

2022/11/17

R4調査研究発表会

日本中央競馬会畜産振興事業

アミノ酸プロファイルによる不受胎牛の判別： 利点と欠点

不受胎牛の早期判別による分娩間隔の短縮

今川和彦(発表者)

松野雄太

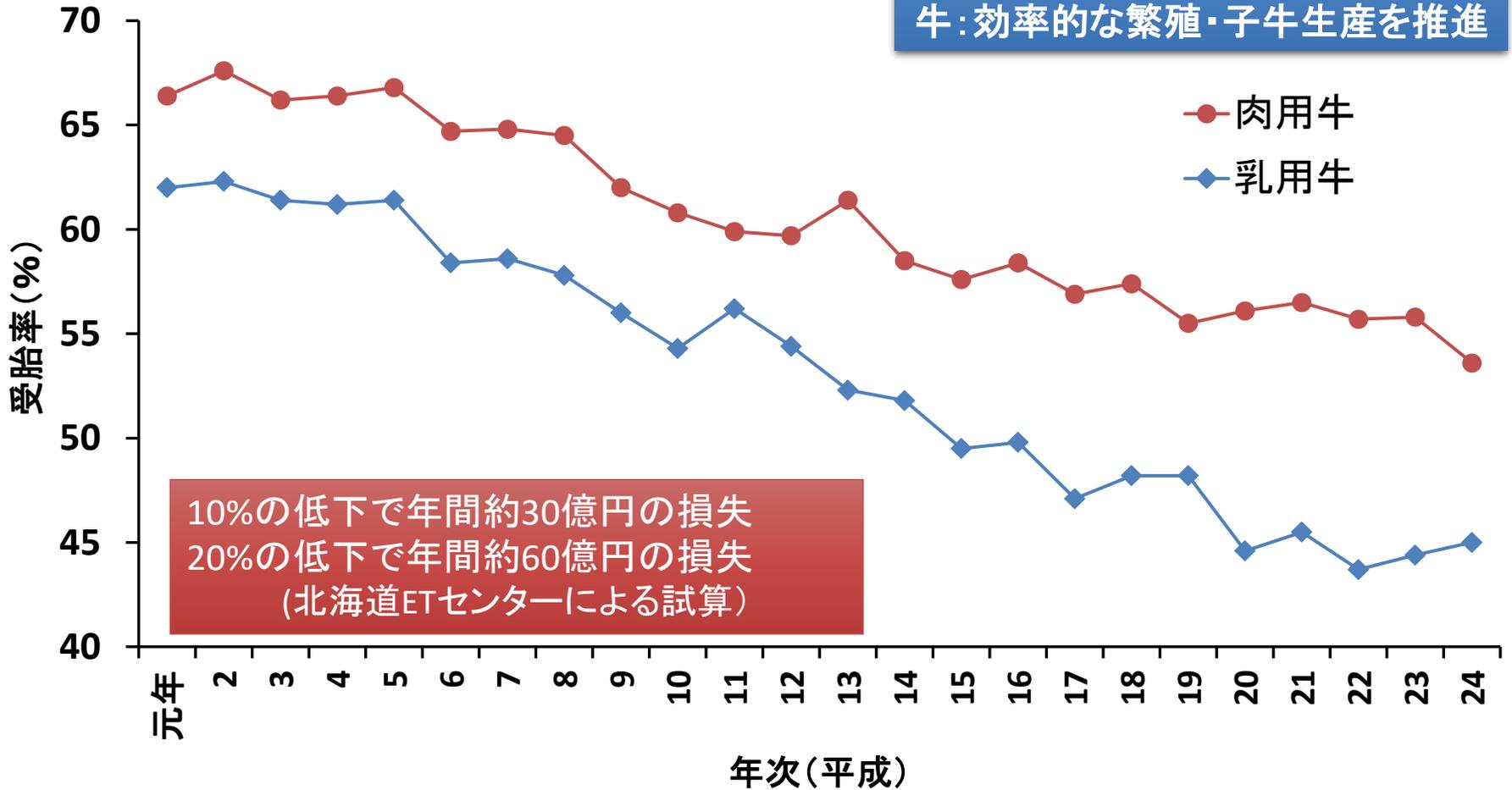
東海大学総合農学研究所

草間和哉

東京薬科大学

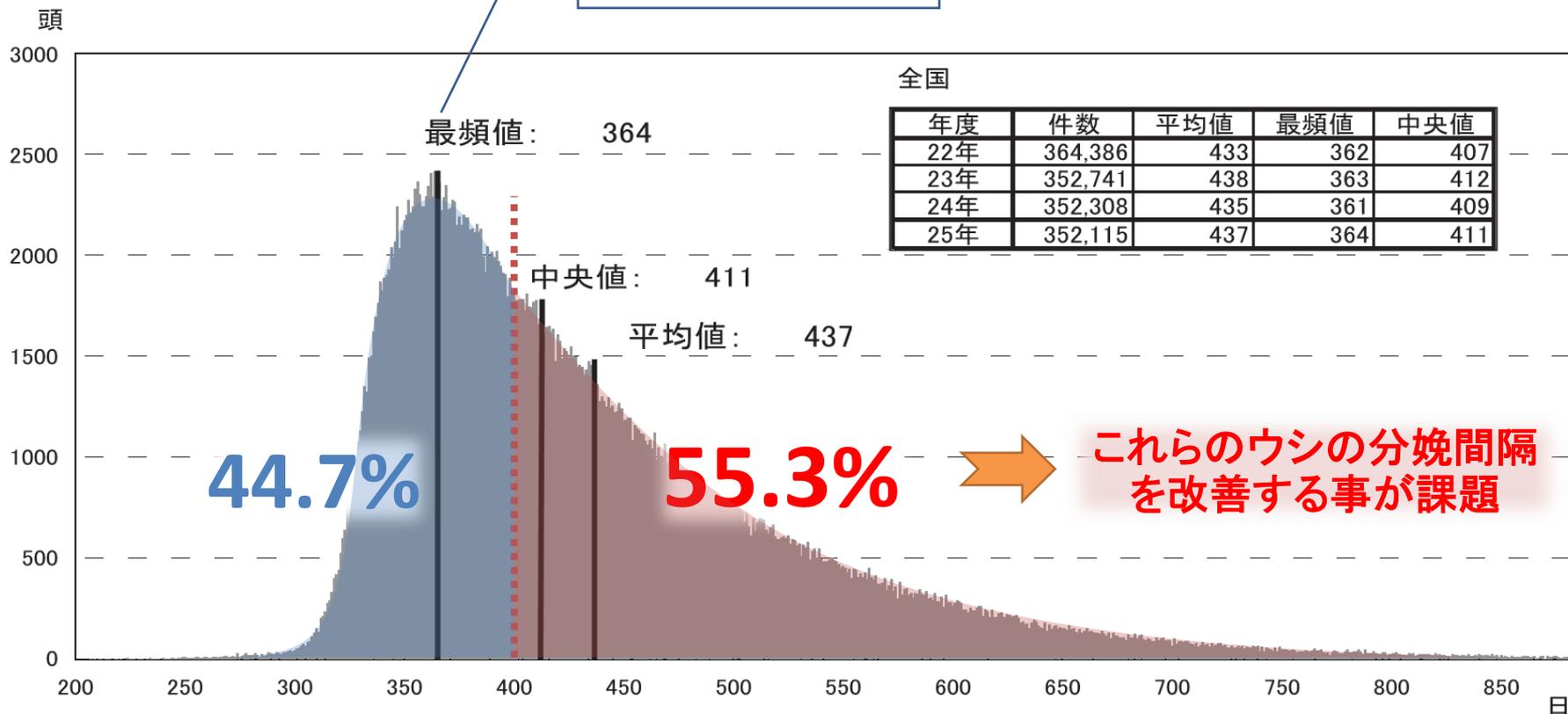
ウシ受胎率の現状

農水省
「家畜改良増殖目標」
牛：効率的な繁殖・子牛生産を推進



乳用牛の分娩間隔の度数分布

多くは1年1産



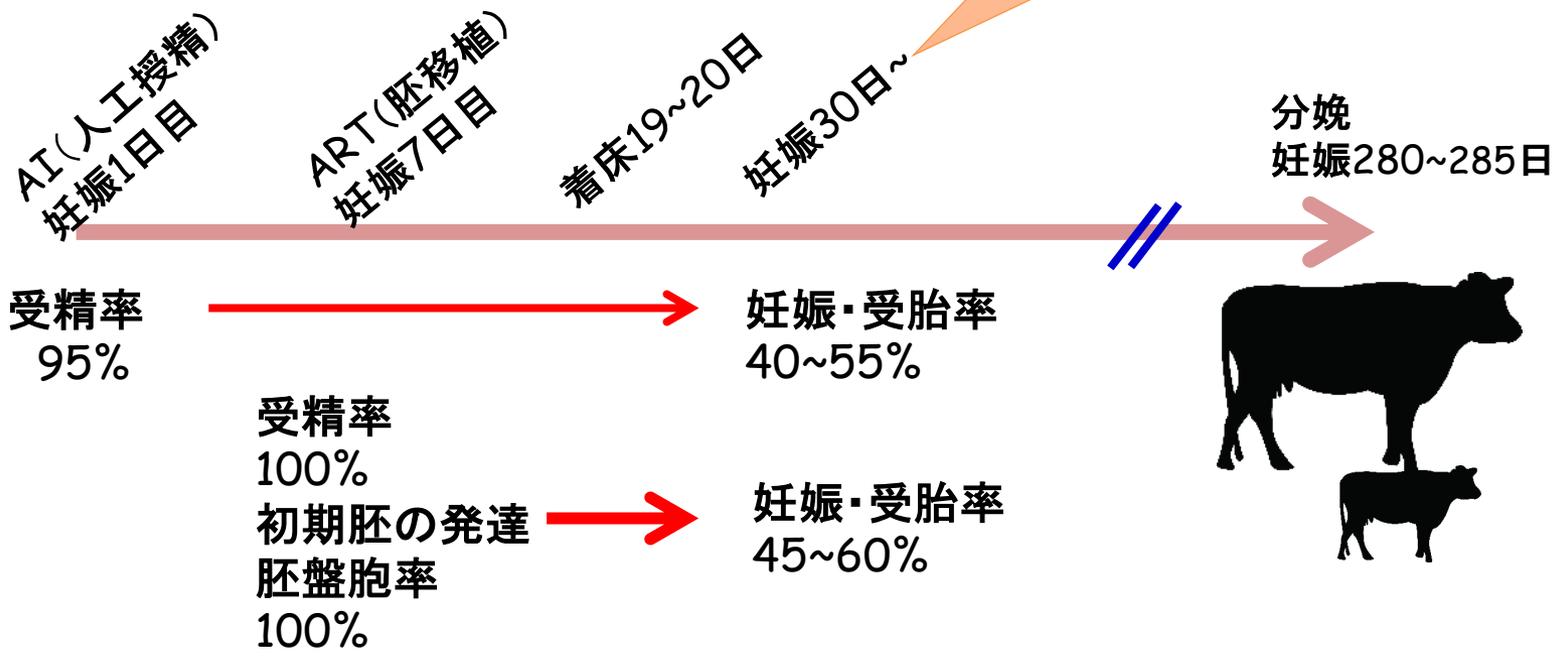
ウシの分娩間隔の延長は空胎期間の延長によるものである

ウシの空胎日数を改善する事が課題

空胎日数の短縮

早期胚死滅の減少⇒受胎率の向上

- 触診
- 超音波診断法
- プロゲステロン濃度測定
- ELISA法(PAGなど)
- 簡便な方法？

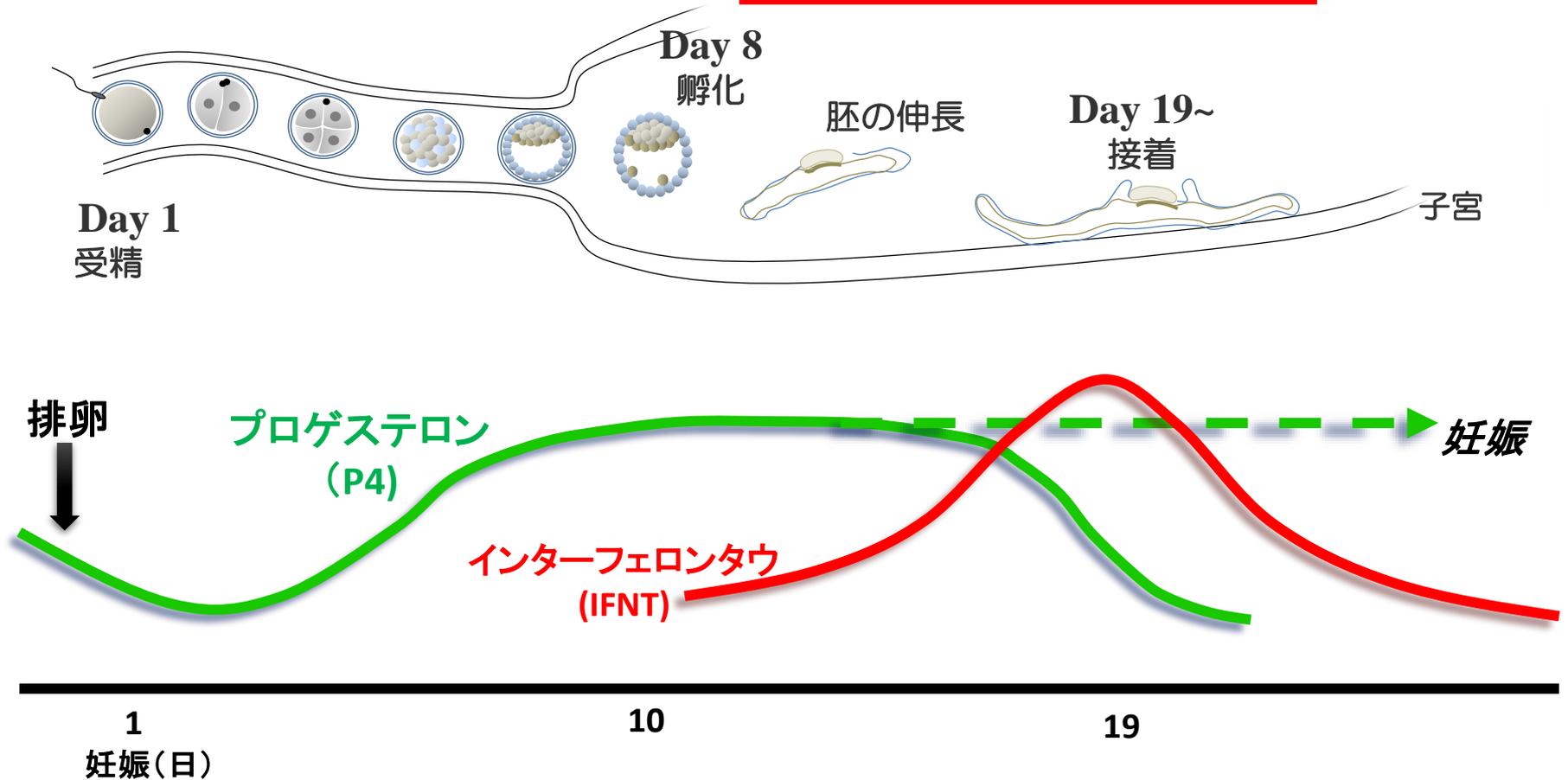


妊娠には性周期、排卵、受精や初期胚の発達が絶対条件であるが、

妊娠の成立には「**着床**」や「**胎盤形成**」が必須である

「着床」の制御こそが、「妊娠」の制御である

この期間に妊娠が不成立となる



妊娠鑑定剤の開発のためには、プロゲステロンとIFNTに制御される子宮内因子群とそれに呼応する血清因子の特定が必須となる

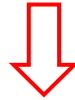
ウシ妊娠17~20日・胚着床期の子宮内環境の構築

子宮灌流液に、受胎・不受胎のための因子が存在する

子宮内環境を血中から測れないか？

その中に、受胎・不受胎を判別のための因子が存在する？

早期胚死滅を避け、胚を順調に伸長させるためには？

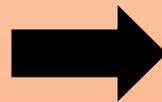


子宮内遺伝子発現・子宮灌流液の解析、候補因子群の抽出

子宮内環境を反映する血中タンパク性因子はあるか？

受胎判別候補因子の存在とその同定

妊娠ウシ子宮灌流液や血液
(D17 vs. D20 vs. 22)

