの水準数が雌牛では 2,889 件～16,789 件であるのに対して、種雄牛では 22 件～65 件と少ないためである。また、ND においては、雌牛よりも種雄牛の方が回帰式の傾きが有意に高かった (t-test, $p < 0.05$)。この理由として、種雄牛の方が雌牛よりもキャリアが多いことが影響しているかもしれない。しかしながら、WS と TD は、種雄牛と雌牛の回帰式の傾きに有意差はなかった ($p > 0.05$) ことから、これまでの両者の選抜において性差はないことが示唆された。

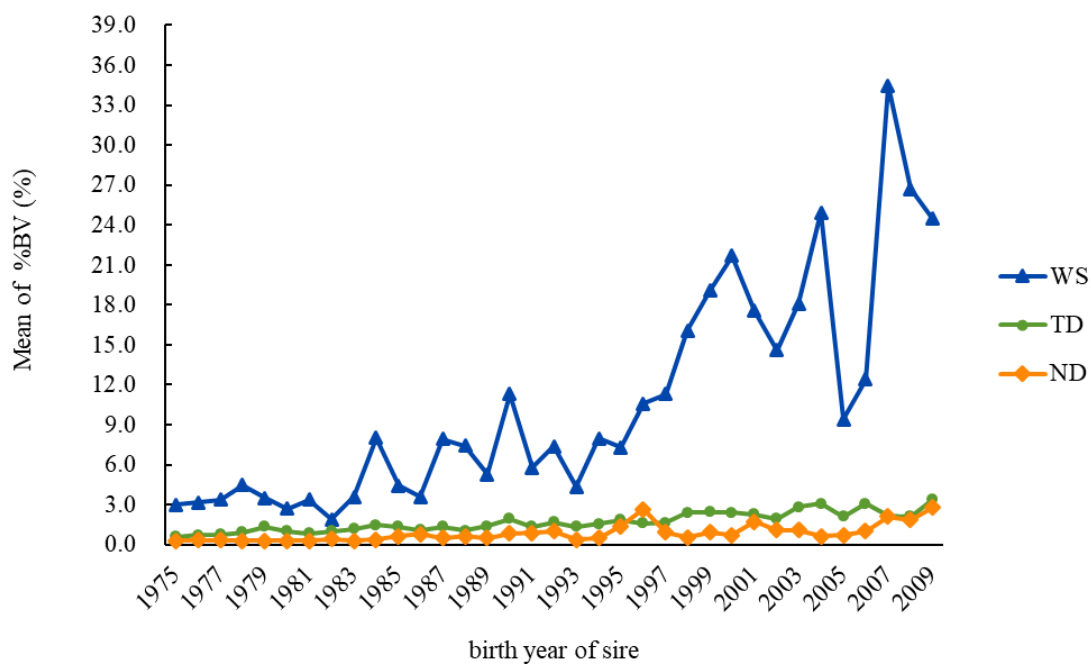


Figure 2-17 Estimated genetic trends of defective appearances in sires.

WS, white spotting. TD, tongue defect. ND, nipple defect.

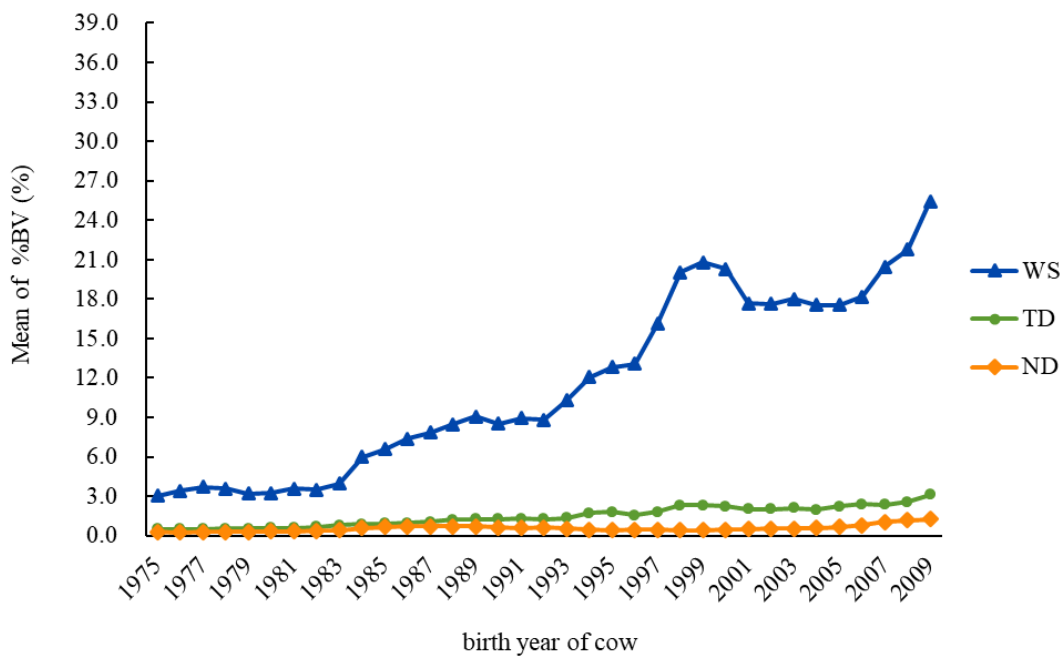


Figure 2-18 Estimated genetic trends of defective appearances in dams.

WS, white spotting. TD, tongue defect. ND, nipple defect.

3-4. 損徴間の関連性

損徴間の表型相関及び遺伝相関を Table 2-8 に示した。WS と TD の間の表型相関及び遺伝相関は、それぞれ 0.286 及び 0.463 と正の相関があり、最高事後密度区間 95% においてともに有意であったことから、両者の間に表型及び遺伝的な関連性が示された。小山ら (2017) は、WS と TD を併発した雌子牛の割合が全ての損徴の組み合わせの中で最も多かったことを報告した。さらに、WS と TD との関連については、和牛登録事務必携 (全国和牛登録協会, 2017) において「乳房部・恥骨部以外に白斑があるか、または甚だしい白角の場合にのみ舌色を検し」との記載があるように、両損徴の関連性が指摘されている。このことから、本研究でも同様の傾向が示された。他方、TD と ND の間の表型相関も最高事後密度区間 95% において有意であった。しかしながら、その相関係数は -0.027 とほぼ 0 だったことから、両者の関連性は非常に小さいことが推察された。

Table 2-8 Estimates of genetic (above diagonals) and phenotypic (below diagonals) correlations[†] among defective appearances.

Trait	WS	TD	ND
WS		0.463 ± 0.028 *	0.039 ± 0.040
		(0.408 - 0.518)	(-0.039 - 0.110)
TD	0.286 ± 0.008 *		-0.039 ± 0.052
	(0.271 - 0.301)		(-0.140 - 0.055)
ND	0.000 ± 0.014	-0.027 ± 0.013 *	
	(-0.028 - 0.026)	(-0.053 - -0.001)	

[†]Mean ± posterior SD. (a - b) shows 95% highest posterior density (HPD)

region,*95% HPD region does not include 0. WS, white spotting. TD, tongue defect.

ND, nipple defect.

4. 小括

黒毛和種で発生する損徴は、品種の特性を損なうのみならず、一部では繁殖農家へ経済的損失を与える不良形質である。本研究では、鹿児島県産黒毛和種の雌子牛で発生する損徴において、子牛検査時の記録 553,433 件を用いて遺伝的パラメータを推定した。なお、我々は損徴の中でも白斑 (WS)、舌の異常 (TD) 及び乳頭の異常 (ND) といった 3 種類の損徴に着目した。分散 (共分散) の推定には、複形質閾値モデルを用いて Gibbs sampling 法で推定した。さらに推定育種価は Van Tassell ら (2003) 及び Cole ら (2007) の方法を参考に %BV に変換した。

損徴における遺伝率は、0.76 (WS)、0.29 (TD) 及び 0.50 (ND) と中程度から高く推定されたことから、損徴の発生には遺伝的要因が大きく関与している可能性が示された。また、表型分散に対する繁殖農家分散の割合は、0.01 (WS)、0.15 (TD) 及び 0.01 (ND) と推定され、WS と ND はほとんど 0 であったことから、両者には繁殖農家の影響はほとんどないことが示された一方で、TD の発生には遺伝的な効果と繁殖農家の効果の両方が影響していることが示唆された。

父牛 (本データ中に後代を 20 頭以上生産しており、かつ推定育種価 (BV) の正確度が 0.90 以上の個体) における %BV の範囲は、WS、TD 及び ND でそれぞれ 0.0%~95.4% (n=214)、0.0%~34.2% (n=142) 及び 6.0%~99.6% (n=102) であり、母牛 (本データ中に自身の子牛検査時の記録のある個体) 17,449 頭における %BV の範囲は、WS、TD 及び ND でそれぞれ 0.0%~100.0%、0.1%~34.6% 及び 0.0%~31.9% だったことから、WS と TD は雌雄で同様の傾向があったものの、ND については、母牛より父牛の方が %BV の範囲が大きかった。これは、子牛検査において雌雄で乳徴の選抜圧が異なることが関係している可能性がある。さらに、上記の父牛の %BV とそれらの娘牛の平均損徴発生率との関係には、正の

線形の関係が認められた (t-test for regression coefficient: $p < 0.01$)。このことから、損徴のある種雄牛は基本的に選抜されないものの、各損徴の発生に関わるいくつかの遺伝子を保因している可能性が示唆された。

各損徴における繁殖農家の効果の幅は、1.14 (WS)、2.69 (TD) 及び 0.72 (ND) であり、繁殖農家分散を反映した結果となった。さらに、出生年季節の効果は、1988 年から 2015 年にかけて増加傾向を示し、我々の以前の報告と一致した (小山ら, 2017)。一方、子牛の近交係数及び分娩時母牛年齢の効果はごく小さいものであり、損徴の発生にはあまり影響しないことが示唆された。

種雄牛及び雌牛における各損徴の遺伝的趨勢は、全てにおいて有意に上昇している傾向が確認された (t-test for regression coefficient: $p < 0.01$)。

さらに、損徴間の相関では、WS と TD の間には正の遺伝相関及び表型相関が、TD と ND の間に負の表型相関が得られ、最高事後密度区間 95%において有意であった。

本研究における損徴のような、中程度から高い遺伝率を示す不良形質は選抜育種により減少させることができる。しかしながら、経済的損失の大きい経済形質とのバランスを考慮しつつ、損徴を減少させる必要がある。そのため、第 3 章において、白斑と黒毛和種の経済形質である枝肉形質との関連性を調査した。

第3章 鹿児島県産黒毛和種で発生する白斑と枝肉形質の

関連性の調査

1. 緒言

前章において、鹿児島県産黒毛和種で発生する損徴に関する遺伝的パラメータの推定について述べた。その結果、白斑の遺伝的趨勢は年々上昇傾向にあり、白斑は遺伝的改良が十分可能であることが示された。他方、家畜改良センター（2019）によると1985年から2013年にかけて、枝肉形質、ロース芯面積、バラの厚さ及びBMS No. の遺伝的趨勢は年々上昇傾向、皮下脂肪厚においては年々下降傾向にあることから、各形質とも概ね順調に改良が進んでいることを報告している。これらの報告を勘案すると、白斑と枝肉形質の間に遺伝的な関連性がある可能性が考えられるが、これまでに白斑と枝肉形質との間の関係について調査した事例がない。また、現行の黒毛和種の産肉能力の改良では、家畜改良増殖目標（農林水産省, 2015）において、能力に関する改良目標の中で脂肪交雑は現状維持との旨が記載されていることから、仮に白斑の発生と脂肪交雑を含む枝肉形質の発現に何らかの遺伝的な関連があれば問題であり、両者の関係について明らかにすることは重要である。

そこで本研究では、前章で用いた子牛データにおいてと畜情報を持つ個体を抽出し、鹿児島県産黒毛和種で発生する白斑と枝肉形質の関連性を検討した。

2. 材料及び方法

2-1. 供試材料

材料には、第2章で使用した子牛データ 771,830 件、及び鹿児島県農業協同組合連合会にて保存されている、2003年1月から2017年10月までの間にと畜された子牛データに含まれる個体 404,648 件における、枝肉記録を含むと畜情報（以下、枝肉データ）を用いた（Table 3-1）。

さらに、これらのうち、子牛データと枝肉データを併せ持つ個体は 119,534 件であり（以下、子牛-枝肉データ）、本分析では、枝肉形質として枝肉重量（以下、CW）、ロース芯面積（以下、REA）、バラの厚さ（以下、RT）、皮下脂肪の厚さ（以下、SFT）及びBMS No.（以下、BMS）の5形質を用いた。枝肉形質の基本統計量を Table 3-1 に、白斑の内訳を Table 3-2 に示した。

Table 3-1 Basic statistics of carcass traits.

Trait	Mean	SD	Min	Max
CW	420.9	47.4	274.9	688.1
REA	55.7	8.6	29.0	125.0
RT	7.4	0.8	4.4	12.8
SFT	2.9	0.8	0.2	7.5
BMS	5.5	2.1	1.0	12.0
SAM	29.0	1.5	20.4	42.0

CW, carcass weights. REA, rib eye area. RT, rib thickness. SFT, subcutaneous fat thickness. BMS, beef marbling standard. SAM, slaughter age in month. n = 119,534

Table 3-2 Data structure of calves for white spotting.

Trait	Normal calves	Defective calves	Incidence (%)
WS	115,315	4,219	3.66

WS, white spotting. n = 119,534

2-2. データの編集

白斑の有無は第2章と同様に2値の閾値形質とし、枝肉形質は連続形質として扱った。

次に、子牛一枝肉データ 119,534 件のうち、以下に該当する個体をデータカットの対象とした。なお、枝肉形質については、平均値±3SDを参考とした。

- ・ 出生時母牛年齢が1歳未満または18歳以上のもの。
- ・ 出生年月が50件未満のもの。
- ・ 生産頭数が20件未満の繁殖農家。
- ・ と畜年月が100件未満のもの。
- ・ と畜件数が50件未満のと畜場。
- ・ と畜月齢が25ヶ月齢未満または34ヶ月齢以上のもの。
- ・ 生産頭数が20件未満の肥育農家。
- ・ 後代頭数が10件未満の父牛（種雄牛）。

データカット後のデータ数は53,807件となり、枝肉形質及びと畜月齢の基本統計量をTable 3-3に、白斑の内訳をTable 3-4に示した。さらに、枝肉形質、本牛近交係数及びと畜月齢における分布と白斑の発生率の関係をFigure 3-1～3-7に示した。

Table 3-3 Basic statistics of carcass traits.

Trait	Mean	SD	Min	Max
CW	420.9	47.1	274.9	688.1
REA	55.8	8.4	30.0	117.0
RT	7.5	0.8	4.4	11.8
SFT	2.9	0.8	0.2	7.5
BMS	5.4	2.0	2.0	12.0
IBC	5.3	4.0	0.0	32.5
SAG	29.0	1.5	25.0	34.0

CW, carcass weights. REA, rib eye area. RT, rib thickness. SFT, subcutaneous fat thickness. BMS, beef marbling standard. IBC, inbreeding coefficient of calf. SAM, slaughter age in month. n = 53,807

Table 3-4 Data structure of calves for white spotting.

Trait	Normal calves	Defective calves	Incidence (%)
WS	52,113	1,694	3.25

WS, white spotting. n = 53,807

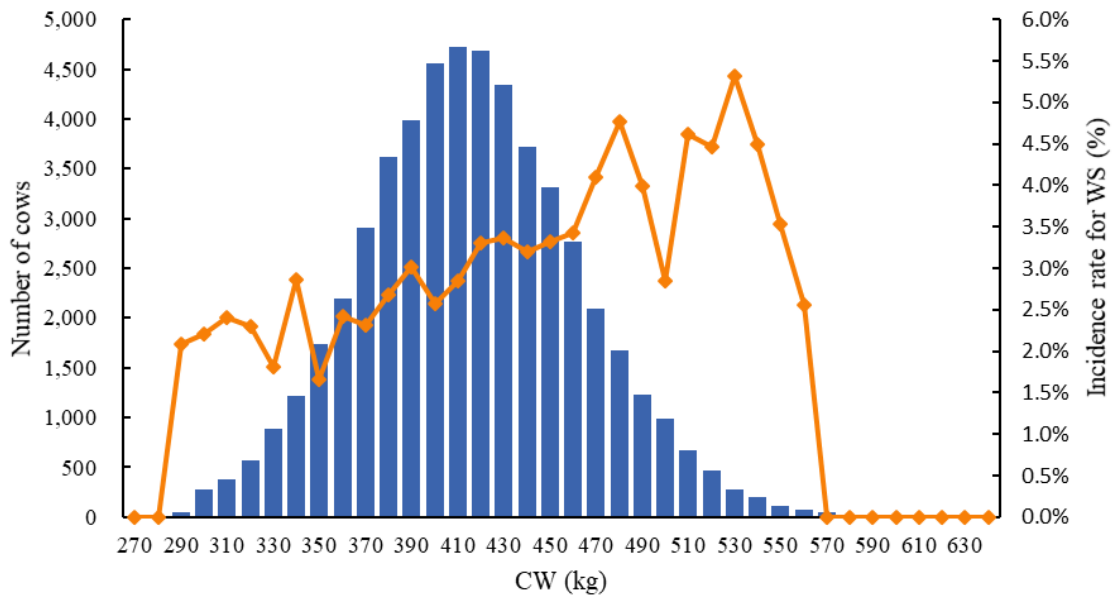


Figure 3-1 Distribution of carcass weight (CW).

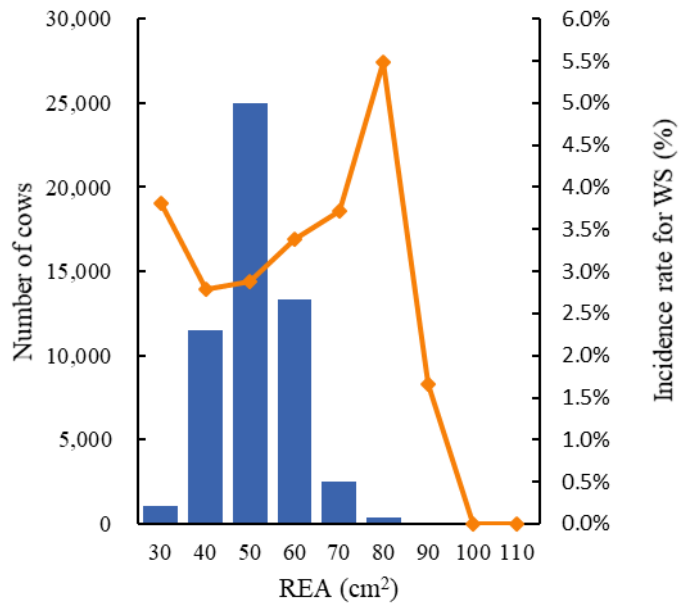


Figure 3-2 Distribution of rib eye area (REA).

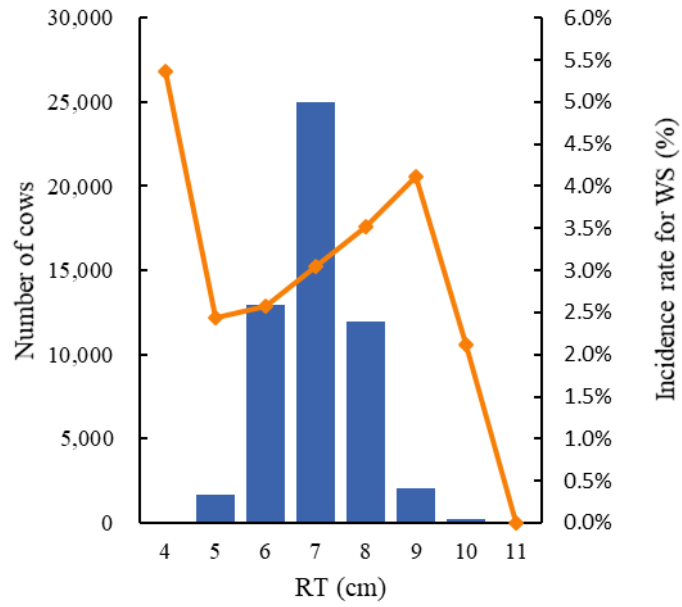


Figure 3-3 Distribution of rib thickness (RT).

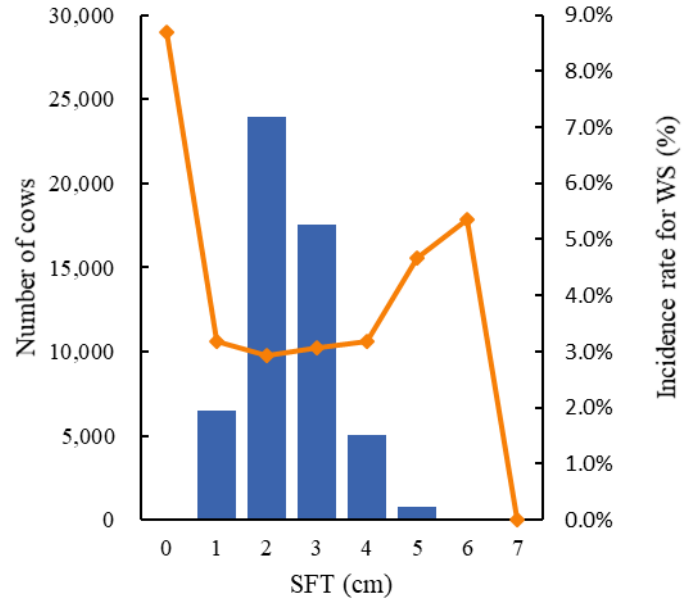


Figure 3-4 Distribution of subcutaneous fat thickness (SFT).

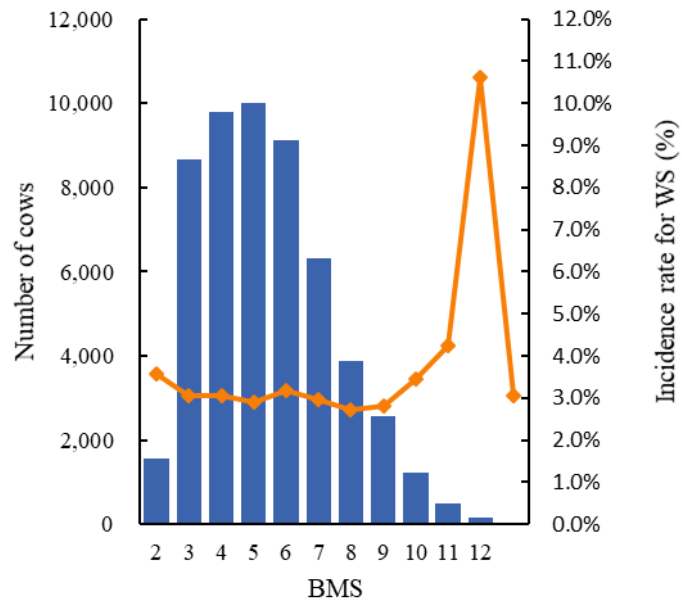


Figure 3-5 Distribution of beef marbling standard (BMS).

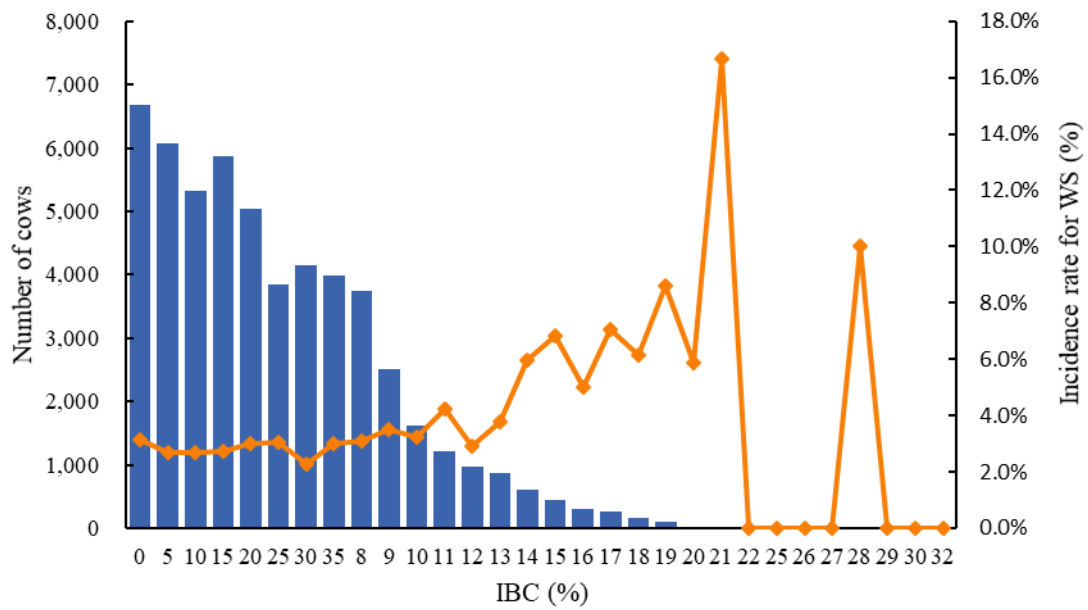


Figure 3-6 Distribution of inbreeding coefficient of calf (IBC).

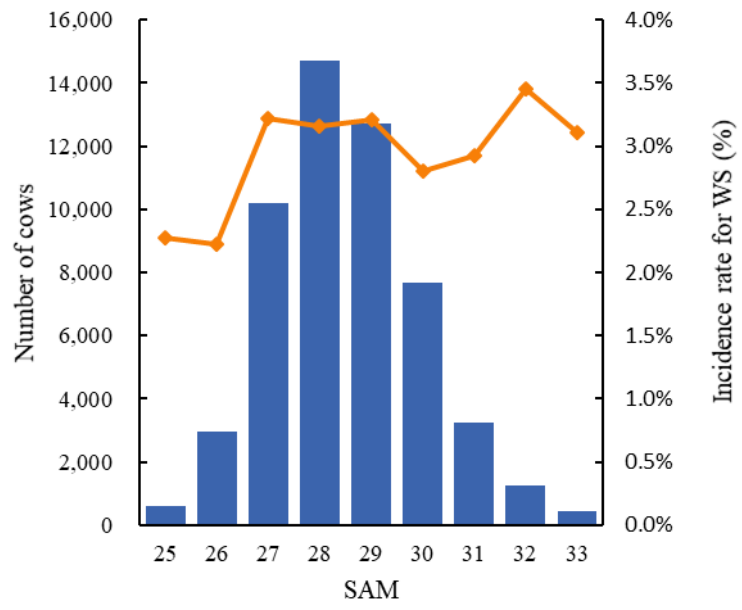


Figure 3-7 Distribution of slaughter age in month (SAM).

2-3.分析方法

分析には、複形質アニマルモデルを用いて遺伝的パラメータを推定した。なお、分析に用いたモデルは以下の通りである。

$$U_{ijkl} = \mu + BYM_i + RF_j + u_l + e_{ijkl}$$

$$V_{klmno} = \mu' + SYM_m + FF_n + b_{1.1} \cdot F_k + b_{2.1} \cdot SAM_o + b_{2.2} \cdot SAM_o^2 + v'_l + e'_{klmno}$$

$$Y_{ijkl} = \begin{cases} 0 & \text{if } U_{ijkl} \leq T \\ 1 & \text{otherwise} \end{cases}$$

ここで、 Y_{ijkl} はライアビリティ、 T は閾値、 U_{ijkl} は k 番目の雌個体における白斑の閾値記録、 V_{klmno} は k 番目の雌個体における枝肉形質の表型値、 μ 及び μ' は全平均、 BYM_i は i 番目の出生年月の母数効果、 SYM_m は m 番目のと畜年月の母数効果、 RF_j は j 番目の繁殖農家の変数効果、 FF_n は n 番目の肥育農家の変数効果、 F_k は k 番目の雌牛の近交係数、 SAM_o は o 番目のと畜月齢、 $b_{1.1}$ は雌牛の近交係数に対する 1 次偏回帰係数、 $b_{2.1}$ 及び $b_{2.2}$ はと畜月齢に対する 1 次及び 2 次偏回帰係数、 u_l は 1 番目の個体における白斑の相加的遺伝効果、 v_l は 1 番目の個体における枝肉形質の相加的遺伝効果、 e_{ijkl} 及び e'_{klmno} は残差を示す。

分析に用いた各効果の水準数を Table 3-5 に示した。なお、血統情報は 1975 年まで遡った。

Table 3-5 Levels of each effects.

Effect	Levels
Birth year-season	137
Reproductive farm	953
slaughter year-season	135
slaughter house	14
fattening farm	258
Pedigree information	159,252

また、推定育種価（EBV）の遺伝ベースは 2002 年に設定し、この年に生まれた雌子牛の EBV 平均値を 0 に置き換え、全個体における EBV から偏差を取った。

さらに、上記の遺伝ベース調整後の EBV を標準化育種価（SBV）に変換した。

$$SBV = EBV / SD$$

ここで、*SBV* は標準化育種価、*EBV* は遺伝ベース調整後の推定育種価、*SD* はベース年（2002 年）生まれの雌子牛の EBV の標準偏差を示す。

3. 結果及び考察

3-1. 分散成分推定値

推定された分散共分散成分の結果を Table3 -6 に示した。WS における繁殖農家分散は 0.03 であり、枝肉形質における肥育農家分散は CW、REA、RT、SFT 及び BMS でそれぞれ 597.91、6.40、0.13、0.05 及び 0.35 だった。遺伝分散は WS、CW、REA、RT、SFT 及び BMS でそれぞれ 3.71、1079.85、40.59、0.29、0.43 及び 2.75 であり、全ての形質において、農家分散（繁殖農家・肥育農家）より遺伝分散が大きかった。

遺伝率は WS、CW、REA、RT、SFT 及び BMS でそれぞれ 0.74、0.45、0.56、0.38、0.60 及び 0.68 であり、全ての形質において中程度から高い遺伝率が推定され、さらに最高事後密度区間 99% において有意だった (Table3 -7)。WS の遺伝率は前章と同程度だった。枝肉形質の遺伝率においてこれまでの報告と比較したところ、CW は、Oyama ら (1996) 及び大澤ら (2003) の報告 (0.44 及び 0.47) と同程度であったが、横田ら (2011) の報告 (0.68) より低かった。REA については、Oyama ら (1996) の報告 (0.54) と同程度であったが、大澤ら (2003) 及び横田ら (2011) の報告 (0.31 及び 0.37) より高かった。RT については、Oyama ら (1996)、大澤ら (2003) 及び横田ら (2011) の報告 (0.38、0.37 及び 0.40) と同程度であった。SFT 及び BMS においては、Oyama ら (1996)、大澤ら (2003) 及び横田ら (2011) の報告 (SFT : 0.50、0.32 及び 0.37、BMS : 0.50、0.57 及び 0.50) より高く推定された。

以上の結果より、WS、CW、REA、RT、SFT 及び BMS においては、過去の報告と比較して遺伝的パラメータに若干の変動はあるものの、同様の傾向があることが確認された。

Table 3-6 Variance components of WS and each carcass traits.

Trait	Variance							
	Farm		Genetic		Residual		Phenotypic	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
WS	0.33	2.05	3.71	1.26	1.00	0.01	5.04	2.60
CW	597.91	59.97	1079.85	51.57	731.61	33.66	2409.37	63.68
REA	6.40	0.68	40.59	1.80	25.13	1.17	72.12	1.00
RT	0.13	0.01	0.29	0.02	0.34	0.01	0.76	0.02
SFT	0.05	0.01	0.43	0.02	0.24	0.01	0.72	0.01
BMS	0.35	0.04	2.75	0.10	0.95	0.06	4.06	0.05

WS, white spotting. CW, carcass weights. REA, rib eye area. RT, rib thickness. SFT, subcutaneous fat thickness. BMS, beef marbling standard.

Table 3-7 Heritability of WS and carcass traits.

Trait	h^2		HPD 99%		<i>p</i>
	Mean	SD	Low	High	
WS	0.74	0.06	0.62	0.85	**
CW	0.45	0.02	0.40	0.50	**
REA	0.56	0.02	0.51	0.62	**
RT	0.38	0.02	0.33	0.43	**
SFT	0.60	0.02	0.55	0.66	**
BMS	0.68	0.02	0.63	0.73	**

WS, white spotting. CW, carcass weights. REA, rib eye area. RT, rib thickness. SFT, subcutaneous fat thickness. BMS, beef marbling standard. h^2 , heritability. (Low - High) shows 99% highest posterior density (HPD) region, **99% HPD region does not include 0.

3-2. 白斑と枝肉形質間の遺伝的趨勢

種雄牛及び雌牛における各形質の遺伝的趨勢を Figure 3-8 及び Figure 3-9 に示した。なお、これらは種雄牛及び雌牛の生年ごとの水準数が 20 件以上である 1969 年から 2009 年の間とした。種雄牛における遺伝的趨勢は、WS で-0.91～0.49、CW で-1.24～1.03、REA で-1.50～1.80、RT で-1.980～0.79、SFT で-0.32～0.95 及び BMS で-2.33～1.94、雌牛においては WS で-0.82～0.41、CW で-1.08～0.43、REA で-1.51～0.74、RT で-2.01～0.33、SFT で-0.01～0.91 及び BMS で-2.40～1.42 であった種雄牛及び雌牛の SFT 以外で有意に上昇しており、SFT では有意に減少傾向が見られた (t-test for regression coefficient: $p < 0.01$)。また、雌牛と比較して、種雄牛の回帰式が上下に変動している傾向が見られるが、これは生年ごとの水準数が雌牛では 15 件～4,030 件であるのに対して、種雄牛では 13 件～58 件と少ないためである。なお、各形質における決定係数 (R^2) は、種雄牛において、WS で 0.551、CW で 0.672、REA で 0.855、RT で 0.849、SFT で 0.843 及び BMS で 0.907 あり、雌牛において、WS で 0.859、CW で 0.827、REA で 0.834、RT で 0.911、SFT で 0.872 及び BMS で 0.845 だった。WS における遺伝的趨勢は前章 (第 2 章) と同様の傾向があった。枝肉形質においては、全国域での黒毛和種の種雄牛及び繁殖雌牛の遺伝的能力の推移について (家畜改良センター, 2019) と同様の傾向があり、黒毛和種における枝肉形質の遺伝的改良の推移が本研究の結果でも確認された。さらに、WS 及び SFT においては、種雄牛よりも雌牛の方が、REA 及び BMS においては、雌牛よりも種雄牛の方が回帰式の傾きが有意に高かった (t-test, $p < 0.05$)。

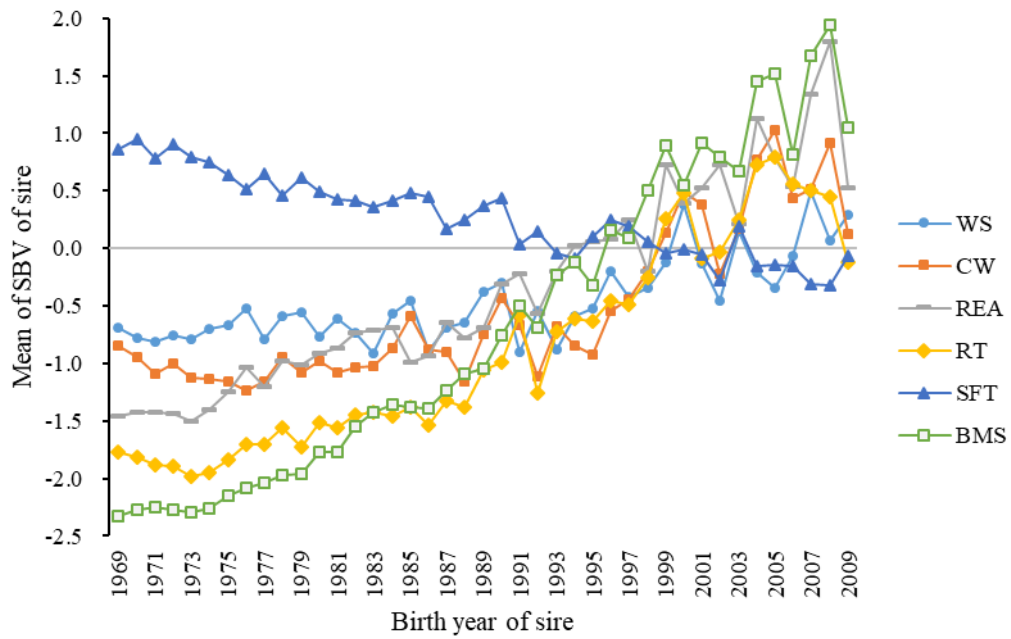


Figure 3-8 Estimated genetic trends of WS and carcass traits in sires.