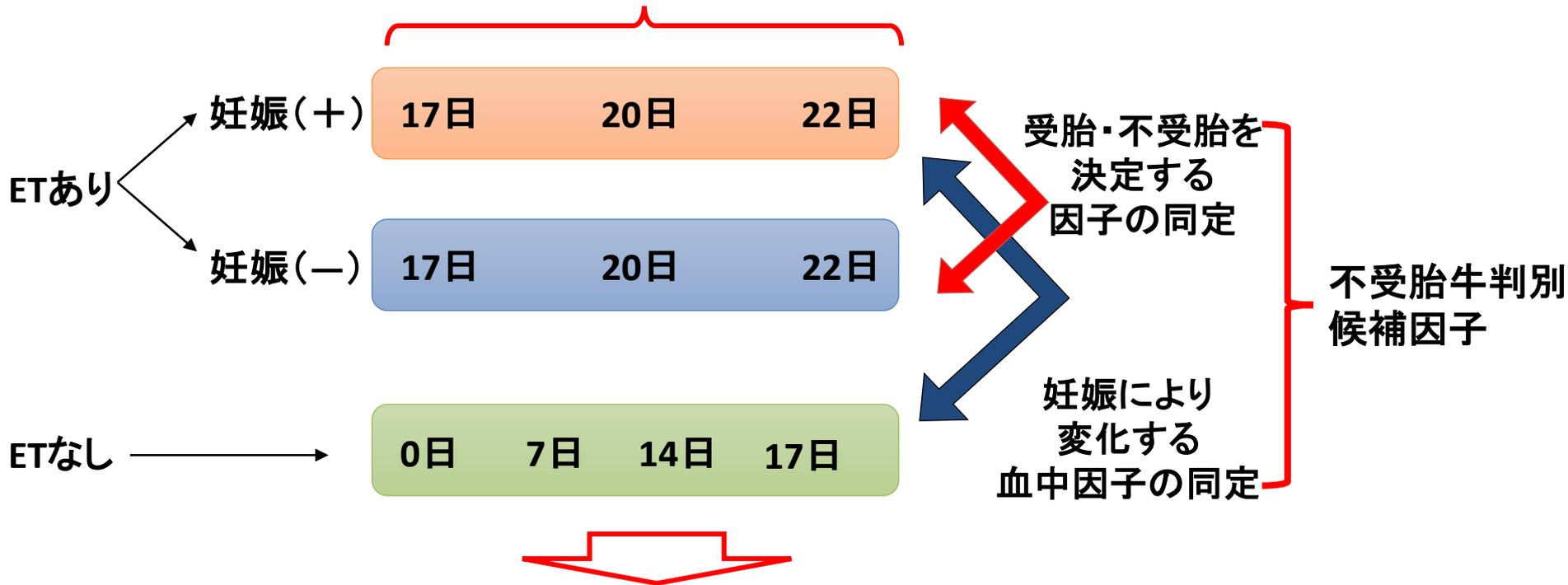


網羅的タンパク質解析
アミノ酸解析

不受胎牛判別法開発のための指標探索

子宮内と血清の共通因子の同定 → 血清因子による不受胎牛判別法の開発

着床前後により変化する因子の同定

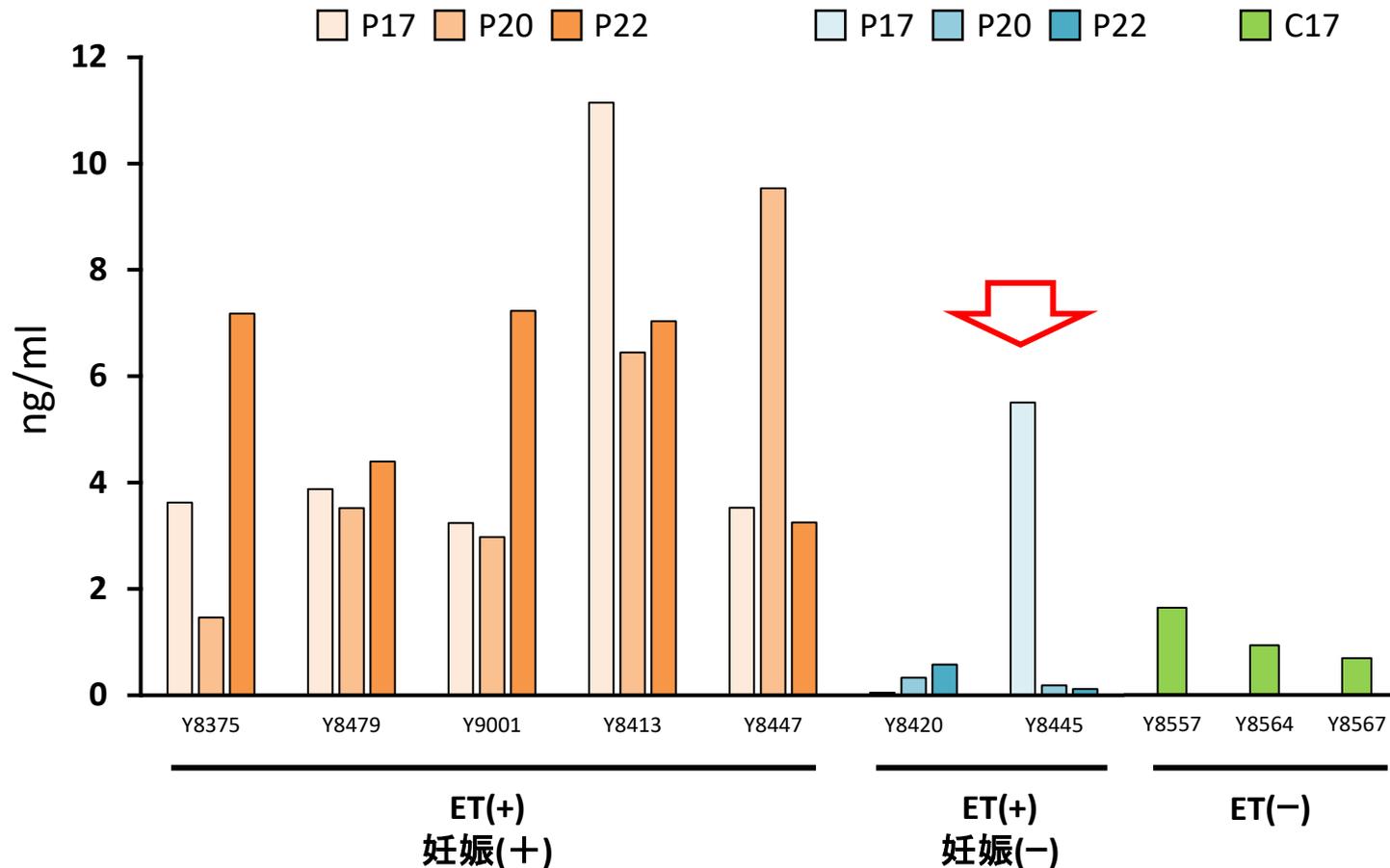


iTRAQ・メタボローム解析による全因子の同定をおよび定量

ウシ血清サンプルは、共同研究グループである北海道JA全農ET研究所より供与

ウシ血清中プロゲステロン濃度：妊娠13日vs.20日の判別可能性

死滅胚には、胚伸長しえないものも胚伸長できるものも存在する



早期死滅胚の中には**胚の伸長**をしているものが存在する

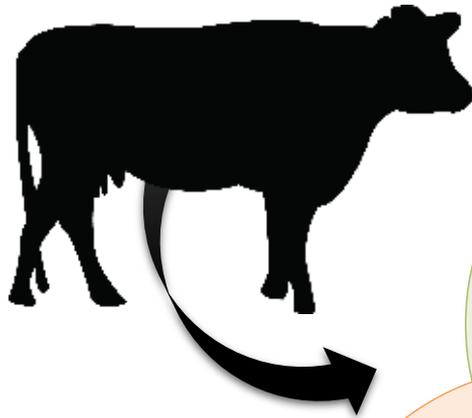
⇒伸長胚が着床できない可能性あり

⇒妊娠13日での不受胎牛判別は、胚伸長しえない牛は判別できるが伸長後に胚死滅に至る不受胎牛を判別できない

不受胎牛早期判別法開発のための研究戦略

血清と子宮内共通因子の探索が必要

子宮・胚組織中の全発現因子の解析



子宮組織
胚組織
遺伝子発現

機能性
候補
因子群の
同定

血清

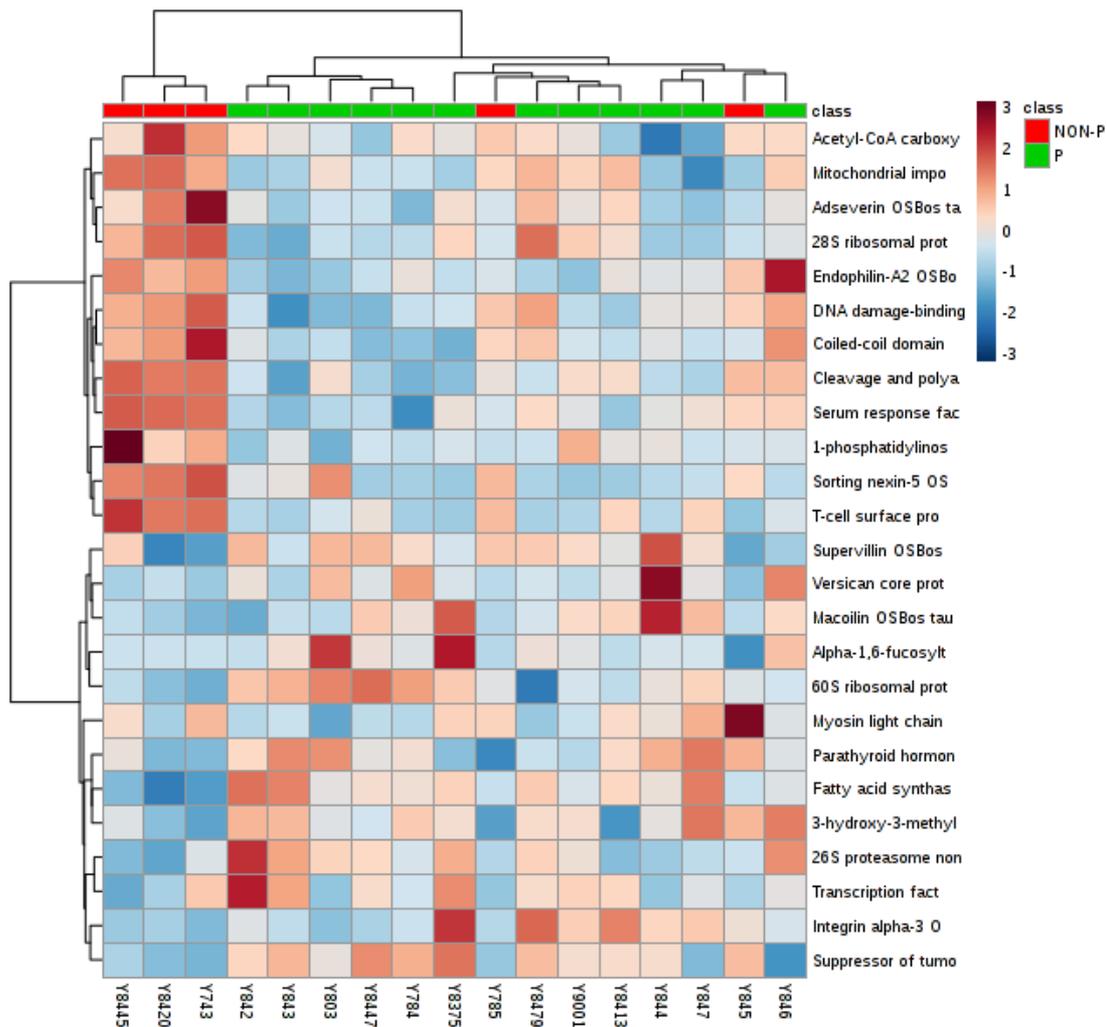
子宮
灌流液

血液中因子の探索

子宮内環境の精査

子宮内遺伝子発現に裏打ちされた子宮灌流液因子と血清中から共通因子を抽出⇒候補因子の特定

Day22 serum iTRAQ heat map

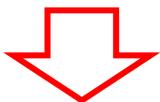


一連の解析から20種類のタンパク質候補因子を抽出⇒ウエスタンブロット解析

iTRAQ解析

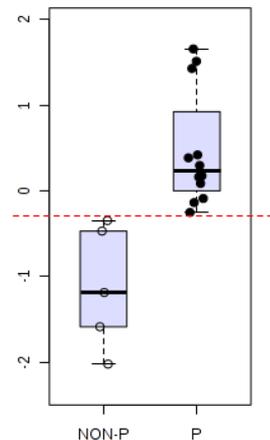
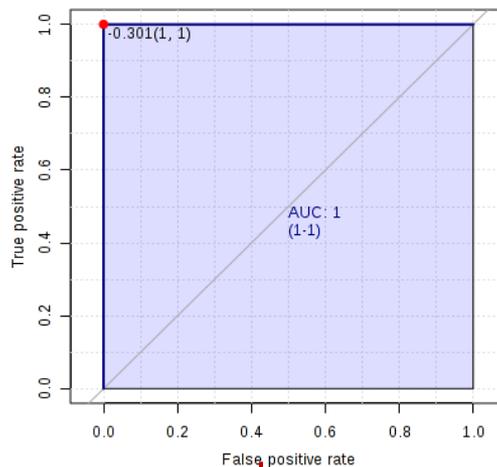
FAS
: Fatty acid

タンパク質性因子群



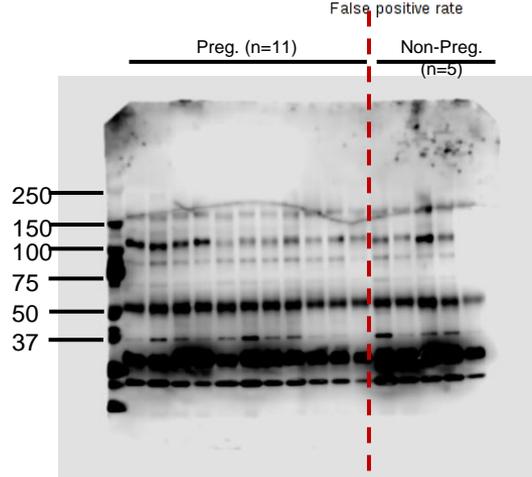
簡便法開発 (ELISA) の
ための
ウェスタンブロット解析

Fatty acid synthase OSBos taurus GNFA SN PE2 SV1 - FAS_BOVIN

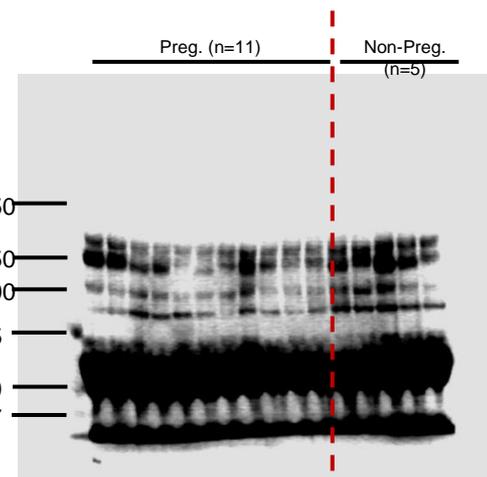


Western blot

Antibody: **FAS**
Molecular weight: **273 kD**
Dilution: **1:500**



I : Alubumin (-)



II : Alubumin (+)

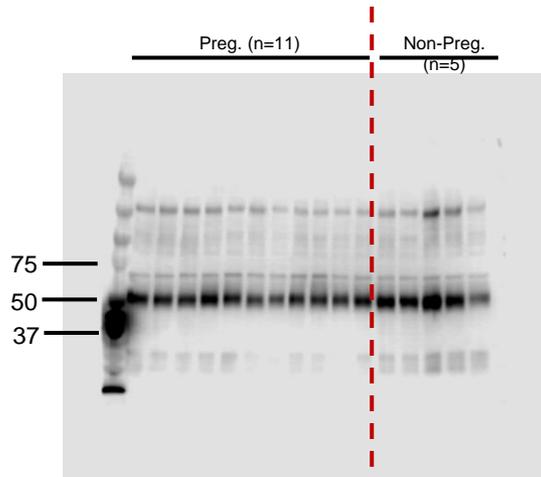
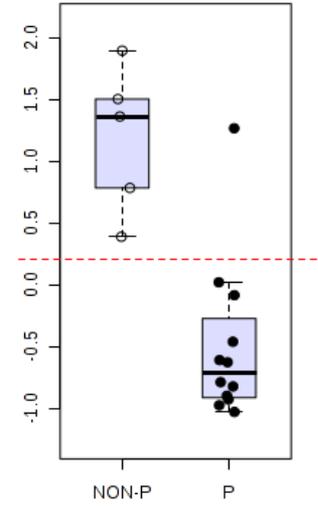
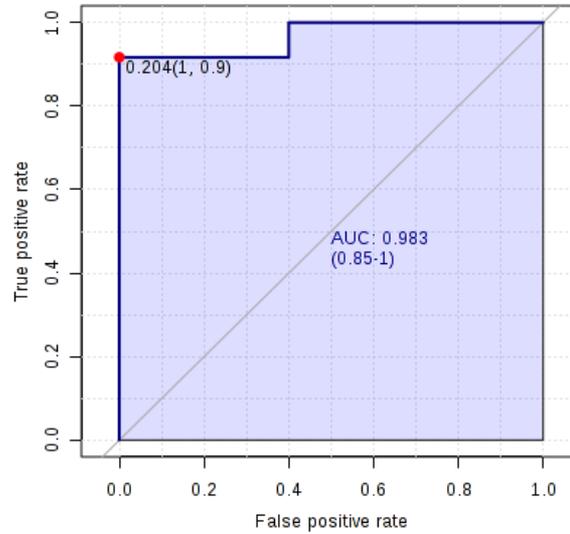
検出できなかった