WS, white spotting. CW, carcass weights. REA, rib eye area. RT, rib thickness. SFT, subcutaneous fat thickness. BMS, beef marbling standard.

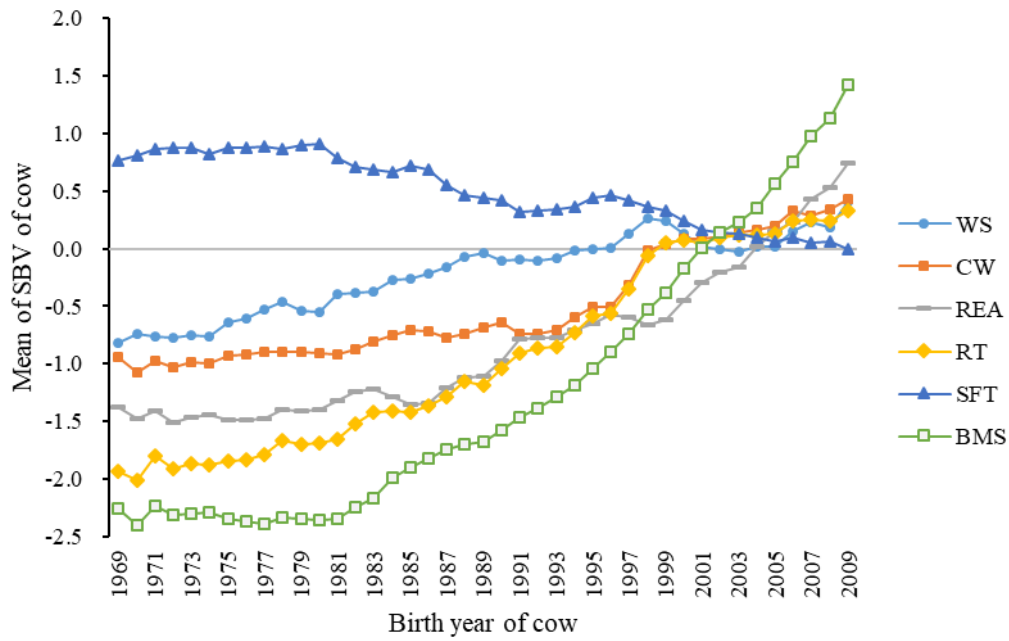


Figure 3-9 Estimated genetic trends of WS and carcass traits in cows.

WS, white spotting. CW, carcass weights. REA, rib eye area. RT, rib thickness. SFT, subcutaneous fat thickness. BMS, beef marbling standard.

3-3. 白斑と枝肉形質間の関連性

WS と枝肉形質 (CW、REA、RT、SFT 及び BMS) の間及び枝肉形質間の表型相関を Table 3-8 に、遺伝相関を Table 3-9 に示した。WS と枝肉形質の間の表型相関及び遺伝相関は、全ての組み合わせで無相関 (表型相関: -0.03~0.02、遺伝相関: -0.06~0.08) かつ有意ではなかった ($p < 0.05$)。したがって、両者の遺伝的趨勢からは遺伝的な関連性が示唆されたものの、本研究の結果、白斑の淘汰は枝肉形質に影響を与えないことが示された。

これまでの遺伝的不良形質と枝肉形質の関連性における報告では、子牛虚弱症候群の変異遺伝子をヘテロ型で持つ個体 (キャリア) は、正常ホモ型よりも枝肉重量及びバラの厚さが有意に小さくなり ($p < 0.05$)、モリブデン補酵素欠損症の変異遺伝子のキャリアは、正常ホモ型個体よりも BMS ナンバーが有意に低い ($p < 0.05$) と報告されている (藤田ら, 2004)。

次に、枝肉形質間の表型相関及び遺伝相関は、SFT-REA 間及び SFT-BMS 間では負の相関 (表型相関: 0.19~0.67、遺伝相関: 0.17~0.61)、それ以外の組み合わせでは正の相関 (表型相関: -0.01~-0.05、遺伝相関: -0.25~-0.12) が得られ、最高事後密度区間 99%は全ての組み合わせで有意であった。なお、枝肉形質間の相関についてこれまでの報告と比較したところ、表型相関では基本的に同程度を示したが、BMS と CW、REA 及び RT 間において Oyama ら (1996) らの報告より本研究の方が高く推定され、さらに、SFT-BMS 間のみ大澤ら (2003) の報告より本研究の方が低く推定された。枝肉形質間の遺伝相関では、CW-RT 間、CW-BMS 間及び SFT-BMS 間において過去の報告 (Oyama ら, 1996; 大澤ら, 2003) と同程度だったが、REA-BMS 間は本研究の方が高く、REA-SFT 間、RT-SFT 間及び RT-BMS 間では本研究の方が低く、CW-REA 間、CW-SFT 間及び REA-RT 間は Oyama ら (1996) らの報告より本研究の方が低く推定された。しかしなが

ら、相関係数の大きさに変動はあるものの、正負の関係はどの組み合わせにおいても、これまでの報告と同様の傾向を示したことから、本研究でも枝肉形質間の関連を確認することができた。

Table 3-8 Phenotypic correlations between WS and carcass traits.

Trait1	Trait2	r		HPD 99%		p
		Mean	SD	Low	High	
WS	CW	0.02	0.02	-0.03	0.06	
	REA	0.01	0.02	-0.03	0.06	
	RT	-0.01	0.02	-0.05	0.03	
	SFT	0.00	0.02	-0.04	0.05	
	BMS	-0.03	0.02	-0.07	0.01	
CW	REA	0.47	0.01	0.45	0.49	**
	RT	0.67	0.01	0.65	0.69	**
	SFT	0.31	0.01	0.28	0.33	**
	BMS	0.19	0.01	0.16	0.23	**
REA	RT	0.39	0.01	0.36	0.41	**
	SFT	-0.10	0.01	-0.12	-0.07	**
	BMS	0.48	0.01	0.46	0.50	**
RT	SFT	0.24	0.01	0.21	0.26	**
	BMS	0.33	0.01	0.31	0.36	**
SFT	BMS	-0.05	0.01	-0.08	-0.03	**

WS, white spotting. CW, carcass weights. REA, rib eye area. RT, rib thickness. SFT, subcutaneous fat thickness. BMS, beef marbling standard. r, correlation coefficient. (Low - High) shows 99% highest posterior density (HPD) region, **99% HPD region does not include 0.

Table 3-9 Genetic correlations between WS and carcass traits.

Trait1	Trait2	r		HPD 99%		p
		Mean	SD	Low	High	
WS	CW	-0.02	0.07	-0.22	0.16	
	REA	0.08	0.06	-0.08	0.24	
	RT	-0.06	0.07	-0.24	0.14	
	SFT	-0.01	0.06	-0.16	0.16	
	BMS	-0.05	0.05	-0.17	0.08	
CW	REA	0.37	0.03	0.30	0.43	**
	RT	0.61	0.02	0.55	0.67	**
	SFT	0.21	0.03	0.13	0.29	**
	BMS	0.17	0.03	0.09	0.24	**
REA	RT	0.27	0.03	0.18	0.35	**
	SFT	-0.25	0.03	-0.33	-0.17	**
	BMS	0.56	0.02	0.50	0.61	**
RT	SFT	0.18	0.03	0.09	0.27	**
	BMS	0.36	0.03	0.29	0.44	**
SFT	BMS	-0.12	0.03	-0.19	-0.05	**

WS, white spotting. CW, carcass weights. REA, rib eye area. RT, rib thickness. SFT, subcutaneous fat thickness. BMS, beef marbling standard. r, correlation coefficient. (Low - High) shows 99% highest posterior density (HPD) region, **99% HPD region does not include 0.

4. 小括

本研究では、白斑の淘汰による枝肉形質の影響について明らかにすることを目的として、鹿児島県産黒毛和種の雌子牛で発生する白斑と枝肉形質の関連性について調査した。分散（共分散）成分の推定には、複形質アニマルモデルを用いて Gibbs sampling 法で推定した。さらに推定育種価（EBV）は標準化育種価（SBV）に変換した。

子牛検査時及びと畜時の記録を併せ持つ、53,807 件のデータを用いて遺伝的パラメータを推定した結果、遺伝率は WS、CW、REA、RT、SFT 及び BMS でそれぞれ 0.74、0.45、0.56、0.38、0.60 及び 0.68 であり、全ての形質において中程度から高い遺伝率が推定され（最高事後密度区間 99%）、WS については第 2 章と同程度、枝肉形質については過去の報告（Oyama ら, 1996; 大澤ら, 2003; 横田ら, 2011）と比較して遺伝的パラメータに若干の変動はあるものの、推定育種価等を用いた遺伝的改良は十分可能であることが示唆された。

種雄牛及び雌牛における各形質の遺伝的趨勢は、SFT 以外で有意に上昇しており、SFT では有意に減少傾向が見られたことから (t-test for regression coefficient: $p < 0.01$)、黒毛和種における枝肉形質の遺伝的改良の推移が本研究の結果でも確認された。WS と枝肉形質（CW、REA、RT、SFT 及び BMS）の間の表型相関及び遺伝相関は、全ての組み合わせで無相関（表型相関：-0.03～0.02、遺伝相関：-0.06～0.08）と推定されたことから、白斑の淘汰は枝肉形質に影響を与えないことが確認できた。また、枝肉形質間の表型相関及び遺伝相関は、SFT-REA 間及び SFT-BMS 間では負の相関（表型相関：0.19～0.67、遺伝相関：0.17～0.61）、それ以外の組み合わせでは正の相関（表型相関：-0.01～-0.05、遺伝相関：-0.25～-0.12）が得られ、全ての組み合わせで有意であった（最高事後密度区間 99%）。

第 4 章では、白斑に発生についてさらに調査するために、近年、欧米品種にお

いて白斑の有無と関連があると報告されている (Fontanesi ら, 2012)、*MITF* (*microphthalmia-associated transcription factor*) 遺伝子の変異が黒毛和種でも存在することを確認した上で、白斑の有無との関連性を検討し、さらにゲノムワイド関連解析によって、白斑発生に関連する候補 SNP を探索した。

第4章 黒毛和種で発生する白斑における分子遺伝学的研究

1. 緒言

黒毛和種は、被毛がわずかに褐色をおびた黒である、有角である等いくつかの外貌的特徴を持つわが国固有の品種である。しかしながら、その中には外貌的特徴を損なう損徴（外貌的欠陥）が発生する場合がある。損徴は黒毛和種としての品種の特性を損なうものであり、和牛登録事務必携(全国和牛登録協会, 2017)において具体的に規定され、淘汰されている。

白斑とは被毛の一部が白毛となり、さらに白毛部分の皮膚がピンク色を呈する外貌的特徴であるが、我が国の在来牛である口之島野生化牛や過去の絵画にも白斑個体が認められる（Kawahara-Miki ら, 2011）ように、元々の在来牛が持っていた形質だと考えられる。しかしながら、我が国の肉用種における白斑は損徴の1つと扱われて失格となる基準が設けられ、白斑個体の一部が淘汰されるようになってきている。これは、当時多様だった外貌的特徴を統一し、和牛品種を造成することを目的としたものであり、鹿児島県では1924年に制定された鹿児島県役肉用牛標準体型に記載があり（全国和牛登録協会鹿児島県支部, 1989）、全国的には1940年に中央畜産会が始めた登録事業から開始された（家畜登録団体中央協議会, 1980）。1948年からは全国和牛登録協会が一元的に行うようになり、現在に至っている。

現在、白斑を持つ黒毛和種は、生後4ヶ月までに行われる子牛検査や、オスでは12～30ヶ月齢未満、メスでは14～30ヶ月齢未満に行われる登録審査時に記録され、その発生部位や大きさによっては失格として扱われる（全国和牛登録協会, 2017）。失格個体は子牛登記証明書や登録証明書が発行されず、繁殖供用されない。そのため、白斑の発生は黒毛和種としての品種の特性を損なうだけでなく、

その一部では経済的損失をもたらす。小山ら (2017) は、鹿児島県産黒毛和種の雌子牛で発生する白斑について調査し、その発生率は年々増加傾向であること、白斑を持つ母牛は白斑の無いものよりも子牛の白斑発生率を有意に増加させることを報告した。このことから、黒毛和種で発生する白斑は完全には制御できていないという問題があるとともに、今後も白斑個体が増加する危険性を示唆している。また、前章において、黒毛和種で発生する白斑の遺伝率は 0.76 と推定されたことから、白斑の遺伝的改良は十分可能であり (第 2 章)、さらに、第 3 章において、白斑の発生と枝肉形質 (枝肉重量、ロース芯面積、バラの厚さ、皮下脂肪の厚さ及び BMS No.) との関連を調査した結果、両者の間には遺伝的な関連はなかったため、白斑を淘汰しても枝肉形質へ影響しないことが示された。しかしながら、黒毛和種の白斑発生に関わる原因遺伝子に関する報告は見当たらない。そのため、白斑発生を支配する遺伝子変異の探索は、黒毛和種の生産や改良において意義のあるものだと考えられる。

黒毛和種のような単色品種の白斑の発生は、ホルスタインで見られる白斑を支配する劣性の白斑遺伝子 *s* に支配されているとされるものの、例外も多くみられると報告されている (Olson, 1999)。これまでの報告 (小山ら, 2017) でも、白斑のない両親から生まれた後代が白斑を持っている場合があったことから、黒毛和種の白斑発生にも劣性遺伝子が関与している可能性を示唆している。最近、白斑の有無に関与する分子遺伝学的知見がいくつか得られている (Fontanesi ら, 2010, 2012; Olson, 1999; Ruvinsky, 2012)。その中で、Fontanesi ら (2012) はウシ第 22 染色体にある *MITF* 遺伝子の塩基配列を白斑の有る品種 (イタリアンホルスタイン、イタリアンシンメンタール) と白斑の無い単色種 (イタリアンブラウン及びレジーナ) との間で比較し、イントロン 1M にある g.32386957 (A>T) という SNP が白斑の有無に最も有意に関連することを報告した。*MITF*

(*microphthalmia-associated transcription factor*) 遺伝子は神経堤由来のメラノサイトと脳由来の網膜色素上皮細胞の分化制御に関わる機能遺伝子である (柴原 2008)。また、マウス、ラット及びイヌなどでは本遺伝子の変異によりメラニン細胞の不良を引き起こすことが知られている (Steingrimsso ン ら, 2004; Levy ン ら, 2006; Opdecamp ン ら, 1998; Rothschild ン ら, 2006; Karlsson ン ら, 2007)。本遺伝子の変異は、ヒトやフェレットで皮膚の白斑や白髪といった症状を引き起こす遺伝子疾患である、ワーデンブルグ症候群タイプ 2A の原因遺伝子の 1 つであるという報告があり (Tassabehji ン ら, 1994; Nobukuni ン ら, 1996)、ウシのフレックフィー種で発生するジャーマンホワイトフレックフィー症候群にも関連する (Philipp ン ら, 2011)。しかしながら、これまでに黒毛和種のような単色種で発生する白斑の有無と *MITF* 遺伝子の変異との関連性を調査した報告は見当たらない。そこで本研究では、まず、① *MITF* 遺伝子上の当該変異が黒毛和種でも存在するか確認し、その遺伝子型と白斑の有無との関連性を検討した。次に、② 全染色体において、網羅的に遺伝子多型を解析することのできるゲノムワイド関連解析 (GWAS) を行い、白斑の発生に関与する候補 SNP を探索した。

2. 材料及び方法

2-1. 供試試料

① *MITF* 遺伝子の調査には、鹿児島県産黒毛和種における牛肉サンプル（17 個体）及び鹿児島県内の農場で採材した鼻腔粘膜サンプル（62 個体）を含む全 79 個体を供した。全 79 個体における白斑の有無は、有 38 個体及び無 41 個体であり、牛肉サンプルにおける白斑の有無は有 7 個体及び無 10 個体、鼻腔粘膜サンプルの白斑の有無は有 31 個体及び無 31 個体だった（Table 4-1）。

Table 4-1 Structure of samples ①

Samples	Non-spotted	Spotted	Total
Muscle	10	7	17
Swab of nasal cavity	31	31	62
Total	41	38	79

② GWAS には、①の結果、*MITF* 遺伝子の当該変異がヘテロ型（TA 型）と判定された 38 個体（白斑群：19 個体、正常群：19 個体）及び、家畜改良センターの肉用牛関係 4 牧場（十勝、奥羽、鳥取、宮崎）における繋養牛 81 個体（白斑群：22 個体、正常群：59 個体）におけるゲノム DNA を用いた（Table 4-2）。なお、これ以降、前者を鹿児島サンプル、後者を NLBC サンプルとする。

Table 4-2 Structure of samples ②

Samples	Non-spotted	Spotted	Total
Kagoshima	19	19	38
NLBC	22	59	81
Total	41	78	119

2-2. ゲノム DNA 抽出方法

2-2-1. 牛肉サンプル

鹿児島県産黒毛和種牛肉サンプルにおける DNA 抽出には、DNeasy® Blood & Tissue Kit（株式会社キアゲン、東京）を用いた。

2-2-2. 鼻腔粘膜サンプル

鹿児島県産黒毛和種鼻腔粘膜サンプルにおける DNA 抽出には、フェノール法を用いた。

2-3. ダイレクトシーケンス法

2-2-1において抽出した、黒毛和種牛肉サンプル由来のゲノム DNA から、ダイレクトシーケンス法を用いて当該変異の確認と遺伝子型を決定した。当該変異を含むイントロン 1 M 領域 374 bp の PCR 増幅とダイレクトシーケンス反応に用いたプライマーは、MITF-Int1MF2 : 5'-

GAGAATACAGCCATGCACAAGA-3' と MITF-Int1MR2 : 5'-

TGTCTCGGGACACCTTGTTTA-3' である。PCR 増幅は TaKaRa Ex Taq® (タカラバイオ株式会社、大津) を用いて、反応液は指定された手順にしたがって総量 50 µl に調整した。PCR は Veriti 96-Well Thermal Cycler (サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社、東京) で行った。反応条件は 95.0°C で 1 分間の加熱変性後、変性温度 95.0°C で 15 秒間、アニーリング温度 60.0°C で 30 秒間、伸長温度 72.0°C で 30 秒間の 1 サイクルを 35 回繰り返し、最後に 72°C で 5 分間の伸長反応を行った。得られた PCR 産物は 2% アガロースゲルで確認後、Viogene Gel/PCR DNA Isolation System (ナカライテスク株式会社、京都) を使って抽出した。

ダイレクトシーケンス反応には BigDye® Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit と BigDye® Xterminator Purification™ Kit (いずれもサーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社、東京) を用いて指定された手順にしたがって行った。解析は ABI PRISM 3500xl Genetic Analyzer (ライフテクノロジーズジャパン株式会社、東京) で行った。得られた各個体の塩基配列は Clustal W プログラム (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) を用いて整列させ、当該変異の有無を確認し、遺伝子型を決定した。

2-4. 対立遺伝子特異的 PCR 法 (AS PCR)

AS PCR は 1 個体につき対立遺伝子毎に分けて 2 回行った。AS PCR に用いたプライマーは、対立遺伝子 T では特異的プライマー T_s-allele-Fa : 5'-TTTCAGTTGGTACGTGTCTTaCTA-3' と共通のプライマーとして MITF-Int1MR2 を、対立遺伝子 A では特異的なプライマーとして A_s-allele-Fa : 5'-TTCAGTTGGTACGTGTCTTaCTT-3' と共通のプライマーとして MITF-Int1MR2 を用いた。なお、特異的プライマーの 3' 末端側 4 塩基目にある小文字部分は特異的検出を可能とするためのミスマッチ塩基である。また、PCR 増幅の失敗による対立遺伝子の未検出を避けるために、 κ -Casein 遺伝子断片も同じ反応系で増幅させた。これらのプライマーは、cattle_K-Kasein-F: 5' - TGTGCTGAGTAGGTATCCTAGTTATGG -3', cattle_K-Kasein-R: 5' - GCGTTGTCTTCTTTGATGTCTCCTTAG-3' を使った。AS PCR の反応液は TaKaRa Ex Taq® を 0.5 units、10× Ex Taq buffer (Mg²⁺ plus) を 2.0 μ l、2.5 mM dNTPs を 1.6 μ l、各プライマー (MITF 用 2 種と κ -Casein 用 2 種) を 5 pmoles 及びゲノム DNA を 60 ng であり、総量が 20 μ l となるように超純水で調整した。反応条件は、95.0°C で 60 秒間の熱変性後、95.0°C で 15 秒間、アニーリング温度 60.0°C で 30 秒間、伸長温度 72.0°C で 30 秒間の 1 サイクルを 27 回繰り返す、最後に 72.0°C で 5 分間の伸長反応を行った。なお、陽性対照としてすでに遺伝子型判定された個体のものも同時に解析した。得られた PCR 産物を 3% のアガロースゲルを用いて電気泳動を行い、対立遺伝子毎に増幅産物の有無から当該変異の遺伝子型を決定した。

2-5. SNP チップを用いたジェノタイピング

解析に用いた SNP チップは、鹿児島サンプル及び NLBC サンプルでそれぞれ、GeneSeek 社の Bovine50K Chip (以下、GGP-50K) 及び Illumina 社の BovineSNP50 v2 BeadChip (以下、Illumina-50Kv2) だった。なお、これらの SNP チップに含まれる SNP 数は、49,463 SNPs (GGP-50K) 及び 54,609 SNPs (Illumina-50Kv2) だった。

2-6. クオリティーコントロール

各 SNP チップで判定された 2-5 の SNP のうち、29 本の常染色体に位置づけられており、かつ以下の条件を全て満たした 40,673 SNPs (GGP-50K) 及び 46,164 SNPs (Illumina-50Kv2) を抽出した。

- ・コールレート (遺伝子型判定の成功割合) > 0.95
- ・マイナーアレル頻度 (MAF) > 0.01
- ・ハーディ・ワインベルク平衡 (ある集団 *において、対立遺伝子頻度が世代を通じて変化しないという状態) > 0.001

*集団のサイズが十分に大きく、無作為交配が行われ、他集団との間に交流 (移動、導入) がなく、遺伝子の選抜、淘汰及び突然変異が生じない理想的な集団のこと。

2-7. 統計解析

- ① ダイレクトシーケンスもしくは **AS PCR** によって得られた遺伝子型を白斑群 38 個体及び正常群 41 個体に分け、独立性のカイ二乗検定を用いて両群間の遺伝子型構成を検定した。

- ② 鹿児島サンプル (**GGP-50K**) 及び **NLBC** サンプル (**Illumina-50Kv2**) それぞれにおいて、独立性のカイ二乗検定による **GWAS** を行った。なお、分析には **PLINK** (Purcell ら, 2007)を用いた。

3. 結果及び考察

3-1. ダイレクトシーケンス法による *MITF* 遺伝子の変異の確認

ダイレクトシーケンス法によって当該領域の塩基配列を決定した結果、黒毛和種においても欧米品種と同様に *MITF* 遺伝子における g.32386957 の A から T への SNP が確認された (Figure 4-1)。

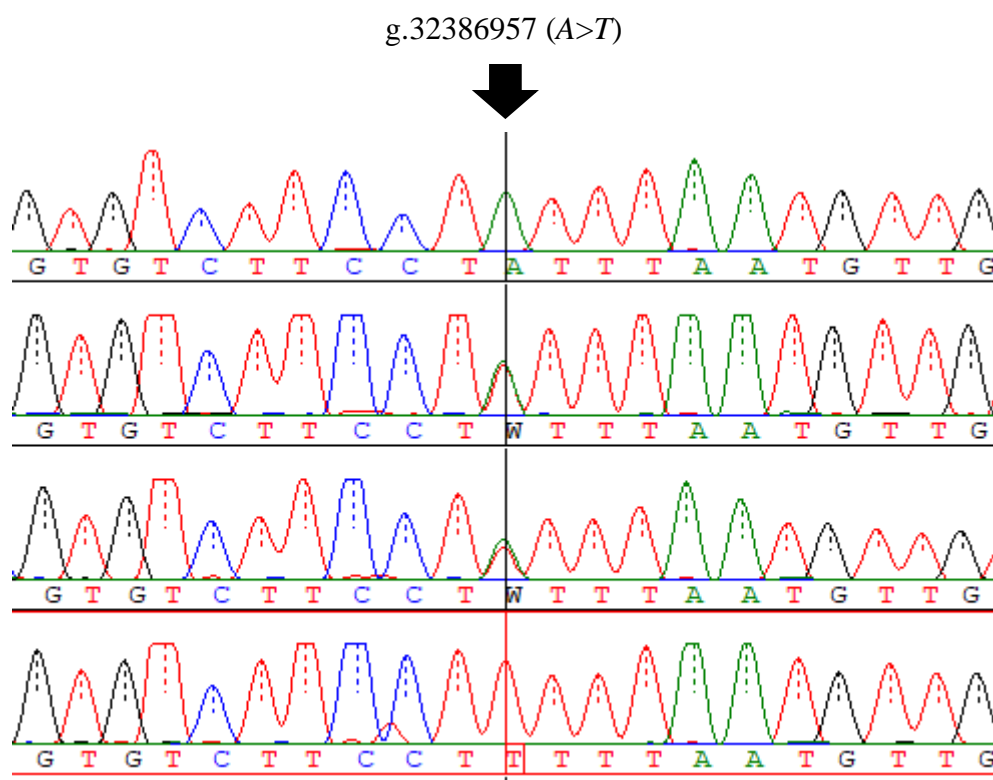


Figure 4-1 Electropherogram of the g.32386957 (A>T) of the *MITF* intron 1M.

Position of the g.32386957 (A>T) SNP was shown by an arrow.

3-2. AS PCR による *MITF* 遺伝子の変異の確認

AS PCR 及び電気泳動によって対立遺伝子毎に検出を試みた結果、正確に対立遺伝子が検出され、2回の PCR により当該 SNP の遺伝子型を判定できた (Figure 4-2)。

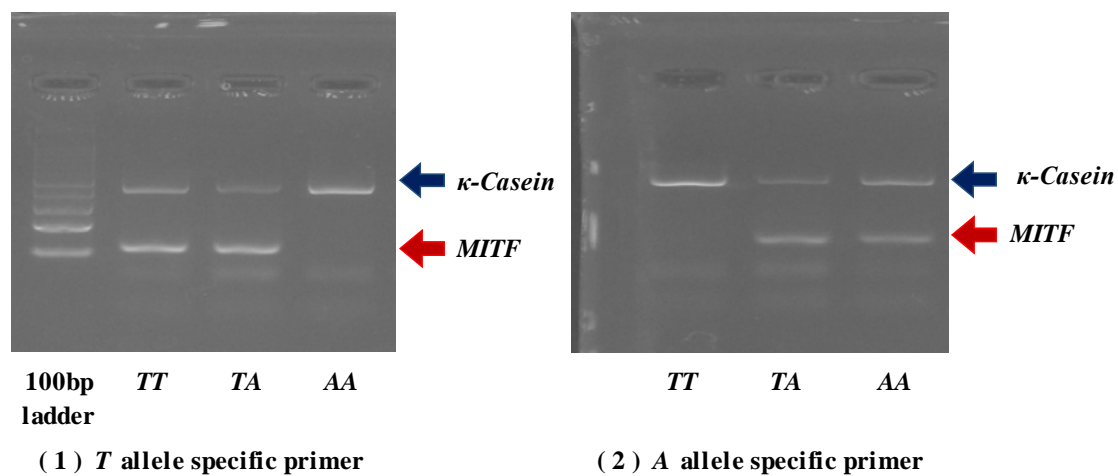


Figure 4-2 Results of allele-specific PCR (AS PCR).

κ -Casein: κ -Casein gene fragment

3-3. 黒毛和種集団の遺伝子型の確認

MITF 遺伝子における g.32386957 (A>T) の変異について、遺伝子型を決定した結果を Table 4-3 に示す。本研究で確認された鹿児島県産黒毛和種全 79 個体における各遺伝子型の観察数は、*TT* 型、*TA* 型及び *AA* 型でそれぞれ 23 個体、38 個体及び 18 個体であった。なお、ダイレクトシーケンス法を用いた 17 個体の遺伝子型は *TT* 型、*TA* 型及び *AA* 型でそれぞれ 1 個体、13 個体及び 3 個体であり、AS PCR で判定された 62 個体では、それぞれ 22 個体、25 個体及び 15 個体であった。さらに、群別で遺伝子型を集計したところ、正常群では *TT* 型、*TA* 型及び *AA* 型がそれぞれ 20 個体、19 個体及び 1 個体、白斑群では、それぞれ 3 個体、19 個体及び 17 個体であった。これらから対立遺伝子頻度を算出した結果、正常群で対立遺伝子 *A* 及び *T* の頻度はそれぞれ 0.738 及び 0.263、白斑群で 0.321 及び 0.679 であり、正常群では *T*、白斑群では *A* の対立遺伝子頻度が高かった。これは、Fontanesi ら (2012) の報告と同様の結果となった。さらに、両群間の遺伝子型構成についてカイ二乗検定を試みたところ、高度な有意差 ($p=1.53\times 10^{-6}$) が確認されたことから、欧米品種 (Fontanesi ら, 012) と同様に、*MITF* 遺伝子における g.32386957 の *A* から *T* への変異が、黒毛和種における白斑発生にも強く関連することが示された。しかしながら、黒毛和種の白斑を劣性白斑と仮定すると、本研究では正常群において *AA* 型が 1 個体、白斑群において *TT* 型が 3 個体及び *TA* 型が 19 個体得られ、表現型と遺伝子型が一致しない例外が多数認められた。このことは、当該変異だけでは黒毛和種の白斑発生のすべてを説明できないことも示された。Fontanesi ら (2012) は、*MITF* 遺伝子の変異と白斑の有無との関係に例外が見られることを言及しており、本研究の知見はこのこととも一致した。

一般的に、白斑の有無は質的遺伝、発生した白斑の大きさ (量) は量的遺伝を示

すように、白斑には両方の遺伝様式が関わることが知られている。また、これまでの白斑の淘汰は、審査標準の中では牛を望見した際に、その白斑が明らかであるか否かによって失格あるいは減率加算として扱われている。したがって、正常群で得られた AA 型個体では白斑の遺伝子をホモ型で有するが、その大きさが微小あるいはほとんど発現しないような遺伝子の組み合わせになっていたために白斑が観察されなかったのかもしれない。しかしながら、白斑群で得られる TT 型と TA 型個体はその仮説では説明できない。欧米品種では、*KIT* 遺伝子 (*the v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog*) の変異も白斑の発現に関連することや (Fontanesi ら, 2010; Ruvinsky, 2012)、*MITF* 遺伝子、*KIT* 遺伝子及び *paired box 5 (PAX5)* 遺伝子が白斑の量に関わる主働遺伝子であることを報告している (Hayes ら, 2010)。今後はこれらの遺伝子の変異と白斑の有無との関連性についても検討する必要があると考えられる。

Table 4-3 Genotype and allele frequencies of the g.32386957 (A>T)

Group	Number of samples	Genotype frequency			Allele frequency	
		<i>TT</i>	<i>TA</i>	<i>AA</i>	<i>T</i>	<i>A</i>
Non-spotted	40	20	19	1	0.738	0.263
Spotted	39	3	19	17	0.321	0.679
Total	79	23	38	18	0.532	0.468

Chi-square=26.779 ($p = 1.53 \times 10^{-6}$)

3-4. GWAS による候補 SNP の探索

黒毛和種で発生する白斑について、鹿児島サンプル及び NLBC サンプルを用いて GWAS を行った結果を Figure 4-3 及び Figure 4-5 に示した。鹿児島サンプル (Figure 4-3) は、*MITF* 遺伝子の遺伝子型を全て *TA* 型に固定させたため、第 22 番染色体上に有意な候補 SNP は得られなかったが、*TA* 型に固定していない NLBC サンプルにおいては、有意ではないものの、関連が疑われる SNP が得られた (Figure 4-4)。さらに、NLBC サンプルにおいては、第 19 番染色体及び第 25 番染色体においても、有意ではないものの、関連が疑われる SNP が検出された (Figure 4-4)。しかしながら、いずれのサンプルにおいても白斑発生に関与する候補 SNP は得られなかった。これは、両サンプルにおけるサンプル数 (鹿児島サンプル : 38 個体、NLBC サンプル 81 個体) が少ないことが原因である可能性がある。そのため、今後はさらにサンプルを追加した上で、再度分析する必要がある。

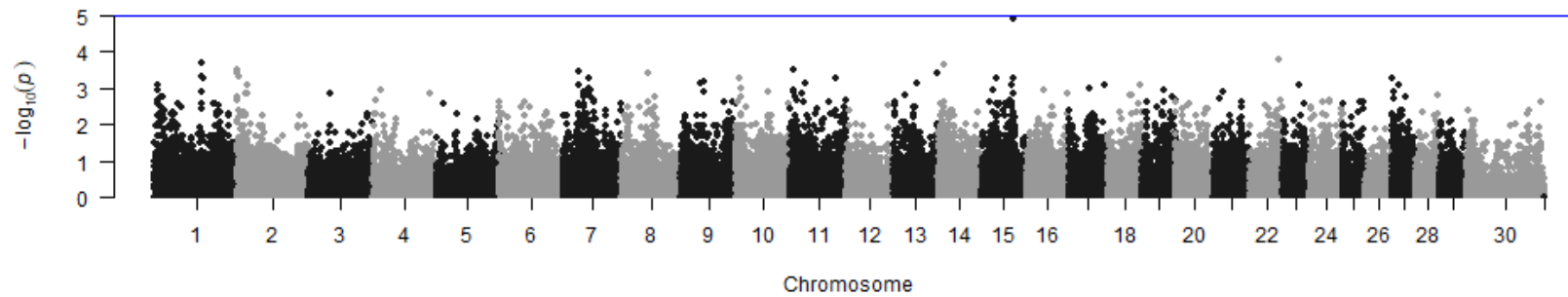


Figure 4-3 Manhattan plot of GWAS for white spotting of Japanese Black cattle by using Kagoshima samples (40,673 SNPs). The x-axis indicates the chromosome no., and the y-axis indicates $-\log_{10}(p)$ -value). Dashed line indicates not significance level but some relations.