SNX5 : sorting nexin 5

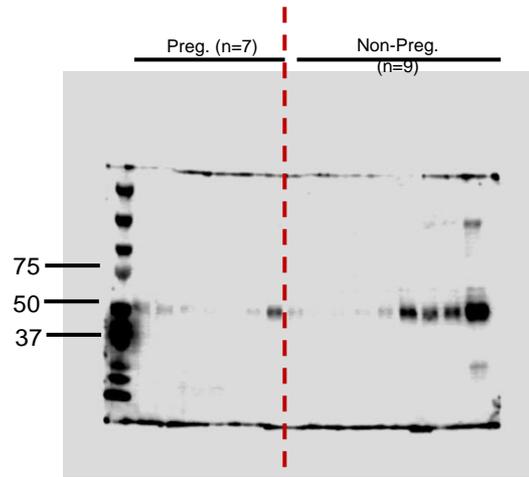
Sorting nexin-5 OSBos taurus GNSNX5 PE2 SV1 - SNX5_BOVIN

Western blot

Antibody: **SNX5_new**
Molecular weight: **47 kD**
Dilution: **1:500**



Alubumin (-)

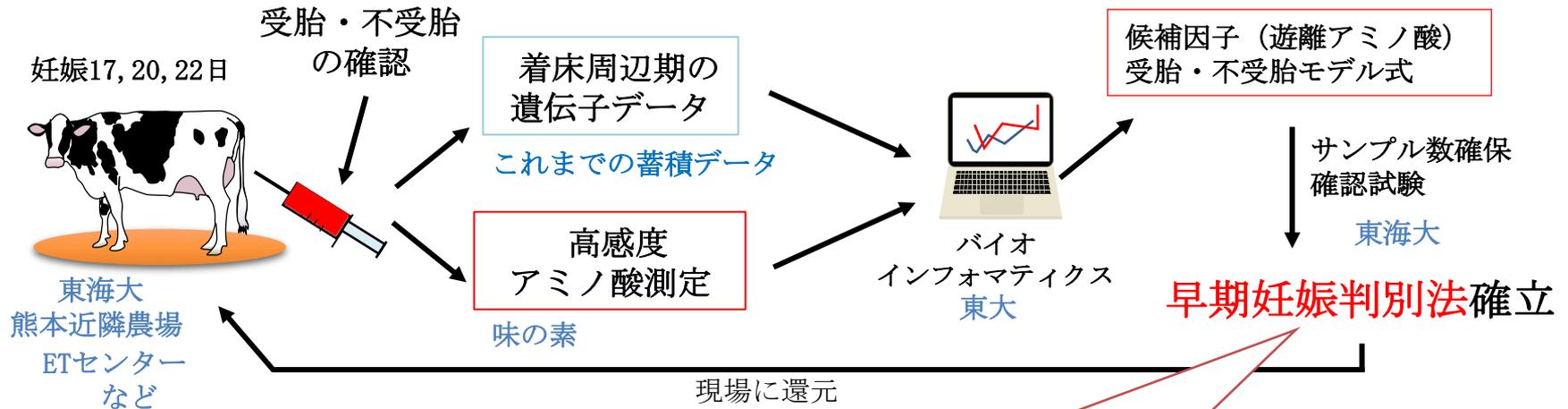


AI

検体数が増えれば
検出が可能
かもしれない

血中タンパク質因子での受胎・不受胎牛判別は難しい

JRA畜産振興 アミノ酸プロファイルによる不受胎牛の判別事業



健康状態が変わると
血液中のアミノ酸濃度バランスが変化

健康状態が変化

(イメージ図)

■ 疾患と血液中のアミノ酸濃度バランスの相関を示す文献

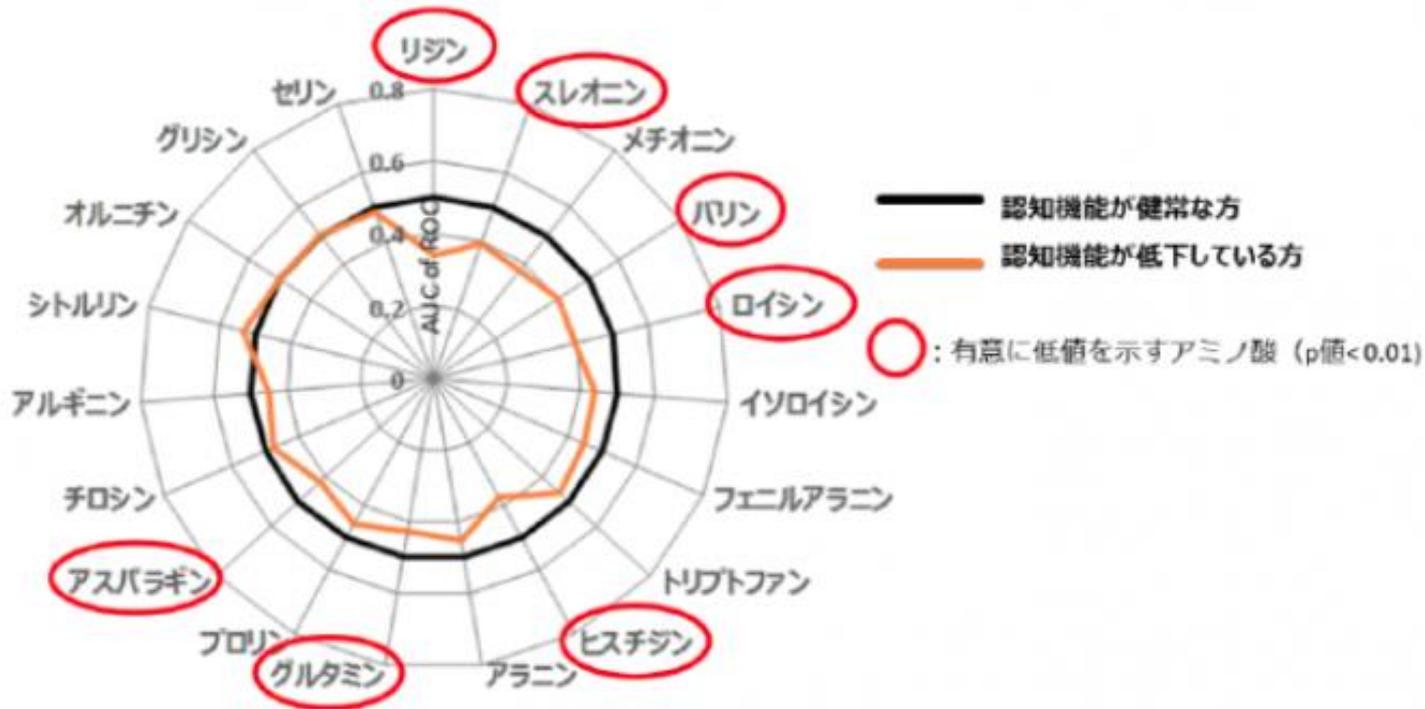
- がん
Watanabe, et al. (1984), Weinlich, et al. (2007)
- 肝疾患
Holm, et al. (1999), Ferenci and Wewalka (1978), Soeters and Fischer, (1976)
- 循環器病
Obeid (2005)
- 自己免疫疾患
Gerber (1975)
- 腎不全
Hong, et al. (1998)
- 糖代謝異常
Ohtsuka and Agishi (1992), Soltész, et al. (1978)
- 神経変性障害
Mochizuki, et al. (1996)