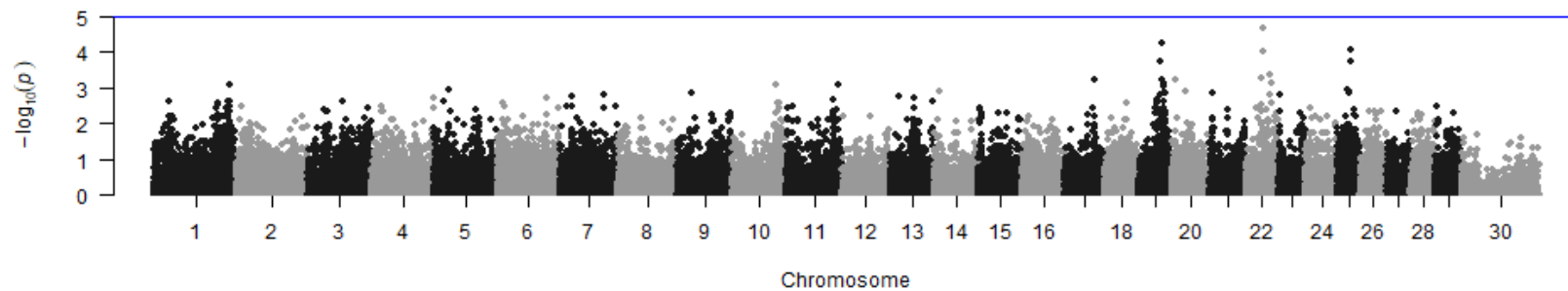


Figure 4-4 Manhattan plot of GWAS for white spotting of Japanese Black cattle by using NLBC samples (46,164 SNPs). The x-axis indicates the chromosome no., and the y-axis indicates $-\log_{10}(p)$ -value). Dashed line indicates not significance level but some relations.

4. 小括

黒毛和種で発生する白斑は、品種の特性に負の影響を与え、一部で繁殖農家にとって経済的損失にもつながる損徴の1つである。本研究では、① Fontanesi ら (2012) によって西欧品種で白斑の有無と関連があると報告された *MITF* 遺伝子の変異 (g.32386957 A>T) が黒毛和種でも存在することを確認し、白斑の有無との関連性を検討し、さらに、②GWAS によって白斑発生に関する候補 SNP を探索した。

①材料には、鹿児島県産黒毛和種 79 個体（正常群：40 個体、白斑群：39 個体）のゲノム DNA を供した。分析には、ダイレクトシーケンス法及び対立遺伝子特異的 PCR 法 (AS PCR) により当該変異の確認及び遺伝子型判定を行った。その結果、黒毛和種でも当該変異の存在を確認できた。さらに、これらを白斑群と正常群に分け、遺伝子頻度についてカイ二乗検定を試みた結果、両群間の遺伝子型構成に高度な有意差があり ($p = 1.53 \times 10^{-6}$)、当該変異が黒毛和種の白斑の有無にも強く関連することを示した。しかし、一部で例外が確認されたことから、当該変異だけでは白斑発生の全てを説明できないことも示唆された。

② 材料には、①のうち *MITF* 遺伝子が TA 型であった 38 個体（正常群：19 個体、白斑群：19 個体）及び家畜改良センター繋養牛 81 個体（正常群：22 個体、白斑群：59 個体）を供した。分析には、カイ二乗検定による GWAS によって候補遺伝子を探索した。その結果、白斑発生に関与する候補 SNP は得られなかった。この原因として、分析に用いたサンプル数が少ないことが考えられた。

欧米品種では、*KIT* 遺伝子の変異も白斑の発現に関連することや (Fontanesi ら, 2010; Ruvinsky, 2012)、*MITF* 遺伝子、*KIT* 遺伝子及び *PAX5* 遺伝子が白斑の量に関わる主働遺伝子であることを報告している (Hayes ら, 2010)。今後はこれらの遺伝子の変異と白斑の有無との関連性についても検討する必要があると考えら

れる。さらに、サンプル数を増やした上で、再度 GWAS を行い、候補 SNP を探索する必要がある。

第5章 鹿児島県産黒毛和種で発生する死産に関する遺伝的

パラメータの推定

1. 緒言

緒論

近年、黒毛和種の繁殖雌牛の減少に伴う子牛の生産頭数の減少とそれによる子牛価格の高止まりが起こっている。そのため、子牛生産性の向上を図る目的として、黒毛和種の繁殖能力の向上がますます注目を集めている（農林水産省, 2018）。我が国における家畜改良増殖目標（農林水産省, 2015）では、分娩間隔の短縮や初産月齢の早期化、繁殖雌牛の1年1産を目標として掲げ、繁殖基盤の強化を推進している。さらに同目標では、分娩事故や子牛の事故率の低下についても課題として挙げており、黒毛和種子牛の生産拡大を図る必要があるとしている。

子牛の死産事故の1つである死産は、産子及び繁殖雌牛の死亡による収入の減少や母体の損傷による繁殖性の低下を引き起こすことから（前田ら, 2014）。繁殖農家にとって経済的損失となる不良形質である。外国品種における死産の発生率（死産率）は、スウェーデンの肉用種の経産牛で5.75%（Erikssonら, 2004）、ポーランドの肉用種であるAberdeen-Angus種、Blonde d'Aquitaine種、Charolais種、Piemontese種、BeefSimmental種及びGasconne種でそれぞれ、8.27%、8.59%、7.41%、6.20%、6.18%、5.95%及び3.96%であり、品種に依存することが報告されている（Citekら, 2011）。

一般に、死産や生時体重などの形質における遺伝的パラメータの推定では、直接遺伝効果と母性効果によるものに分けられる。母性効果には、母性遺伝効果と永続的母性環境効果があり、このうち母性遺伝効果は、母親から伝えられる相

加的な遺伝効果であり、永続的環境効果は母親の哺育能力などの環境効果及び相加的でない遺伝（卵細胞からのミトコンドリアや細胞質の遺伝）効果のことである（Raphael, 2014）。永続的母性環境効果は、複数産次記録（反復記録）の評価において、同一母牛の子宮環境などの環境は永続的であることを示す効果として用いられる。上述した集団のいくつかでは死産の遺伝的パラメータが検討されており（Table 5-1）、死産を閾値形質とした場合の直接遺伝率及び母性遺伝率は7.0%～9.9%及び8.0%～12.9%（Hansen ら, 2004a; Heringstad ら, 2007）、線形形質とした場合の直接遺伝率及び母性遺伝率は、2%～9.8%及び1%～12.8%（Luo ら, 1999; Eriksson ら, 2004; Hansen ら, 2004b）と報告されている（Table 5-1）。

他方、黒毛和種における死産率は、山形県の6,475頭の集団で2.4%（小形ら, 1995）及び北海道の4,529頭の集団で2.7%（前田ら, 2015）と報告がある。さらに、Table 5-1 に示すように死産の遺伝率は北海道の集団で報告されており、閾値形質とした場合の直接遺伝率と母性遺伝率がそれぞれ17%、11%と外国品種に比べて比較的高い数値として評価されている（前田ら, 2015）。したがって、黒毛和種では死産の遺伝的改良が期待されるが、黒毛和種で発生する死産に関する遺伝的評価は少ない。本研究では、鹿児島県産黒毛和種のフィールドデータを使って死産の発生状況を調査し、単形質閾値父方-母方祖父モデルを用いて死産の遺伝的パラメータを推定した。

Table 5-1 Properties of incidence rates and estimated genetic parameters of stillbirth.

Reference	Model				Breed	Parity	Incidence rate (%)	Heritability (%)		PE ¹ (%)
	Threshold	Linear	Animal	Sire-MGS				Direct	Maternal	
Eriksson et al (2014)		○	○		Charolais	1	3.9-8.0	0.2	0.5	-
			○		Charolais	later	0.9-1.3	1.0	0.5	1.9
			○		Hereford	1	3.8-7.5	0.4	0.1	-
			○		Hereford	later	0.9-1.4	0.6	0.3	1.5
Luo et al (1999)		○			Holstein	-	5.6-11.8	4.0	6.0	-
Hansen et al (2004a)	○				Danish Black and White, Holstein	1	10.4	10.0	13.0	-
Hansen et al (2004b)	○				Holstein	1	0.09-0.25	10.0	13.0	-
Heringstad et al (2007)	○				Norwegian Red	1	2.0	7.0	8.0	-
前田ら (2015)	○				Japanese Black	1-3	2.70	17.0	11.0	-

¹PE: maternal permanent environmental effect

2. 材料及び方法

2-1. 供試材料

材料には、2010年4月～2013年3月の3年間に記録された鹿児島県農業共済組合連合会の死産を含む病傷牛 12,023 頭のデータ（以下、共済データ）及び（公社）全国和牛登録協会鹿児島県支部（以下、全和鹿支部）の同期間に娩出された子牛登記件数である 282,232 頭のデータ（以下、正常データ）を用いた。2010年4月～2013年3月までの3年間の共済・正常データの総頭数は 294,255 頭（以下、死産データ）で、死産データの内訳は Table 5-2 に示した通りである。

Table 5-2 All data used in this study.

No. of calves	2010	2011	2012	Total
Defective	3,933	4,098	3,992	12,023
Normal	94,391	95,970	91,871	282,232
Total	98,324	100,068	95,863	294,255

2-2. データの編集

死産の有無は、損徴（第 2 章及び第 3 章）と同様に不連続分布を示すことから、正常を「0」、死産を「1」とした 2 値の閾値形質として扱った。

次に、死産データ 294,255 件のうち、以下に該当する個体のデータを削除対象とした。

- ・ 子牛死亡の原因が「母牛による圧死」、「母牛の死亡に伴う胎児死」及び「鳥獣害被害」であるもの。
- ・ 受精卵移植によって出生したもの。
- ・ 子牛の性別が不明なもの。
- ・ 複産のもの。
- ・ 子牛が F1（黒毛和種とその他の品種の交雑種）のもの。
- ・ データに欠測値があるもの。
- ・ 出生時母牛年齢が 1 歳未満または 14 歳以上のもの。
- ・ 本牛近交係数及び母牛近交係数が 20% 以上のもの。
- ・ 住所が県外または生産頭数が 5 頭未満の繁殖農家。
- ・ 後代頭数が 5 頭未満の父牛（種雄牛）。

編集後のデータ数は 213,261 件であり、正常及び死産子牛の頭数内訳を Table 5-3 に示した。

Table 5-3 Data after editing.

No. of calves	2010	2011	2012	Total
Stillbirth	1,315	1,604	1,379	4,298
Normal	71,878	69,720	67,365	208,963
Total	73,193	71,324	68,744	213,261

2-3. 分析方法

分析には、単形質閾値父方 (sire) - 母方祖父 (maternal grand sire-MGS) モデル (以下、sire-MGS モデル) を用いて遺伝的パラメータを推定した。ここで、sire-MGS モデル (Figure 5-1) とは後代の記録に基づき、それらの父親である種雄牛の育種価を予測するために用いられる父方モデル (sire モデル) に、雌への無作為交配からのずれを取り除いて、偏りのない育種価を予測するために母方祖父を考慮したモデルである (佐々木, 1994)。

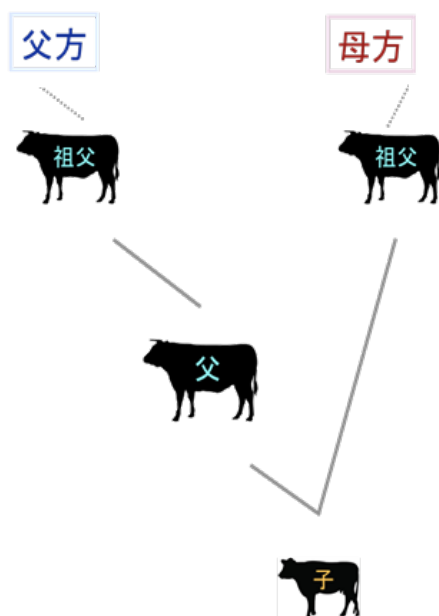


Figure 5-1 Diagrammatic illustration of sire-MGS model.

なお、分析に用いたモデルはそれぞれ以下の通りである。

$$\begin{aligned}
 U_{ijklmno} &= \mu + BYM_i + F_j + PE_k + b_{1.1} \cdot IBC_l + b_{2.1} \cdot IBD_k + b_{3.1} \cdot CAD_m \\
 &\quad + b_{3.2} \cdot CAD_m^2 + s_n + MGS_o + e_{ijklmno} \\
 Y_{ijklmno} &= \begin{cases} 0 & \text{if } U_{ijklmno} \leq T \\ 1 & \text{otherwise} \end{cases}
 \end{aligned}$$

ここで、 U_{ijklmn} は 1 番目の子牛の死産の閾値記録、 $Y_{ijklmno}$ はライアビリティ、 T は閾値、 μ は全平均、 BYM_i は i 番目の出生年月の母数効果、 F_j は j 番目の繁殖農家の変数効果、 PE_k は k 番目の永続的母性環境の変数効果、 IBC_l は 1 番目の子牛の近交係数、 IBD_k は k 番目の母牛の近交係数、 CAD_m は m 番目の出生時母牛年齢、 $b_{1.1}$ は子牛の近交係数に対する一次の偏回帰係数、 $b_{2.1}$ は母牛の近交係数に対する一次の偏回帰係数、 $b_{3.1}$ 及び $b_{3.2}$ は出生時母牛年齢に対する一次及び二次の偏回帰係数、 s_n は n 番目の sire の効果、 MGS_o は o 番目の MGS の効果、 e_{ijklmn} は残差効果である。

分析に用いた各効果の水準数は、Table 5-4 に示した。なお、血統情報は 1975 年まで遡った。

Table 5-4 Levels, mean and SD of the respective effects.

Effect	Levels	Mean \pm SD
Permanent environment	103,249	-
Reproductive farm	7,230	-
Birth year-season	36	-
sex of calf	2	-
Pedigree information	851	-
Inbreeding coefficient of calf	-	5.77 \pm 4.10
Inbreeding coefficient of dam	-	4.41 \pm 4.01
Calving age of dam	-	5.83 \pm 2.94

分散（共分散）の推定には、第2章及び第3章と同様に BLUPF90 ファミリーの THRGIBBS1F90 プログラム（Misztal ら, 2002 ; Tsuruta ら, 2006）を使用し、正常を「1」、死産を「2」に変換した。分析には、毎回の残差分散を 1.00 に固定して 500,000 回の単連鎖を行い、最初の 50,000 回のサンプルを burn-in として破棄し、その後の 450,000 回のサンプルを事後平均の算出に用いた。分析の収束状況の確認には、トレースプロットによって視覚的に調査することのできる BLUPF90 ファミリーの POSTGIBBS1F90 プログラム(Misztal ら, 2002)を用いた。

さらに、推定された sire 及び MGS の遺伝分散（共分散）成分を用いて、Willham (1972) の方法を参考に、直接及び母性遺伝分散（共分散）を以下の通り算出した。

$$\begin{bmatrix} \sigma_d^2 \\ \sigma_{dm}^2 \\ \sigma_m^2 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 4 & 0 & 0 \\ -2 & 4 & 0 \\ 1 & -4 & 4 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \sigma_s^2 \\ \sigma_{sMGS}^2 \\ \sigma_{MGS}^2 \end{bmatrix}$$

ここで、 σ_d^2 は直接遺伝分散、 σ_m^2 は母性遺伝分散、 σ_{dm}^2 は σ_d^2 と σ_m^2 の間の遺伝共分散、 σ_s^2 は sire の遺伝分散、 σ_{MGS}^2 は MGS の遺伝分散、 σ_{sMGS}^2 は σ_s^2 と σ_{MGS}^2 の間の遺伝共分散である。

また、推定育種価（EBV）の遺伝ベースは 2007 年から 2011 年の 5 年間に設定し、この間に生まれた種雄牛集団の EBV 平均値を 0 に置き換え、全個体における EBV から偏差を取った。

さらに、Van Tassell ら（2003）及び Cole ら（2007）の方法を参考として、上記の EBV を %BV に変換した。算出方法は以下の通りである。

$$\%BV = (1 - F[-EBV + F^{-1}(1 - x^*)]) \times 100$$

ここで、%BV は EBV を実際のスケールに戻した死産の発生率（%）、 F は標準正規分布の累積分布関数、 F^{-1} は F の逆関数、 EBV は遺伝ベース調整後の推定育種価、 x は分析に用いた死産の発生率を示す。

3. 結果及び考察

3-1. 分析形質の概要

本研究で得られた鹿児島県産黒毛和種の死産率は2.0%であり、3年間では2011年の2.2%が最も高かった (Table 5-5)。この数値は小形ら (1995) 及び前田ら (2015) 報告した黒毛和種の死産率と同程度だった。

Table 5-5 Incidence rate of stillbirth.