「アミノインデックス技術」とは、この血液中のアミノ酸濃度バランスの変動に着目し、現在の健康状態やさまざまな病気の可能性を評価する技術です。

アミノ酸プロファイルによる不受胎牛の判別事業

様々な病態ではアミノ酸バランスの変動の報告・定着

<認知機能が低下している方の血液中のアミノ酸濃厚バランス>



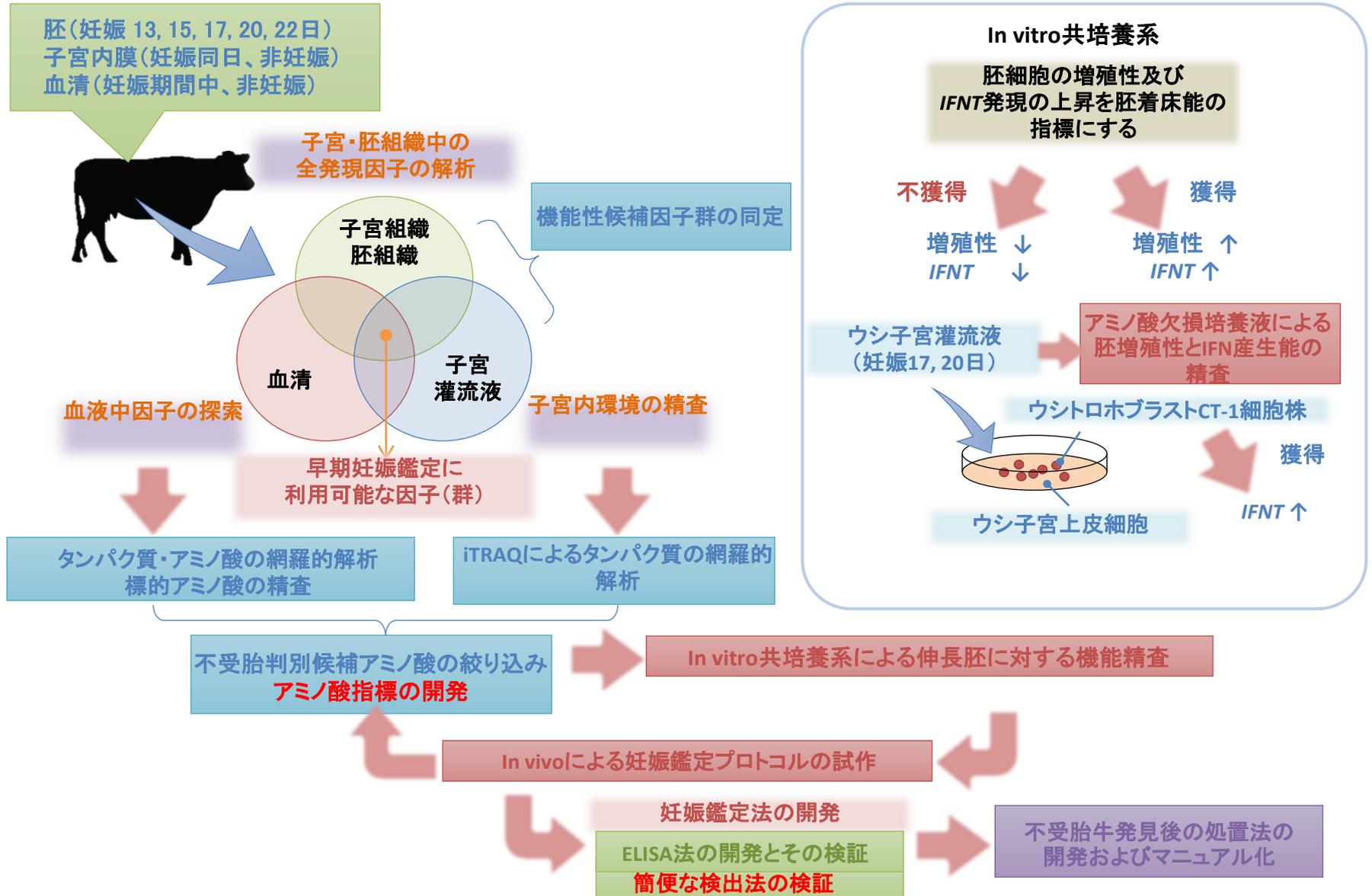
妊娠は病気ではない ⇒ 子宮内で初期胚や胎児が成長する



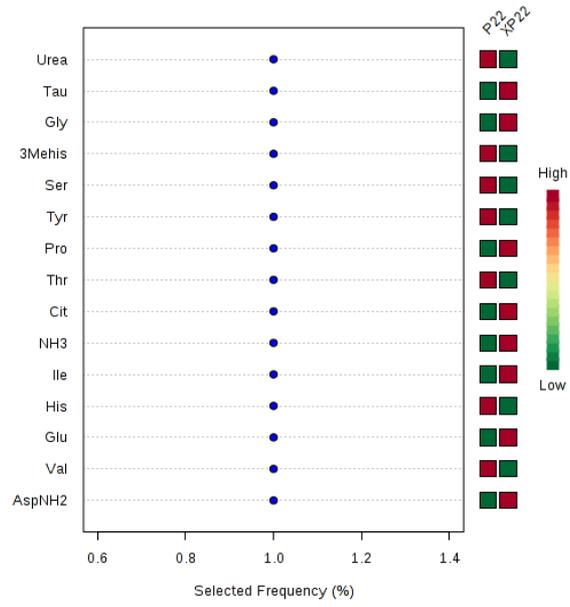
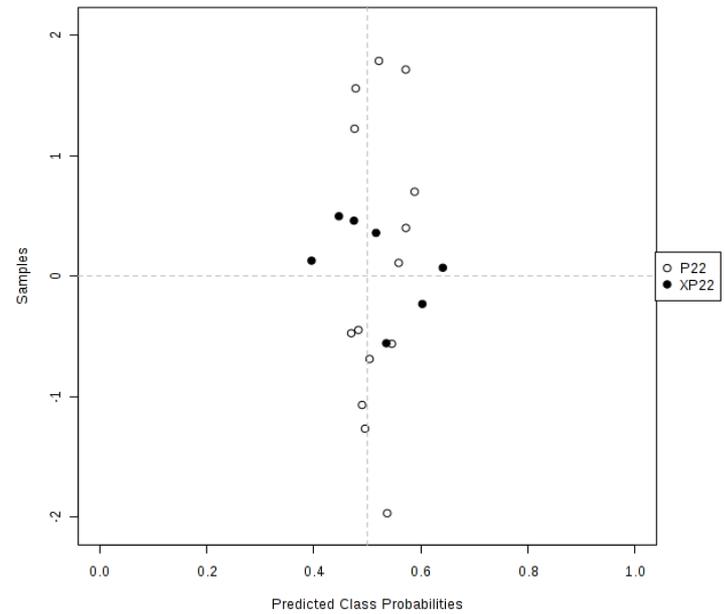
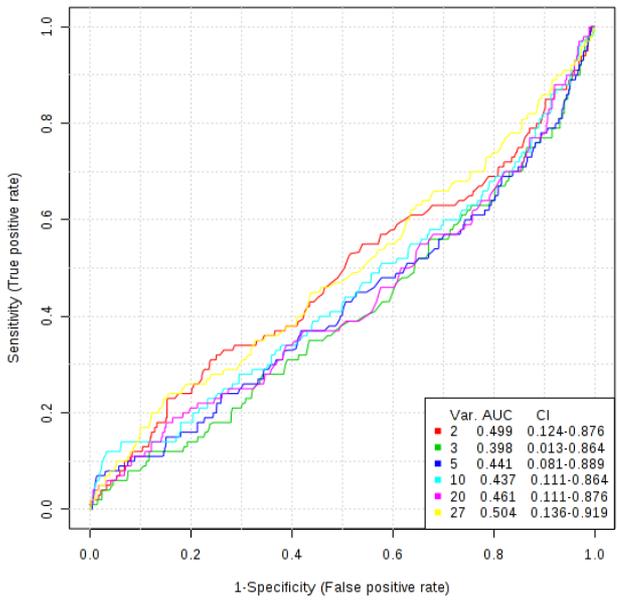
子宮内で胚が伸長する時期にはアミノ酸バランスが変動する可能性あり

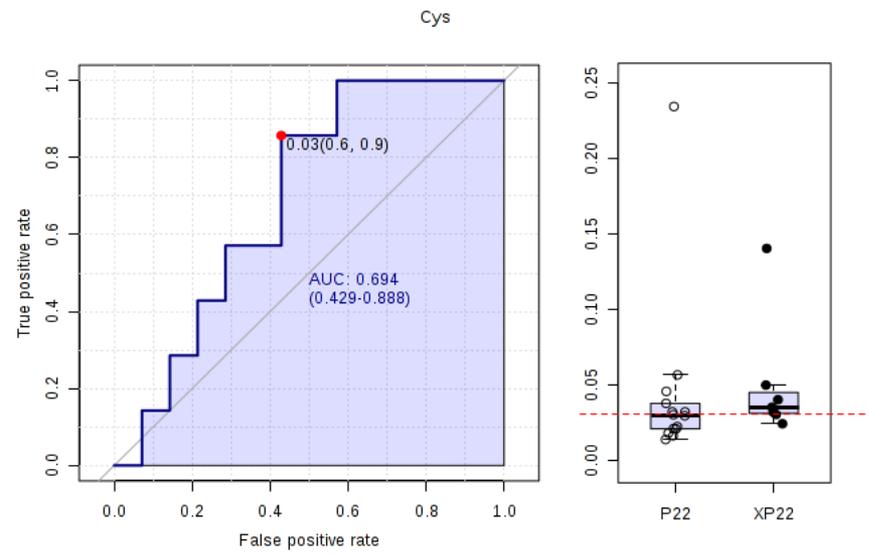
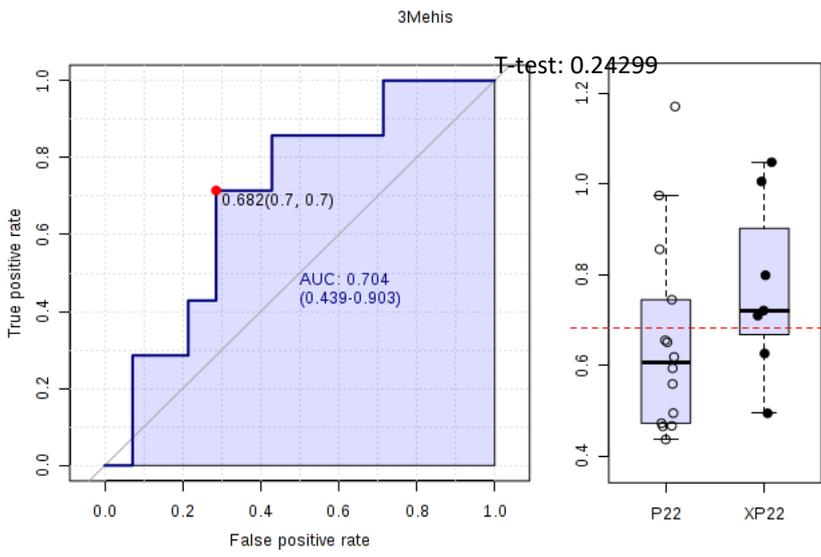
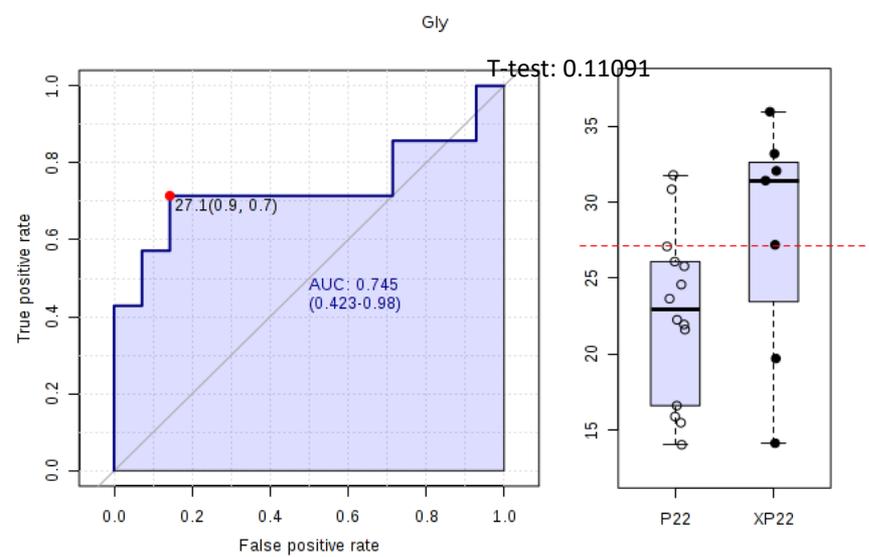
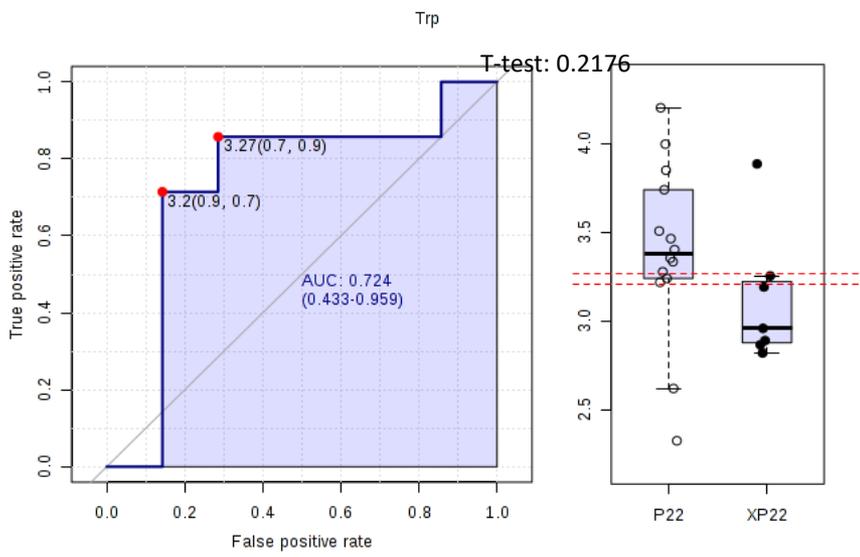
アミノ酸プロファイルによる不受胎牛の判別事業

偶然を避けるために共培養系を用い科学的な裏付け

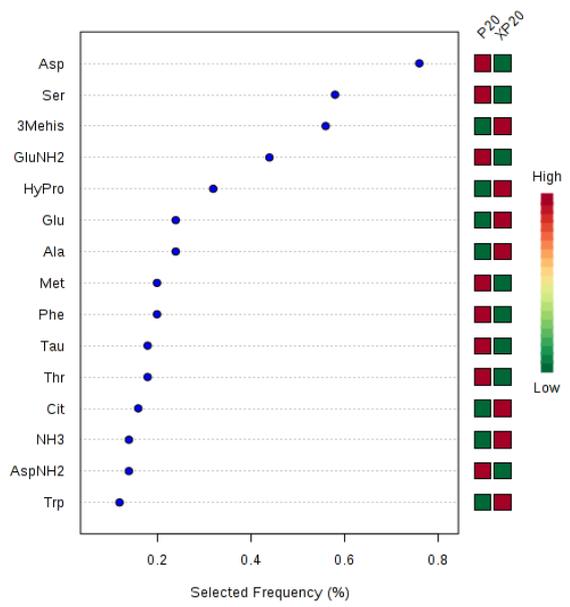
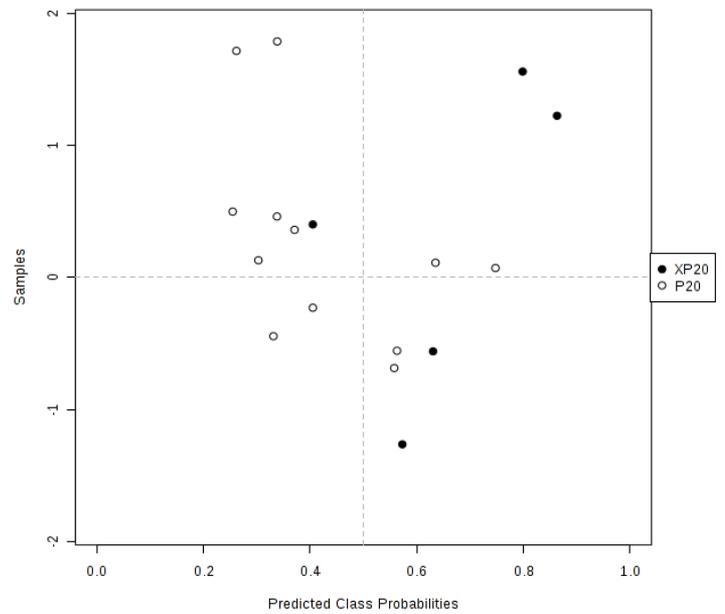
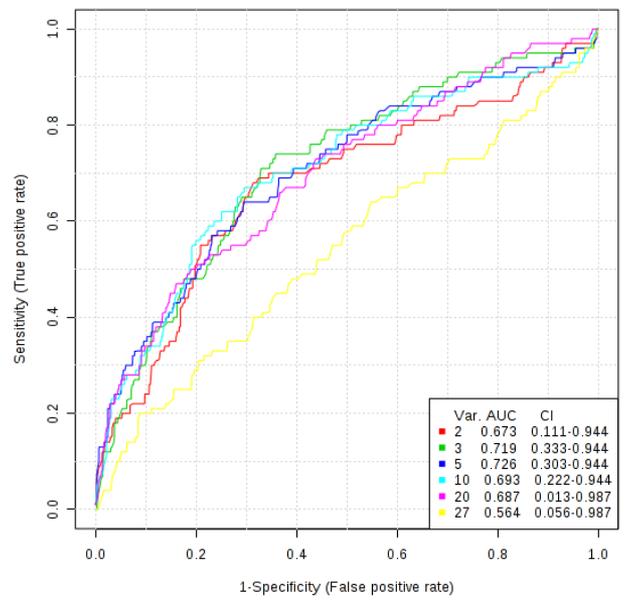


P: 受胎
XP: 不受胎

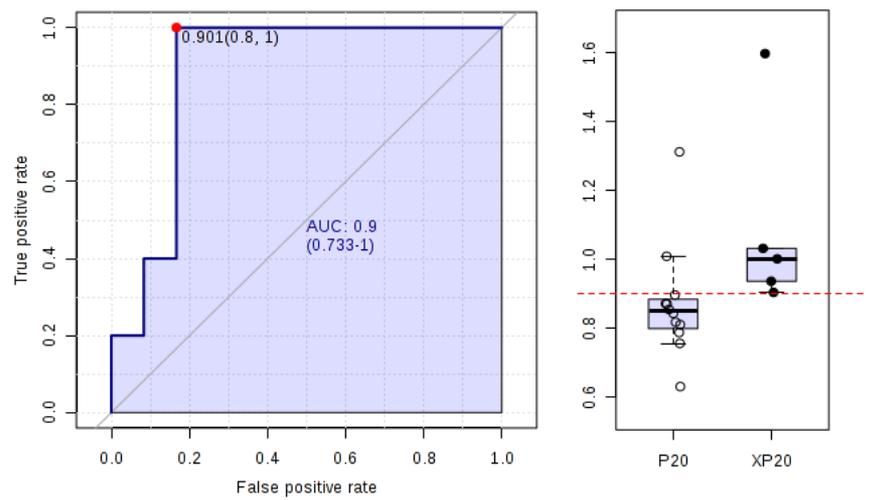




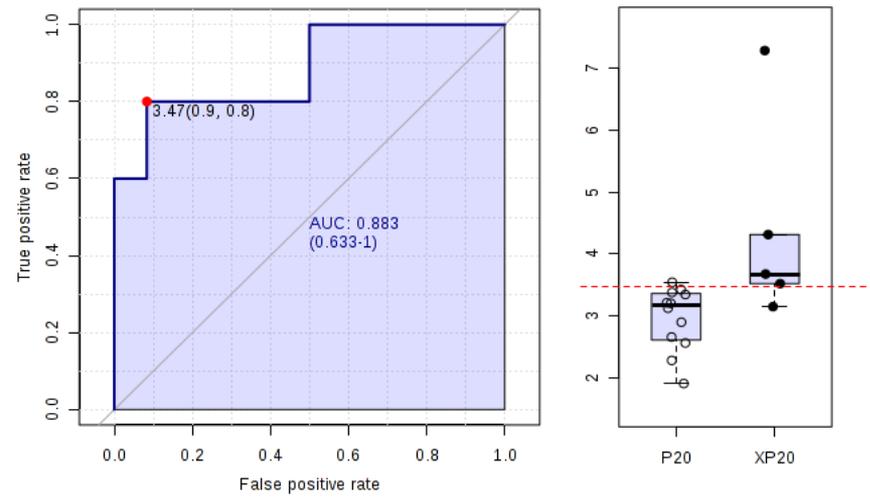
AUC > 0.8をマーカー候補



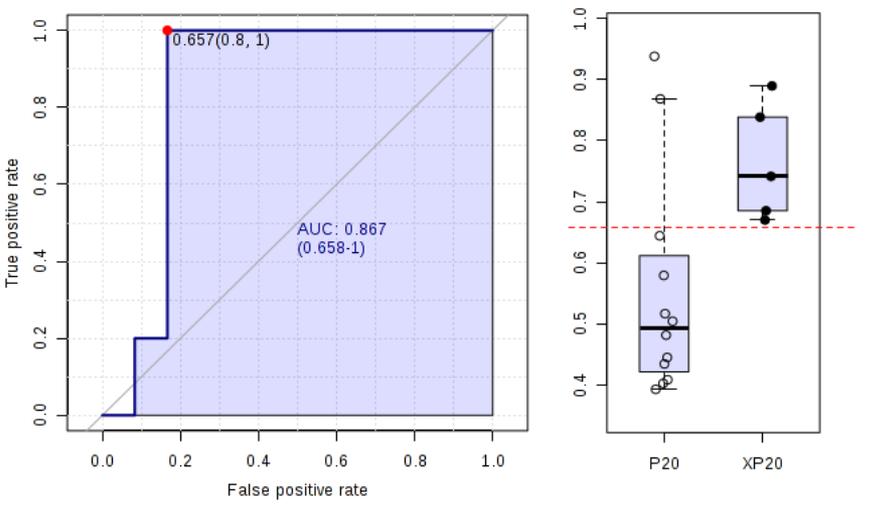
Asp T-test: 0.058757



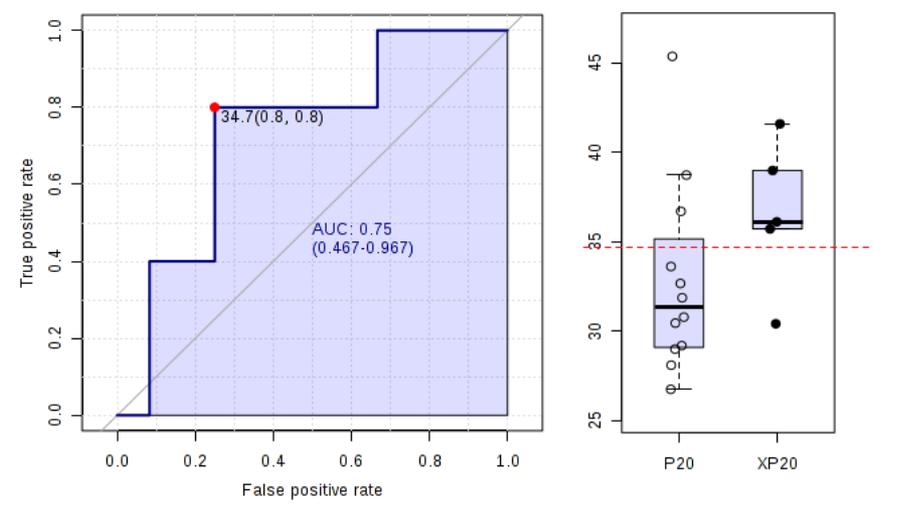
HyPro T-test: 0.014257



3Mehis T-test: 0.02619



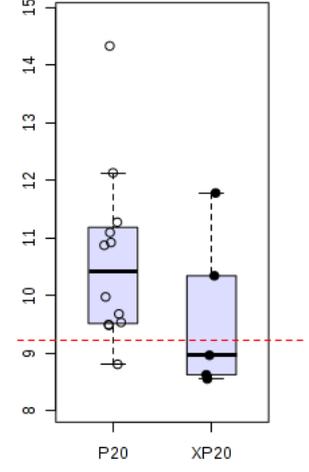
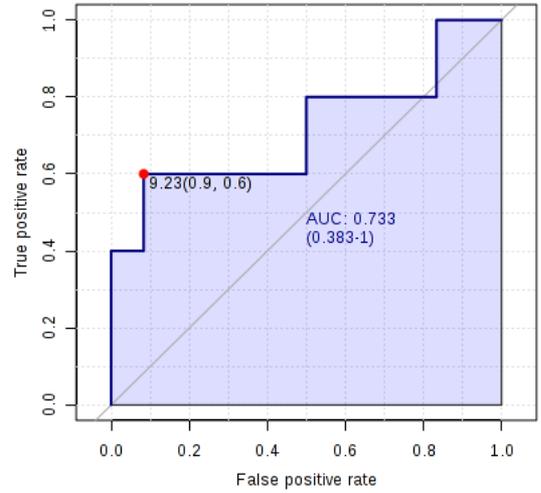
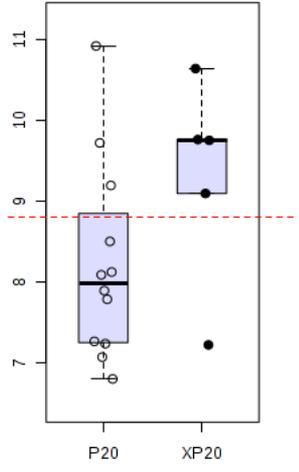
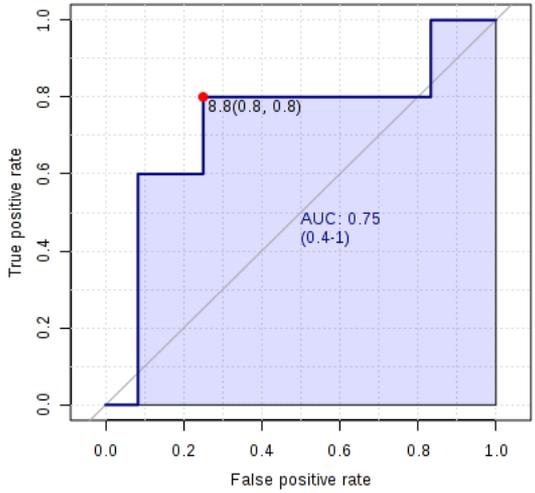
GIuNH2 T-test: 0.17447