Year ¹	Normal calves	Stillbirth calves	Incidence of stillbirth
2010	71,878	1,315	1.8%
2011	69,720	1,604	2.2%
2012	67,365	1,379	2.0%
Total	208,963	4,298	2.0%

¹Japanese fescal year.

3-2. 分散（共分散）成分推定値

推定された遺伝的パラメータを Table 5-6 に示した。直接遺伝分散及び母性遺伝分散は 0.038 ± 0.013 及び 0.041 ± 0.020 、直接遺伝率及び母性遺伝率はそれぞれ $3.1\% \pm 1.0\%$ 及び $3.3\% \pm 1.6\%$ であった。さらに、永続的母性環境分散は (0.103 ± 0.027) であり、残差分散を除いて表型分散に対する割合が最も大きく、その表型分散に対する割合（永続的母性環境効果）は $8.3\% \pm 2.0\%$ であった。また、繁殖農家分散は 0.049 ± 0.006 、その表型分散に対する割合は $3.9\% \pm 0.4\%$ と推定され、永続的母性環境効果よりは小さいものの、飼養環境も死産に影響することが示唆された。

一般に、繁殖形質の遺伝率は低いことが知られており、本研究においても同様の傾向が見られた。本研究と同様に死産を閾値形質として扱った外国品種の報告（Table 2-1）では、直接遺伝率で $7\% \sim 9.9\%$ 及び母性遺伝率で $8\% \sim 12.9\%$ であり、本研究より高い傾向が見られたが、北海道産黒毛和種集団において推定された死産の直接遺伝率及び母性遺伝率は、それぞれ 17% 及び 11% と報告（前田ら, 2015）されており、本研究の結果と比較すると直接遺伝分散がおおよそ 5 倍、母性遺伝分散がおおよそ 3 倍高かった。これらは、分析に用いた集団の大きさや遺伝的構成が異なることやデータ構成が異なっていたことが原因かもしれない。データ構成については、本研究では産次数を解析に含めなかったが、前田ら（2015）は初産から 3 産までを使って解析したこと、本研究では共済データを用いたが、家畜共済では授精後 240 日の肉用牛胎児からが加入対象となっており（鹿児島県農業共済組合連合会, 2019）、それよりも短い時点で発生した死産はデータに含まれない。したがって、今後、これらのデータを含めて再解析できればよいが、現時点では、黒毛和種の大規模フィールドデータでそれらを得ることは難しい。しかしながら、本研究では 3 年間の調査期間だったが、さらに長期間のデータを蓄積させることで、同一母牛のデータが蓄積さ

れ、解析結果を改善させることは可能であると考えた。他方、死産を線形形質として扱った外国品種の報告 (Table 2-1) では、直接遺伝率で 0.2%~4.0%及び母性遺伝率で 0.3%~6.0%であり、閾値形質と比較すると低い傾向があったものの、本研究の結果と同程度であった。さらに、外国品種における報告では、直接遺伝率より母性遺伝率の方が高く推定されており (Table 2-1)、本研究でも同様の傾向が見られた。さらに、Eriksson ら (2004) は表型分散に対する永続的母性環境分散の割合をシャロレー種とヘレフォード種でそれぞれ 1.9%及び 0.6%と報告しており、本研究の結果の方が高く推定された。

以上より、鹿児島県産黒毛和種で発生する死産は、遺伝的な要因が関連しているものの、その影響は小さかったことから、死産の直接的な選抜は難しく、改良には時間を要することが示唆された。

Table 5-6 (Co) variance components and heritability of stillbirth.

Parameter	(Co) variance		HPD (95%)		
	Mean	SD	Low	High	<i>p</i>
σ^2_{farm}	0.049	0.006	0.038	0.060	*
σ^2_{pe}	0.103	0.027	0.055	0.154	*
σ^2_{s}	0.010	0.003	0.004	0.016	*
σ^2_{sMGS}	0.007	0.004	-0.001	0.014	
σ^2_{MGS}	0.014	0.005	0.006	0.025	*
σ^2_{d}	0.038	0.013	0.016	0.064	*
σ^2_{dm}	0.007	0.014	-0.020	0.034	
σ^2_{m}	0.041	0.020	0.009	0.081	*
σ^2_{e}	1.000	0.004	0.992	1.008	*
σ^2_{P}	1.239	0.039	1.168	1.316	*
$\sigma^2_{\text{farm}}/\sigma^2_{\text{P}}$	0.039	0.004	0.031	0.048	*
$\sigma^2_{\text{pe}}/\sigma^2_{\text{P}}$	0.083	0.020	0.046	0.120	*
h^2_{d}	0.031	0.010	0.013	0.051	*
h^2_{m}	0.033	0.016	0.007	0.064	*

σ^2_{farm} , reproductive farm variance. σ^2_{pe} , permanent environmental variance. σ^2_{s} , genetic variance of sire. σ^2_{sMGS} , sire-MGS genetic covariance. σ^2_{MGS} , genetic variance of MGS. σ^2_{d} , direct additive genetic variance. σ^2_{dm} , direct-maternal additive genetic covariance. σ^2_{m} , maternal additive genetic variance. σ^2_{e} , residual variance. σ^2_{P} , phenotypic variance. $\sigma^2_{\text{farm}}/\sigma^2_{\text{P}}$, total ratio of reproductive farm effect per phenotypic variance. $\sigma^2_{\text{pe}}/\sigma^2_{\text{P}}$, total ratio of permanent environmental effect per phenotypic variance. h^2_{d} , direct heritability. h^2_{m} , maternal. heritability.

3-3. 各効果における推定値

後代を 100 頭以上持つ父牛（123 頭）及び 100 頭以上持つ母父牛（141 頭）における死産の%BV を Figure 5-2 に示した。%BV の範囲は、父牛及び母牛でそれぞれ 8.3%～15.2%及び 7.3%～13.4%であり、種雄牛において遺伝的なバラツキが確認された。しかしながら、父牛及び母父牛の%BV に系統の違いは見られなかった。

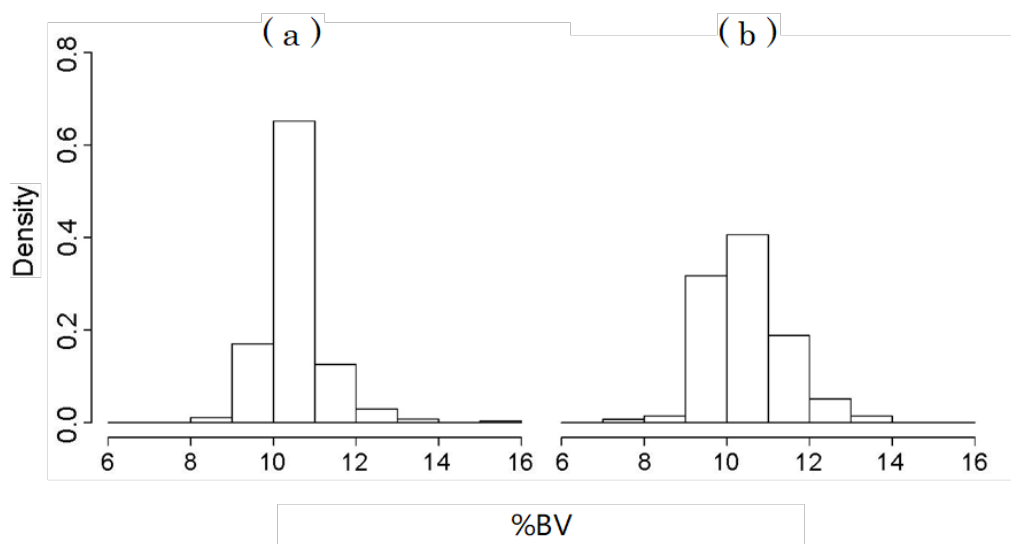


Figure 5-2 Distribution of the %BV estimates of stillbirth.

(a), sire. (b), maternal grand sire.

母数効果である出生年月ごとの発生率及び推定値は、それぞれ 0.8%～3.2% (Figure 5-3) 及び 0.39～0.23 (Figure 5-4) であり、同様の傾向が見られた。特に、どの年においても 1 月が最も高く推定されていたことから、冬季(12～2 月)の分娩は、その他の季節に比べて死産のリスクが増加する傾向にあることが示唆された (Tukey-Kramer: $p < 0.05$)。このことは Uematsu ら (2013) の報告と同様だった。この原因として、寒冷による母牛のストレスや、それに伴う免疫機能の低下、食欲減退による栄養状態の悪化などが影響していることが推察される。



Figure 5-3 Relationship between birth year-season and incidence of stillbirth.

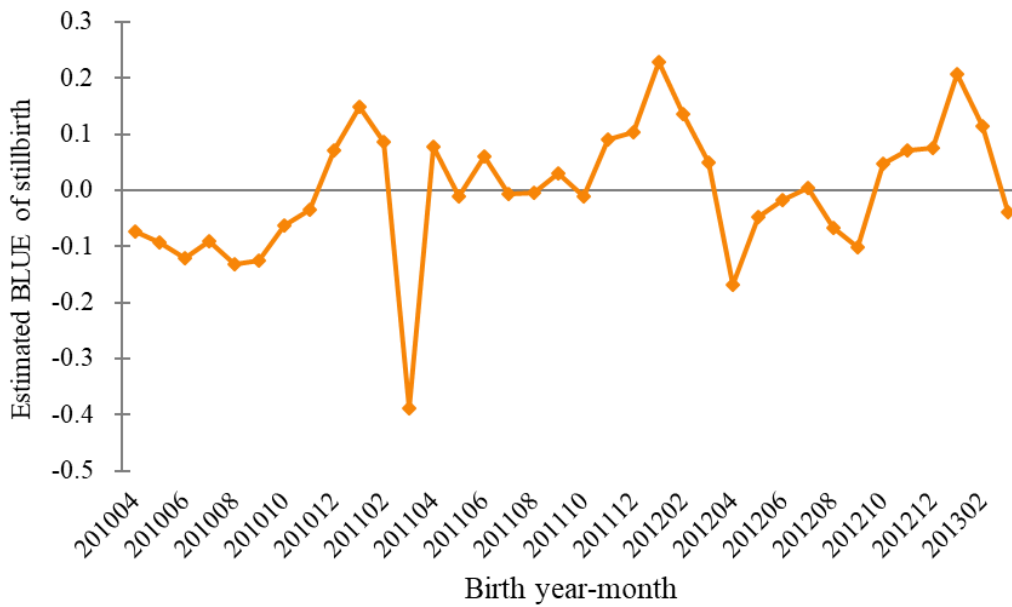


Figure 5-4 Relationship between birth year-season and estimated BLUE of stillbirth.

母数効果である性別の推定値は、雄産子で 0.05（雌産子：-0.05）であり、雌産子より雄産子の方が死産になりやすい傾向が見られた。なお、本データにおける性別ごとの死産率（Figure 5-5）においても同様の傾向が見られた（ $p < 0.01$ ）。海外品種において、産子が雄の場合に死産率が高くなることが報告されており（Philipsson, 1976）、また、Eriksson ら（2004）は、死産と産子の生時体重の間に中程度から高い正の遺伝相関があることを報告している。また、黒毛和種における産子の生時体重は、雌産子より雄産子の方が大きくなるとの報告（小川ら, 2008）から考えると、雌産子より雄産子の生時体重が大きいため、雄産子がより死産のリスクが高まる可能性があることが示唆された。

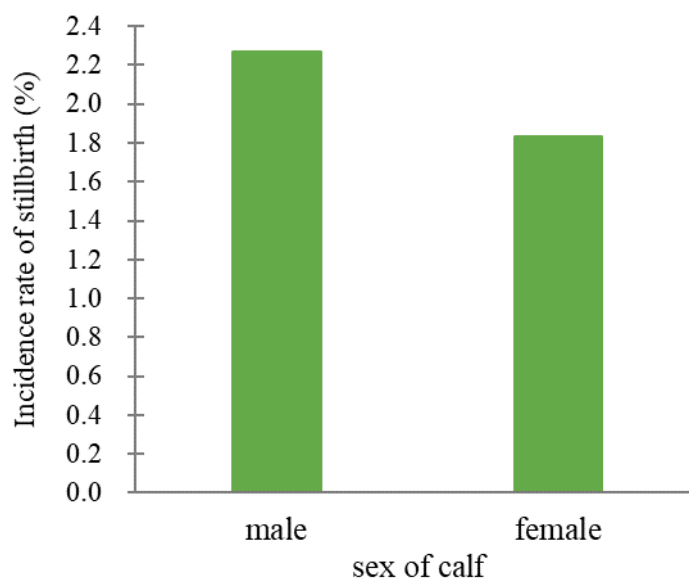


Figure 5-5 Relationship between sex of calf and incidence of stillbirth.

推定された各共変量（効果）の回帰係数は全て小さかったものの死産発生と正の関係があることが示された（Table 5-7）。また、出生時母牛年齢ごとの死産の発生率及び推定値の推移を Figure 5-6 及び Figure 5-7 に示した。出生時母牛年齢については、平均値 5.83 歳より若齢または高齢であればあるほど、死産の危険性が高くなることが示された。若齢の母牛は、胎子の発育だけでなく、自身の発育・維持に多くの栄養を必要とし（山形県, 2008）、また、繁殖雌牛は、加齢に伴う卵巣機能の低下や子宮における組織学的異常等の繁殖障害が起こることが報告されている（Eriksson ら, 1966）。そのため、初産または高齢な母牛の分娩では、手厚い分娩介助を行うなど、特に注意が必要であることが示唆された。次に、本牛及び母牛の近交係数の発生率の推移を Figure 5-8 に、それぞれの推定値を Figure 5-9 に示した。本牛及び母牛の近交係数どちらにおいても、近交係数が上昇するほど、死産のリスクが増加することが示された（t-test for regression coefficient: $p < 0.05$ ）。前田ら（2015）は、黒毛和種において、産子の近交係数が 15%以上となる強い近親交配が行われたときに、死産のリスクが急激に高くなることを報告している。しかし、本研究において、死産の発生率と本牛及び母牛の近交係数は、全体的に緩やかに上昇していた。しかしながら、本牛の近交係数が 18%以上になると、死産の発生率にバラツキが見られる。これは、本牛の近交係数の影響よりも、18%～19%クラス以上の水準数（最高 756 件）が 17%～18%のクラス以下の水準数（最低 1,068 件）より少ないことが影響している可能性がある。

Table 5-7 Estimated regression coefficients.

Regression coefficients	CAD	IBC	IBD
Linear	-0.008	0.016	0.009
Quadratic	0.007	-	-

CAD, Calving age of dam. IBC, Inbreeding coefficients of calf. IBD, Inbreeding coefficients of dam.

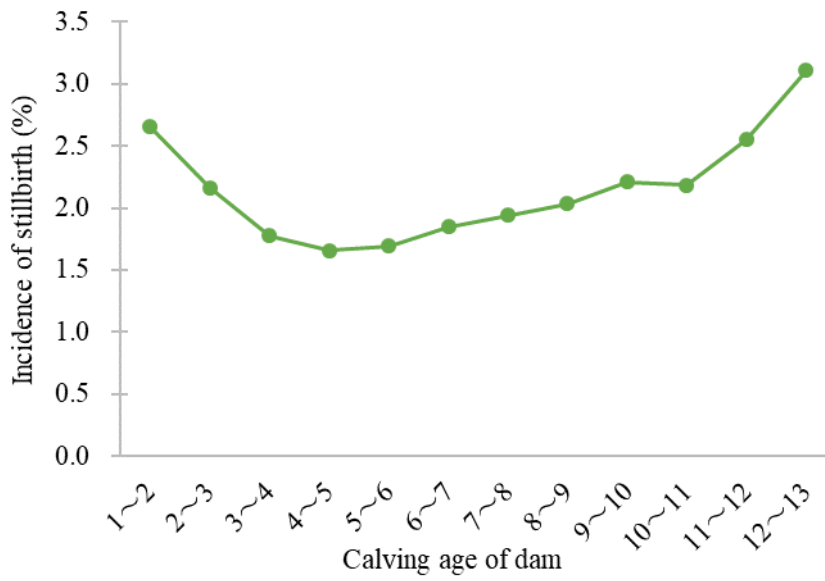


Figure 5-6 Relationship between calving age of dam and incidence of stillbirth.

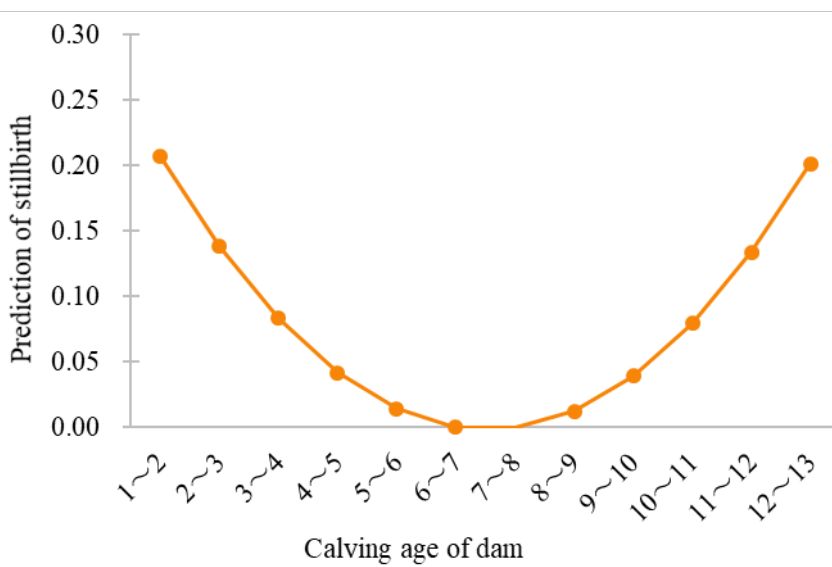


Figure 5-7 Relationship between calving age of dam and prediction of stillbirth.