AUC > 0.8をマーカー候補

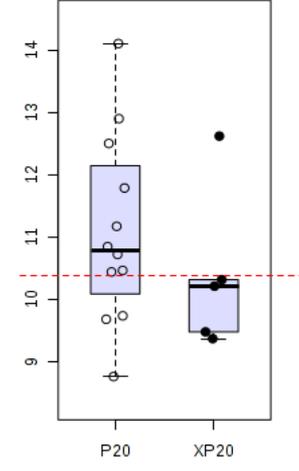
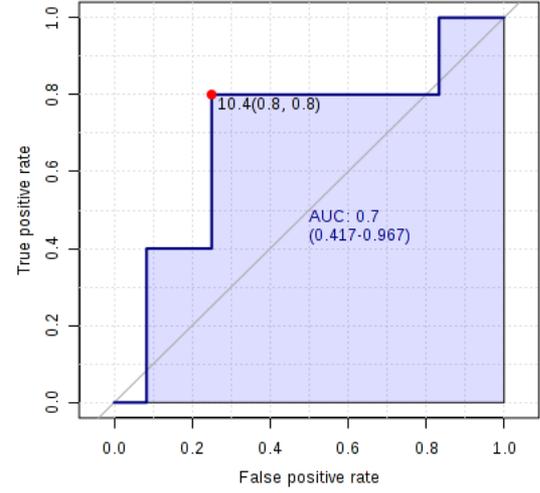
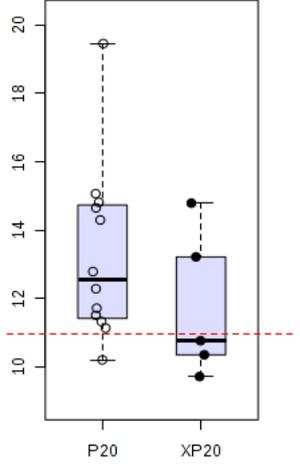
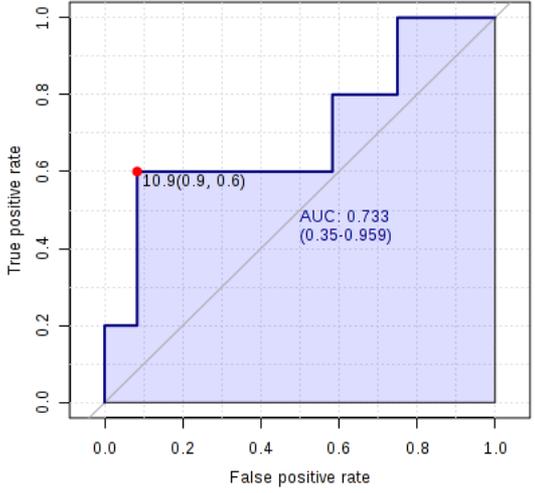
Ser T-test: 0.12048

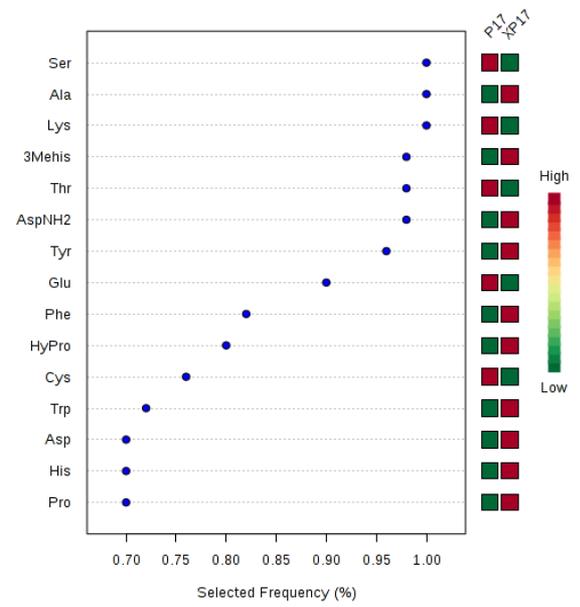
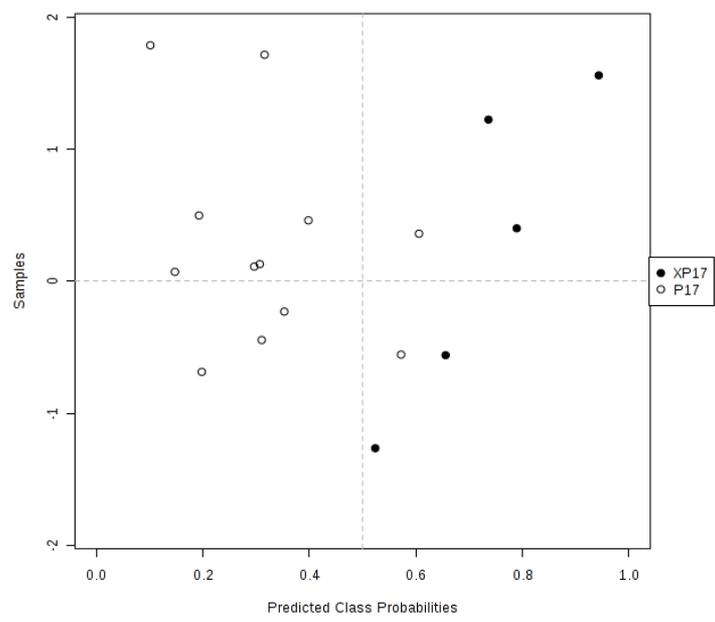
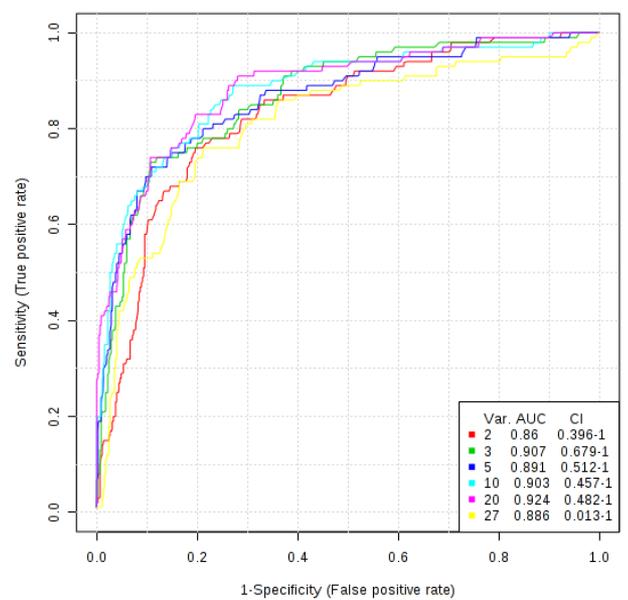
Ile