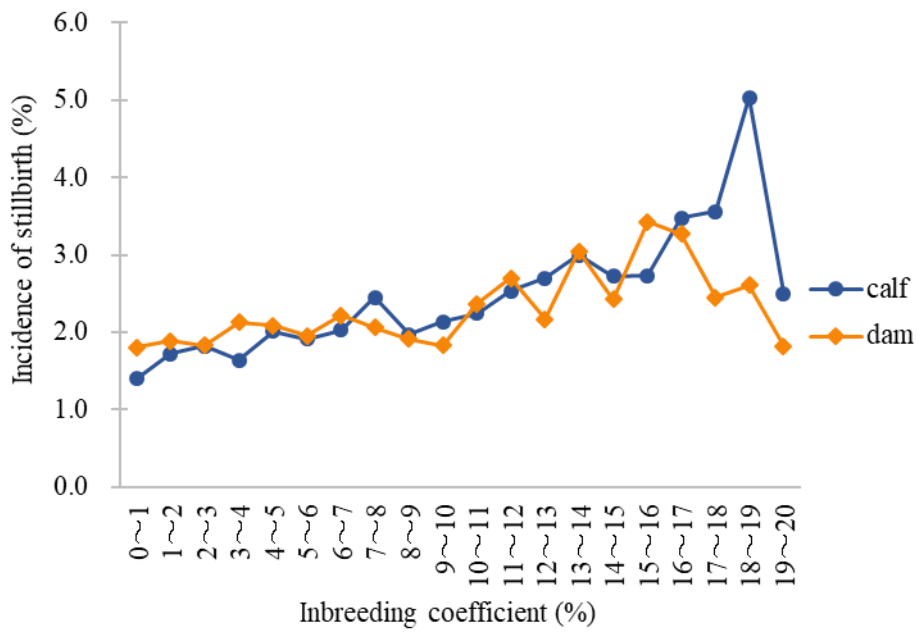


Figure 5-8 Relationship between inbreeding coefficient and incidence of stillbirth.

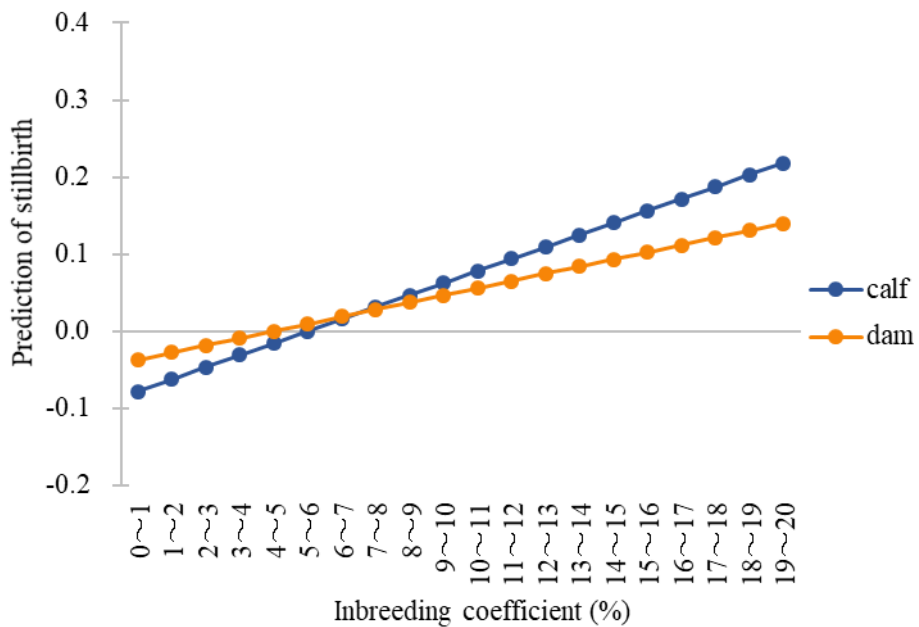


Figure 5-9 Relationship between inbreeding coefficient and prediction of stillbirth.

3-4. 遺伝的趨勢

種雄牛及び母方祖父における死産の遺伝的趨勢を Figure 5-10 に示した。各生年は種雄牛が少なくとも 10 頭以上含む。死産における遺伝的趨勢は、種雄牛(507 頭) 及び母方祖父 (507 頭) において、それぞれ-0.82~0.10 及び 0.76~0.21 であり、鹿児島県産黒毛和種で発生する死産における遺伝的なリスクは、年々上昇傾向であることが示された (t-test for regression coefficient: $p < 0.01$)。これは、これまでの黒毛和種における枝肉形質の遺伝的趨勢と同様の傾向であったことから、黒毛和種における死産と枝肉形質の間に遺伝的な関連性がある可能性が示唆された。

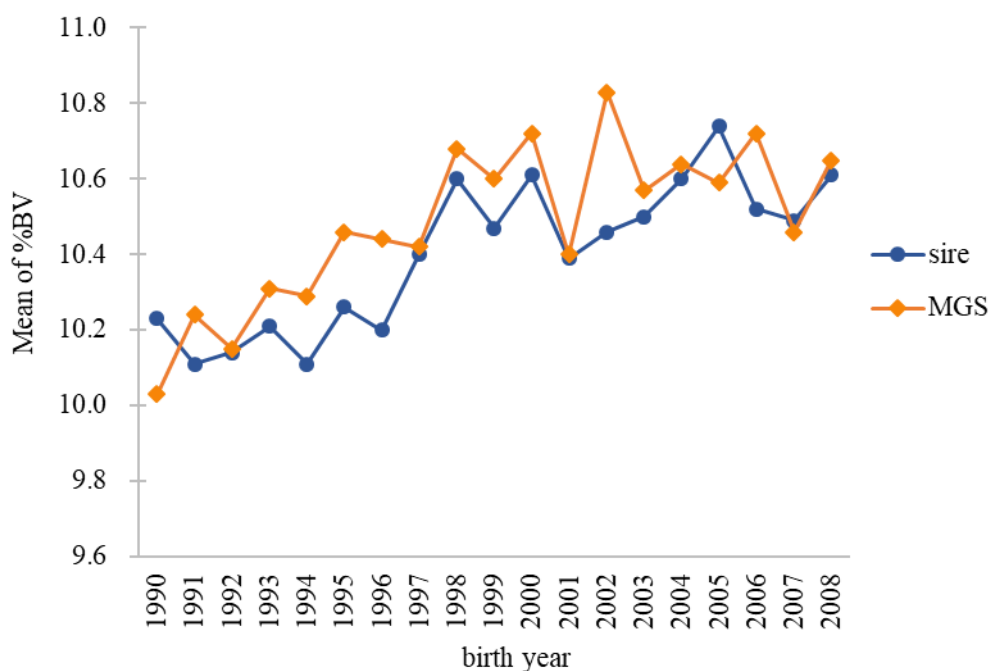


Figure 5-10 Estimated genetic trends of stillbirth.

4. 小括

本研究では、2010年4月～2013年3月の3年間に記録された死産データを使用して鹿児島県産黒毛和種における死産の発生に関わる要因について、遺伝的パラメータを単形質閾値母方-母方祖父モデルによって推定した。その際に、母数効果として本牛の性別及び出生年月、共変量として出生時母牛年齢の一次回帰及び二次回帰、本牛及び母牛近交係数の一次回帰を、変量効果には繁殖農家、永続的母性環境効果、遺伝及び残差を考慮し、THRGIBBS1F90 (Misztal ら, 2002; Tsuruta ら, 2006) プログラムを用いて推定した。

本研究で供試した鹿児島県産黒毛和種子牛の全頭数は213,261件であった。死産率は、2010年度が1.8%、2011年度が2.2%、2012年度が2.0%となった。さらに、推定された死産の直接遺伝率及び母性遺伝率は、それぞれ $3.1\% \pm 1.0\%$ 及び $3.3\% \pm 1.6\%$ であったことから、鹿児島県産黒毛和種で発生する死産は、遺伝的な要因が関連していることが示唆された。しかし、既報(前田ら, 2015)の遺伝率と比較すると低くなっていた(直接遺伝効果: 17%, 母性遺伝効果: 11%)が、これは分析に用いた集団の大きさや遺伝的構成が異なること影響していると推察した。また、表型分散に対する永続的母性環境分散の割合は $78.3\% \pm 2.0\%$ 、繁殖農家分散の割合は $3.9\% \pm 0.4\%$ と推定されたことから、母体内の環境や飼養環境についても死産発生の要因であることが示された。

各効果の推定値について、標準育種価(SBV)は、後代を100頭以上持つ父牛(123頭)及び後代(母牛)を100頭以上持つ母父牛(141頭)で調査した結果、そのレンジはそれぞれ9.34及び7.32であったことから、種雄牛において遺伝的なバラツキが確認された。

出生年月では、死産率の推移と同様に、死産は冬期の分娩時に発生リスクが高まり、春や夏などの気候が温暖な際には、冬期よりも死産発生が低減されること

が示唆された。これは、寒冷による母牛のストレスや、それに伴う免疫機能の低下、食欲減退による栄養状態の悪化などが原因として考えられる。

性別では、雄子牛（0.05）が高くなっており、これは雌子牛よりも雄子牛で体格が大きく、死産のリスクが高まることが考えられた。

出生時母牛年齢は母牛が若齢また高齢なほど、死産のリスクが高まることが示された。未経産牛や若齢の母牛は、自身の発育・維持に多くの栄養を必要とし、一方、高齢な母牛では加齢に伴う体力の衰えや免疫機能の低下が著しく、これによる妊娠維持能力の低下が示唆され、また産次数が増えるに従って、子牛の平均価格は下がる傾向にある（大分県豊後牛生産者組織連絡協議会, 2011）ことなどから、経済性を考慮した上で適切に母牛を更新していくことが望ましい。以上より、初産や高齢な母牛における分娩では、特に手厚い分娩介助を行う必要であり、死産発生リスクを減らすためには、母牛が6歳前後の場合が一番望ましいことが示唆された。

本牛及び母牛の近交係数は上昇するほど死産のリスクも増加することが示された。

種雄牛及び母方祖父における死産の遺伝的趨勢は、年々上昇傾向であり、枝肉形質の間に遺伝的な関連性がある可能性が示唆された。

以上の結果より、鹿児島県産黒毛和種で発生する死産は遺伝的な要因が関連しているものの、その影響は小さかったことから、死産の直接的な選抜は難しく、改良には時間を要することが示唆された。しかしながら、sire-MGSモデルでは実際の雌牛の遺伝的なバラツキが考慮されないことから、今後はさらにデータを追加した上で、アニマルモデルについて検証を行う必要がある。

今後の展望としては、データを蓄積することによって集団を更新し、死産を起こしにくい個体を間接的に選抜することを目的として、子牛の体格及び母牛と

の関連性を調査する予定である。さらに枝肉形質をはじめとする経済形質への影響について検討する必要がある。

第6章 総括

平成 26 年 12 月に発表された肉用牛の遺伝的不良形質に対する対応方針（肉用牛遺伝的不良形質専門委員会, 2014）では、遺伝的不良形質の発生を抑制するための方針が提言されている。具体的には、特に経済的損失が大きいとされる遺伝性疾患のうち、指定遺伝的不良形質については、種雄牛及び候補種雄牛を対象に遺伝子型検査の実施に努めること、その検査の有無及び結果を種畜証明書の特徴欄に記載するよう努めること、優性遺伝するものでは優性ホモ及びヘテロの雄牛、劣性遺伝するものでは劣性ホモの雄牛を登録や精液供給しないこと、保因牛（ヘテロの雄牛）の精液供給する際にもその情報と不良形質の発現の可能性について利用者に周知徹底するよう努めることとしている。このように、常染色体劣性遺伝子に支配されている遺伝性疾患では、見かけ上正常である保因個体を効率よく検出し、集団から除去することがきわめて重要である（国枝, 2000）。

しかしながら、遺伝的不良形質の発生が顕在化したときには既に集団中に原因遺伝子が広く拡散している状態となっているため、保因個体を効率良く同定しない限り、その集団から原因遺伝子を除去することは非常に困難である（国枝, 2000）。そのため、遺伝的不良形質の拡散防止や集団からの効率的な排除には、原因遺伝子変異を利用した DNA 診断法の確立は急務である（平野, 2011）。これまでに、黒毛和種で発生する遺伝的不良形質における DNA 診断法は、例えば、クローディン 16 欠損症ではマイクロサテライトマーカーを用いた連鎖解析で特定された原因領域から、腎臓の cDNA ライブラリーのスクリーニング行うことで原因遺伝子を単離し、さらにゲノミックサザンハイブリダイゼーション及びノーザンプロットハイブリダイゼーションを行い、原因変異を特定した（Kobayashi ら, 2000; Ohba ら, 2000; Hirano ら, 2000; 平野, 2011）。近年、乳用種では、ゲノミック評価に用いる高密度な SNP 情報により、遺伝的不良形質にお

ける原因遺伝子の発見や保因状況の調査への活用が可能であるとの報告がある(馬場ら, 2017)。

その他の不良形質の能力改良に関して、家畜改良センターでは難産率及び死産率を乳用種において遺伝的能力評価を実施しており、後代検定済種雄牛における評価値を公表している(家畜改良センター, 2018)。しかしながら、肉用種では遺伝性疾患以外の遺伝的不良形質における改良は現状では行われていない。

本研究では、黒毛和種で発生する損徴と死産について調査し、いくつかの遺伝的な知見を得ることができた。例えば損徴については、第 2 章において中程度から高い遺伝率が推定されたことで、遺伝的な影響が大きいことが示された。また、種雄牛の推定育種価と子牛の発生率との相関は有意な高い正の相関が認められたことから、推定育種価を用いた直接選抜が後代の損徴発生率の低減に有効であることを示した。この結果は、以前、後代の損徴発生率が両親の組み合わせによって低減できる可能性を示した結果とも同意した(小山ら, 2017)。さらに白斑については、第 4 章において *MITF* 遺伝子の SNP と白斑の発生との関連性を調べたところ、両者は有意に関連し、白斑のない群で調査個体の 48.1% がヘテロ型を示した。このことは、白斑になりやすい遺伝子を持つ個体が鹿児島県の黒毛和種集団中に広く分布していることを意味している。以上のことから、損徴のように中程度から高い遺伝率を示す形質については、サンプルの選定においても推定育種価の上位と下位などの情報を用いることで、原因遺伝子の特定を効率的に行える可能性がある。また、舌の異常や死産のように遺伝要因と環境要因の両方が関与している形質では、原因遺伝子の調査だけでなく飼養環境の影響についても周知させる必要がある。

他方、死産については直接遺伝率及び母性遺伝率がそれぞれ 3.1% 及び 3.3% と推定されたことから、直接選抜には時間を要することが示されたことから、死産

の淘汰は間接選抜による改良が期待される。一般に、選抜対象形質の測定に労力やコストがかかる場合は、測定が容易な他の形質について選抜を行い、相関反応を利用して間接的に選抜対象形質の改良が図られる場合があり、例えば飼料効率の高い遺伝相関のある 1 日当たりの増体量を選抜することで改良が期待できる (佐々木, 1994)。また、デュロック種において、総産子数、生存産子数及び離乳頭数といった繁殖形質を効率的に改良するために、乳頭数の相関反応を利用することは有効であると報告されている (大西ら, 2014)。さらに、Eriksson ら (2014) は、シャロレー種とヘレフォード種において、死産と分娩難易度の間に正の直接遺伝相関 (0.95~0.96) 及び母性遺伝相関 (0.96~0.98) があることを報告している。そのため、今後は黒毛和種で発生する死産を間接的に淘汰することを目的として、死産と分娩難易度及び子牛または母牛の体格などの形質との間の関連性を調査することで、間接選抜の可能性について検討する必要がある。また、本研究で用いた黒毛和種の死産記録は、家畜共済に申請された情報を手入力によって電子化する必要があったことから、黒毛和種の大規模フィールドデータを継続的に得ることは現状では難しい。さらに、共済の申請が可能な妊娠期間に制限 (240 日以上) が設けられており、全ての流死産のデータは蓄積されないという欠点がある。そのため、これらのデータを効率よく収集するために、共済申請をインターネットで行うことで自動的にデータを蓄積するような、国全体で一元化したシステムを構築することが望ましい。その際、共済情報に含まれないような妊娠期間が 244 日未満の情報についても同様にデータベース化し、蓄積した情報を用いて繁殖性の向上を目的とした改良を実施することも重要である。しかしながら、これらを実現するためには繁殖農家の協力が必要不可欠であるため、各繁殖農家の繁殖成績を個別に還元出来るようなシステムを同時に整備する必要がある。

損徴における今後の展望としては、今回対象としていない季肋骨異常や輪毛や刺毛などの被毛の異常についても遺伝的パラメータを推定し、白斑以外の損徴については、枝肉形質との関連性を調査する予定である。また、遺伝的パラメータを推定する場合、今回は相加的遺伝効果を調査したが、優性遺伝効果についても検討する必要がある。さらに、白斑については *MITF* 遺伝子以外に関連があると報告されている遺伝子について検討し、SNP タイピング数を蓄積した上で、再度 GWAS によって候補 SNP を探索する予定である。また、最近では、黒毛和種においてもゲノミック評価が検証されているため、ゲノミック評価で用いる SNP 情報を活用することでよりデータを効率的に蓄積できるかもしれない。

近年、畜産クラスター事業によるキャトルブリーディングステーション(CBS)やキャトルステーション (CS) の整備及び乳用牛への和牛受精卵移植技術を活用により、和子牛の生産拡大等の取組が行われており、平成 27 年以降から繁殖雌牛の頭数は増加傾向にあるものの、子牛価格は依然として高水準で推移している(農林水産省, 2019)。そのため、子牛の生産基盤を強化するとともに、黒毛和種で発生する損徴や死産といった遺伝的不良形質を低減し、黒毛和種子牛の安定的な供給を図ることは重要である。本研究の結果から、遺伝的不良質に関する更なる調査が行われ、将来的に少しでも遺伝的不良形質が減少することを期待する。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、常に温かいご指導ご助言を賜りました鹿児島大学農学部の下桐猛准教授に深く感謝の意を表します。

本論文の審査にあたり御助言、御校閲を賜った鹿児島大学農学部の岡本新教授ならびに、琉球大学農学部の川本康博教授、佐賀大学農学部の和田康彦教授、鹿児島大学農学部の大塚彰教授に深謝の意を表します。

損徴及び死産に関する貴重なデータを御提供いただいた、公益社団法人全国和牛登録協会鹿児島県支部の坂元信一様、今村清人様ならびに上西慎茂様、公益社団法人全国和牛登録協会本部の西和隆様、鹿児島県農業共済組合連合会、鹿児島県肉用牛振興協議会、鹿児島県経済農業協同組合連合会、鹿児島県肉用牛改良研究所、いずみ農業協同組合ならびに鹿児島大学農学部附属農場入来牧場の関係各位に厚く御礼申し上げます。

また、分析方法の御指導ならびに御校閲を賜りました神戸大学大学院農学研究科付属食資源教育研究センターの大山憲二教授ならびに本多健助教、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産研究部門の小林栄治博士、本研究へ御協力いただいた鹿児島大学自然科学教育支援センター遺伝子実験施設の河邊弘太郎助教、鹿児島大学家畜育種学研究室の皆様に深く感謝いたします。

そして、博士課程進学に際し、多大なる御協力をいただきました独立行政法人家畜改良センターの関係各位に心より感謝いたします。特に、多くの有益な御助言を賜りました改良部情報分析課の井上慶一博士ならびに大澤剛史博士に重ねて御礼申し上げます。

最後に、寛大な御理解と御支援を賜りました家族に心から感謝し、謝辞といたします。

参考文献

- Brka, M., Reinsch, N., & Kalm, N.** (2002). Frequency and Heritability of Supernumerary Teats in German Simmental and German Brown Swiss Cows. *Journal of Dairy Science*, 85, 1881–1886.
- Cain, D. V., & Dennis, S. M.** (1987). Perinatal calf mortality. *Agri-Practice*, 8 (4), 11-16.
- Citek, J., Hradecka, E., Rehout, V., & Hanusova, L.** (2011). Obstetrical problems and stillbirth in beef cattle. *Animal Science Papers and Reports*, 29, 109-118.
- Cole, J. B., Wiggans, G. R., & VanRaden, P. M.** (2007). Genetic evaluation of stillbirth in United States Holsteins using a sire-maternal grandsire threshold model. *Journal of Dairy Science*, 90, 2480–2488.
- Eriksson, B. H.** (1966). Development and Senescence of the Postnatal Bovine Ovary. *Journal of Animal Science*, 25 (3), 800–805.
- Eriksson, S., Nasholm, A., Johansson, K., & Philipsson, J.** (2004). Genetic parameters for calving difficulty, stillbirth, and birth weight for Hereford and Charolais at first and later parities. *Journal of Animal Science*, 82, 375–383.
- Fontanesi, L., Scotti, E., & Russo, V.** (2012). Haplotype variability in the bovine *MITF* gene and association with piebaldism in Holstein and Simmental cattle breeds. *Animal Genetics*, 43, 250-256.
- Fontanesi, L., Tazzoli, M., Russo, V., & Beever, J.** (2010). Genetic heterogeneity at the bovine *KIT* gene in cattle breeds carrying different putative alleles at the spotting locus. *Animal Genetics*, 41, 295-303.
- Hansen, M., Lund, M. S., Pedersen, J., & Christensen, L. G.** (2004a). Genetic Parameters for Stillbirth in Danish Holstein Cows Using a Bayesian Threshold Model. *Journal of Dairy Science*, 87 (3), 706-716.

- Hansen, M., Lund, M. S., Pedersen, J., & Christensen, L. G.** (2004b). Gestation length in Danish Holsteins has weak genetic associations with stillbirth, calving difficulty, and calf size. *Livestock Production Science*, 94, 23–33.
- Hayes, B. J., Pryce, J., Chamberlain, A. J., Bowman, P. J., & Goddard, M. E.** (2010). Genetic architecture of complex traits and accuracy of genomic prediction: Coat colour, milk-fat percentage, and type in Holstein cattle as contrasting model traits. *PLoS Genetics*, 6, e1001139.
- Hayes, B. J., Pryce, J., Chamberlain, A. J., Bowman, P. J., & Goddard, M. E.** (2010). Genetic architecture of complex traits and accuracy of genomic prediction: coat colour, milk-fat percentage, and type in Holstein cattle as contrasting model traits. *PLoS Genetics*, 6, e1001139.
- Henderson, C.R.** (1973). Maximum likelihood estimation of variance components. Department of Animal Science, Cornell University, Ithaca, N.Y., p. 14850, Unpublished manuscript.
- Heringstad, B., Chang, Y. M., Svendsen, M., & Gianola, D.** (2007). Genetic Analysis of Calving Difficulty and Stillbirth in Norwegian Red Cows. *Journal of Dairy Science*, 90, 3500–3507.
- 揖斐隆之, 三宅武, & 佐々木義之 (2005). Gibbs Sampling による黒毛和種枝肉における瑕疵の遺伝率推定. *肉用牛研究会報*, 80, 69-73.
- 揖斐隆之. (2010). 黒毛和種における BMS 及びモモヌケの遺伝的パラメータの推定
- Ihara, N., Watanabe, T., Sato, Y., Itoh, T., Suzuki, T., & Sugimoto, Y.** (2006). Oligogenic transmission of abnormal teat patterning phenotype (ATPP) in cattle. *Animal Genetics*, 38, 15–19.

家畜改良センター. (2018) 枝肉成績とりまとめ概要 (平成 29 年度) .

http://www.nlbc.go.jp/kachikukairyo/data/pr/edadbgaiyou_h29.pdf

家畜改良センター. (2019). 全国域での黒毛和種の種雄牛及び繁殖雌牛の遺伝的能力の推移について. <http://www.nlbc.go.jp/kachikukairyo/data/pr/trend2019.pdf>

家畜改良事業団. (2019). その他の遺伝子型検査 (MSHR) .

http://liaj.or.jp/giken/usi_gntyp_disease_other_mshr.html

家畜登録団体中央協議会. (1980). 家畜登録事業発達史.

鹿児島県農業共済組合連合会. (2019). 家畜共済.

https://www.nosai-net.or.jp/NOSAIjigyo/index_jigyo_02.html

Karlsson, E. K., Baranowska, I., Wade, C. M., Hillbertz, N. H. C. S., Zody, M. C., Anderson, N., Biagi, T. M., Patterson, N., Pielberg, G. R., Kulbokas, E. J., Comstock, K. E., Keller, E. T. , Mesirov, J. P., Euler, H. V., Kampe, O., Hedhammar, A., Lander, E. S., Andersson, G., Andersson, L., & Lindblad-Toh, K. (2007). Efficient mapping of mendelian traits in dogs through genome-wide association. *Nature Genetics*, 39, 1321–8.

Kawahara-Miki, R., Tsuda, K., Shiwa, Y., Arai-Kichise, Y., Matsumoto, T., Kanesaki, Y., Oda, S., Ebihara, S., Yajima, S., Yoshikawa, H., & Kono, T. (2011). Whole-genome resequencing shows numerous genes with nonsynonymous SNPs in the Japanese native cattle Kuchinoshima-Ushi. *BMC Genomics*, 2011 Feb 10; 12: 103. doi: 10.1186/1471-2164-12-103.

Levy, C., Khaled, M., & Fisher, D. E. (2006). *MITF*: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends in Molecular Medicine*, 12: 406–14.

Luo, M. F., Boettcher, P. J., Dekkers, J. C. M., & Schaeffer, L. R. (1999). Bayesian Analysis for Estimation of Genetic Parameters of Calving Ease and Stillbirth for

- Canadian Holsteins. Journal of dairy science, 82, 1848.
- 前田さくら, 古川勇一, 米川武, & 口田圭吾. (2014). 北海道産黒毛和種の死産に対する表型的要因及び近交係数の影響. 日本畜産学会報, 85, 27–32.
- Misztal, I., Tsuruta, S., Strabel, T., Auvray, B., Druet, T., & Lee, D. H. (2002). BLUPF90 and related programs. Proceedings of the 7th World Congress of Genetics Applied to Livestock Production, 19-23.
- 日本食肉格付協会. (2019). 出荷県別格付結果情報. <http://www.jmga.or.jp/rating/>
- Nish, K., Shimogiri, S., Kusano, A., Sakamoto, S., Shiromoto, K., Kawabe, K., Okamoto, S., Honda, T., & Oyama K. (2016). Estimation of genetic parameters for carcass defects of Japanese Black cattle in Kagoshima. Animal science Journal, 87, 655-660.
- Nobukuni, Y., Watanabe, A., Takeda, K., Skarka, H., & Tachibana, M. (1996). Analyses of loss-of-function mutations of the *MITF* gene suggest that haploinsufficiency is a cause of Waardenburg syndrome type 2A. American Journal of Human Genetics, 59, 76–83.
- 農林水産省. (1950). 昭和 25 年農林水産省令第 96 号.
- 農林水産省. (1984). 昭和 59 年 8 月 6 日農林水産省告示第 1542 号.
- 農林水産省. (2012a). 平成 24 年 1 月 4 日官報号外第 1 号.
- 農林水産省. (2012b). 平成 24 年 4 月 1 日農林水産省告示第 9 号.
- 農林水産省. (2014). 肉用牛の遺伝的不良形質のプロファイル.
http://www.maff.go.jp/j/chikusan/sinko/lin/1_katiku/index.html
- 農林水産省. (2015). 家畜改良増殖目標.
http://www.maff.go.jp/j/chikusan/kikaku/lin/1_hosin/pdf/h27_katiku_mokuhyo.pdf
- 農林水産省. (2018). 畜産をめぐる情勢.

http://www.maff.go.jp/j/chikusan/shokuniku/lin/hokyukin_kentoukai/attach/pdf/s_meguji.pdf#search=%27%E7%95%9C%E7%94%A3%E3%82%92%E3%82%81%E3%81%90%E3%82%8B%E6%83%85%E5%8B%A2%27

農林水産省. (2019). 畜産・酪農をめぐる情勢.

http://www.maff.go.jp/j/chikusan/kikaku/lin/l_hosin/attach/pdf/index-458.pdf

農林水産省. (2019). 都道府県別農業産出額家畜飼養状況 (令和元年 7 月).

http://www.maff.go.jp/j/chikusan/kikaku/lin/l_hosin/attach/pdf/index-448.pdf

農林水産省. (2019). 肉用牛の種類.

<http://www.maff.go.jp/j/chikusan/kikaku/lin/pdf/nikugyu.pdf>

小形芳美, 阿部浩之, 三澤隆, 高橋浩吉, 伴頭, 加藤敏英, & 酒井淳一. (1995). 黒毛和種子牛における周産期脂肪の原因と出生時体重. *Journal of Reproduction and Development*, 41, 77–81.

小川増弘, 宮下好広, 岩崎 敬, 吉澤 哲, 井出豊松, & 森山民紀. (2008). 和牛 (黒毛和種) の繁殖肥育一貫飼養体系を目指した実証的研究の取り組み (2) —哺乳子牛及び育成牛の飼養管理について—. *農業研究*, 21, 299-316.

大分県豊後牛生産者組織連絡協議会. (2011). おおいた肉用牛振興協議会.

http://www.jaoita.net/bungogyu_seisansya/work/pdf/201109.pdf

Olson, T. A. (1999). Genetics of colour variation. In: Fries R, Ruvinsky A (Eds), *The genetics of cattle*. (pp. 33-53). CAB International, Oxfordshire, UK.

大西知佳, & 佐藤正寛. (2014). デュロック種の繁殖形質における遺伝的パラメータの推定と乳頭数の選抜による繁殖形質改良の可能性. *日本養豚学会誌*, 51 (3), 152-158.

Opdecamp, K., Vanvooren, P., Rivière, M., Arnheiter, H., Motta, R., Szpirer, J., & Szpirer, C. (1998). The rat microphthalmia-associated transcription factor gene

(Mitf) maps at 4q34-q41 and is mutated in the mib rats. *Mammalian Genome*, 9, 617–21.

大澤剛史, 口田圭吾, 加藤貴之, 鈴木三義, & 三好俊三. (2003). 黒毛和種枝肉横断面の画像解析形質ならびに枝肉形質に関する遺伝的パラメータの推定. *日本畜産学会報*, 75 (1), 11-16.

小山秀美, 今村清人, 坂元信一, 西和隆, 井上慶一, 河邊弘太郎, 岡本新, 本多健, 大山憲二, & 下桐猛. (2017). 鹿児島県産黒毛和種における損傷発生状況に関する調査研究. *日本畜産学会報*, 88 (4), 425-430.

Oyama, K., Mukai, F., Yoshimura, T. (1996). Genetic relationships among traits recorded at registry judgment, reproductive traits of breeding females and carcass traits of fattening animals in Japanese black cattle. *Animal Science and Technology*, 67, 511-518.

Philipp, U., Lupp, B., Momke, S., Stein, V., Tipold, A., Eule, J. C., Rehage, J., & Distl, O. (2011). A *MITF* Mutation Associated with a Dominant White Phenotype and Bilateral Deafness in German Fleckvieh Cattle. *PLoS ONE*, 6, e28857.

Philipsson, J. (1976). Studies on Calving Difficulty, Stillbirth and Associated Factors in Swedish Cattle Breeds. II. Effects of Non-genetic Factors. *Acta Agriculturae Scandinavica*, 26, 165–174.

Protas, M. E., & Patel, N. H. (2008). Evolution of Coloration Patterns. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 24, 425-446.

Raaphael, A. (2014). *Linear Models for the Prediction of Animal Breeding Values*, 3rd Edition.

Randhawa, S. S., Uppal, S. K., B. Joshi, P. C., Randhawa, S. (2009). Epidemiological and clinicotherapeutic study of leucoderma in dairy cattle and buffaloes. *Veterinary*

Record, 164, 631-633.

- Rothschild, M. F., Cleave, P. S. V., Glenn, K. L., Carlstrom, L. P., & Ellinwood, N. M.** (2006). Association of *MITF* with white spotting in Beagle crosses and Newfoundland dogs. *Animal Genetics*, 37, 606–7.
- Ruvinsky, A.** (2012). Molecular genetics of coat colour variation. In: *The genetics of cattle* 2nd ed. (Garrick DG, Ruvinsky A eds.) 67-89. CAB International, Oxfordshire, UK.
- 迫悟, 山根乙彦, 浜本國治, 渡辺大直, & 林隆敏. (1983). 黒毛和種にみられた尋常性白斑 (*Vitiligo vulgaris*) の3例. *日本獣医師会報*, 36, 186-190.
- 佐々木義之. (1994). 動物の遺伝と育種.
- Steingrimsson, E., Copeland, NG. & Jenkins, N. A.** (2004). Melanocytes and the microphthalmia transcription factor network. *Annual Review of Genetics*, 38, 365–411.
- Tassabehji, M., Newton, V. E., & Read, A. P.** (1994). Waardenburg syndrome type 2 caused by mutations in the human microphthalmia (*MITF*) gene. *Nature Genetics*, 8, 251–255.
- Tsuruta, S., & Misztal, I.** (2006). THRGIBBS1F90 for estimation of variance components with threshold-linear models. *Proceedings of the 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, 27-31.
- Uematsu, M., Sasaki, Y., Kitahara, G., Sameshima, H., & Osawa, T.** (2013). Risk factors for stillbirth and dystocia in Japanese Black cattle. *The Veterinary Journal*, 198, 212–216.
- Van-Tassell, C. P., Wiggans, G. R., & Misztal, I.** (2003). Implementation of a sire-maternal grandsire model for evaluation of calving ease in the United States. *Journal*

of Dairy Science, 86, 3366–3373.

Willham, R. L. (1972). The role of maternal effects in animal breeding: III. Biometrical aspects of maternal effects in animals. *Journal of Animal Science*, 35, 1288–1293.

Wright, S. (1934). An analysis of variability in number of digits in an inbred strain of guinea pigs. *Genetics*, 19, 506-536.

横田祥子, 杉田春奈, 大友良彦, 須田義人, & 鈴木啓一. (2011). 黒毛和種牛肉における脂肪酸組成と枝肉形質及び肉質形質との遺伝的關係. *東北畜産学会報*, 60 (3), 80-85.

全国和牛登録協会. (1992). 新・和牛百科図説.

全国和牛登録協会. (2007). これからの和牛の育種と改良 改訂版.

全国和牛登録協会. (2017). 和牛登録事務必携.

全国和牛登録協会. (2019). 登録・検定事業について.

http://cgi3.zwtk.or.jp/?page_id=1247

全国和牛登録協会. (2019). 和牛 第 290 号.

全国和牛登録協会鹿児島県支部. (1989). 鹿児島和牛改良のあゆみ.