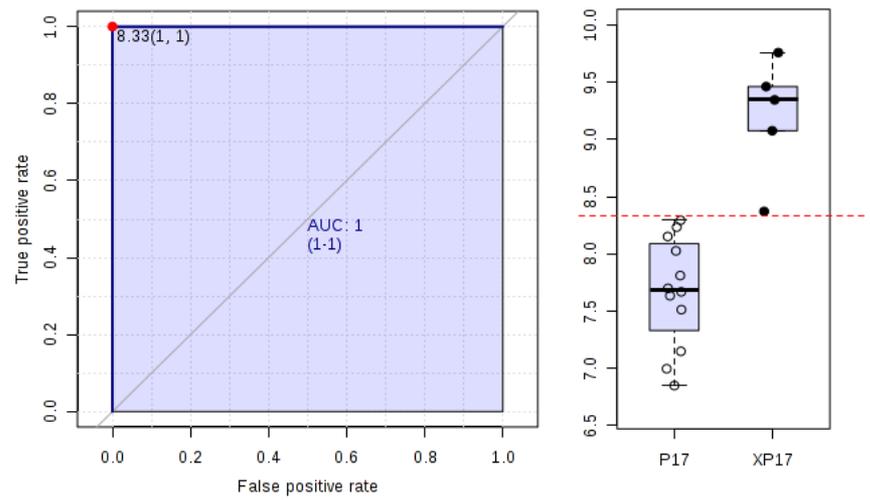
Leu

Lys

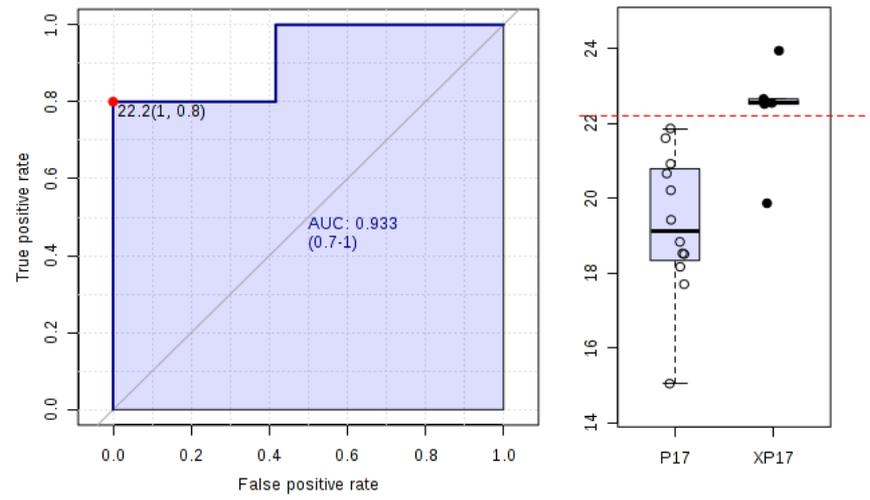




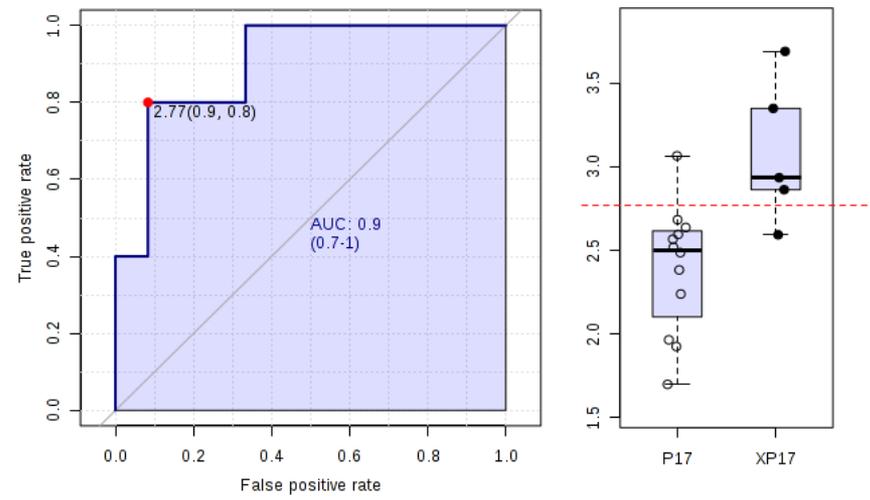
Ser T-test: 0.000030797



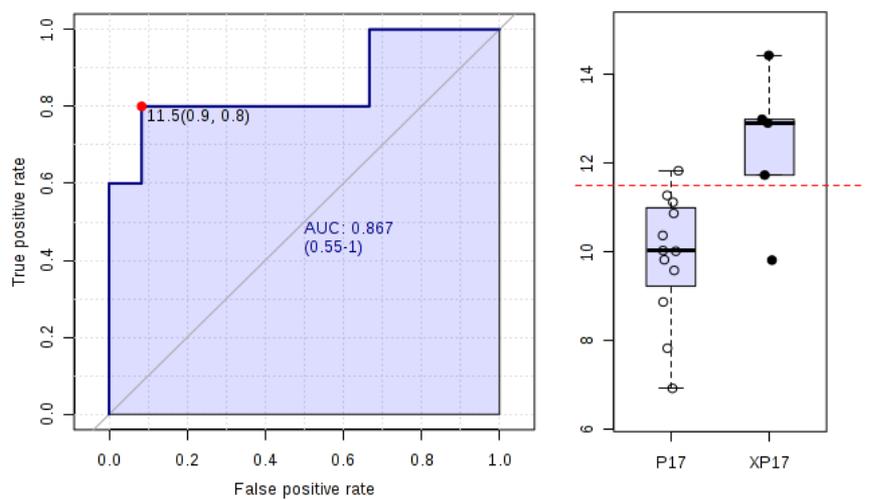
Ala T-test: 0.0070078



AspNH2 T-test: 0.0051614

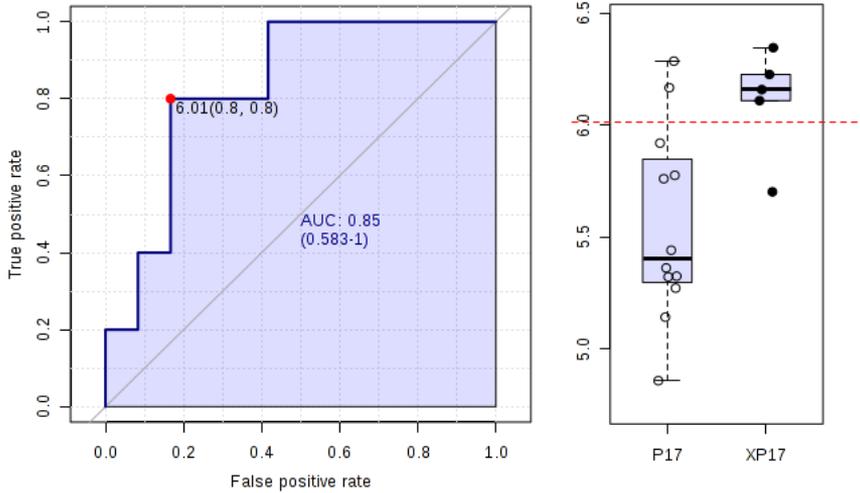


Lys T-test: 0.0074065

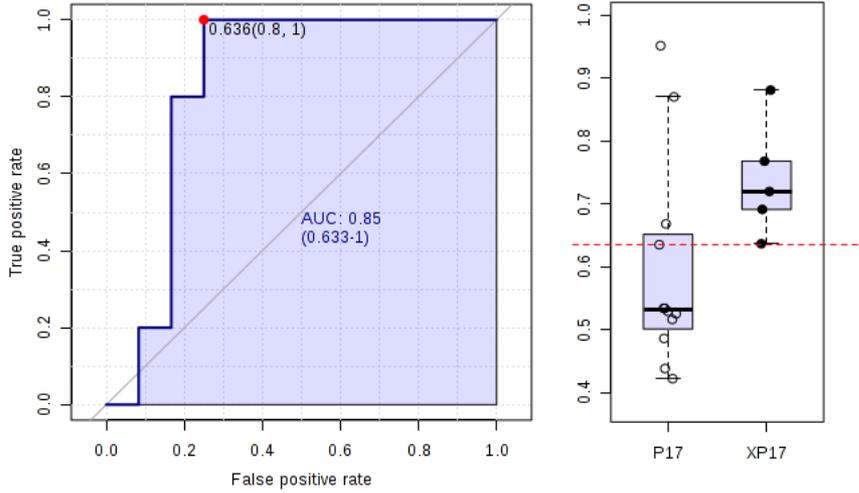


AUC > 0.8をマーカー候補

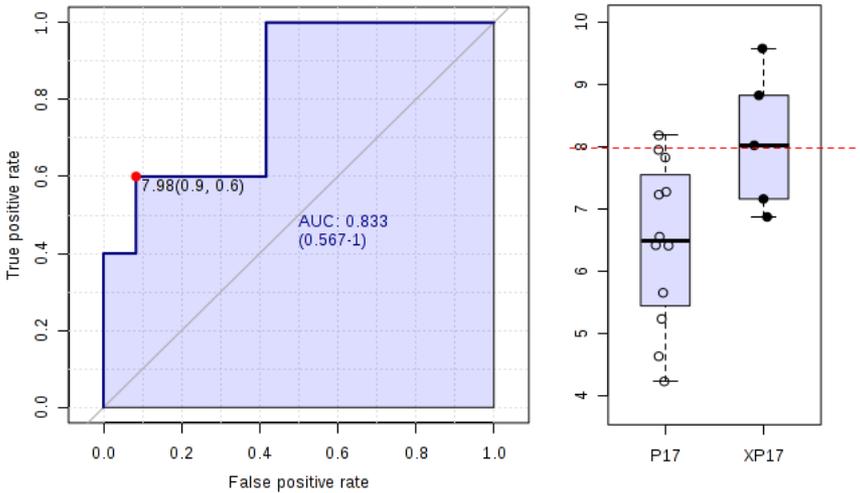
Phe T-test: 0.016861



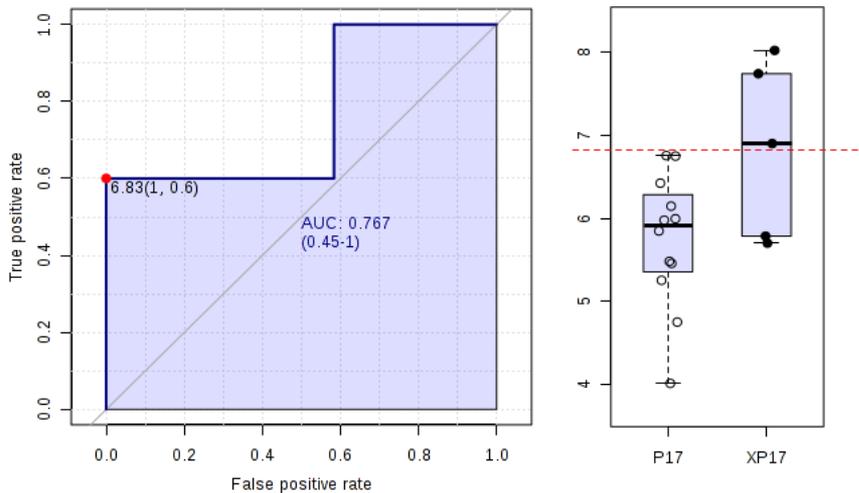
3Mehis T-test: 0.083925



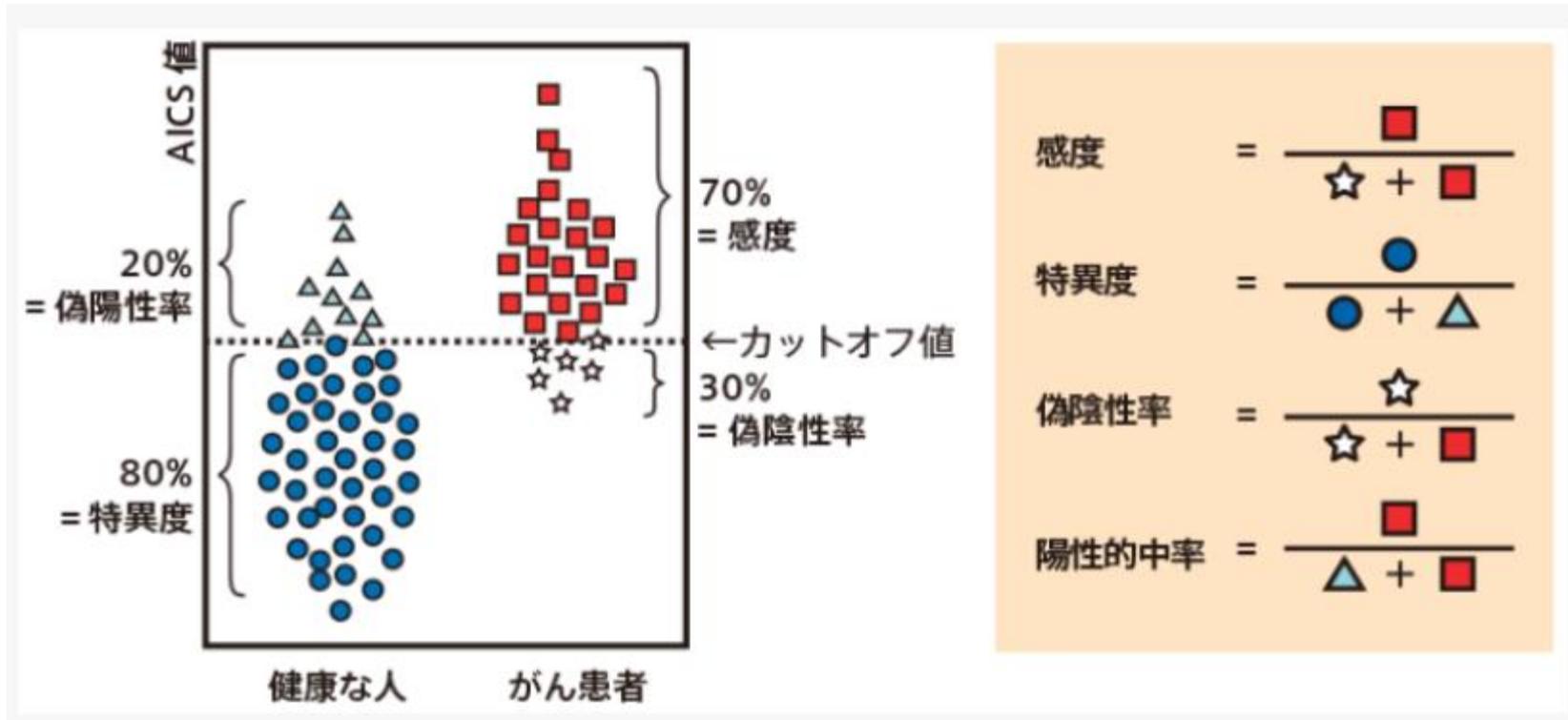
Thr T-test: 0.028703



Tyr T-test: 0.035102



AICS値 (AminoIndex Cancer Risk Screening値)



カットオフ値

アミノ酸の種類と量で、受胎・不受胎牛を振り分ける値

例: カットオフ値より高い値を示す牛を不受胎、低い値を示すものを受胎牛

特異度

受胎牛でカットオフ値よりも低い値を示している牛の割合

⇒ 受胎牛を正しく受胎牛と判別できる割合

感度

不受胎牛でカットオフ値よりも高い値を示している牛の割合

⇒ 不受胎牛を正しく不受胎牛と判別できる割合

妊娠13日、15日、17日、20日および22日のアミノ酸プロファイルを検証した結果

いずれの採血ポイントにおいてもn数が両群30以上でないため、AUC>0.7以上であっても、**それが偶然ではないと言い切れない**

AUC>0.7のアミノ酸が一番多いのは13dおよび20d⇒判別の可能性が最も高いのは20d

複数項目での判別可能性を評価するために、**各群n=50以上で評価する必要あり**

	13d	15d	17d	20d	22d
不受胎牛 (n数)	9	9	14	15	15
受胎牛 (n数)	30	30	42	20	57
AUC>0.7のAA数	3	2	0	3	0
AUC>0.7のAA/TAA数	4	0	0	6	0
AUC>0.7のEAA/TEAA, NEAA/TNEAA数	2	0	1	4	0



AUC: Area Under the Curve

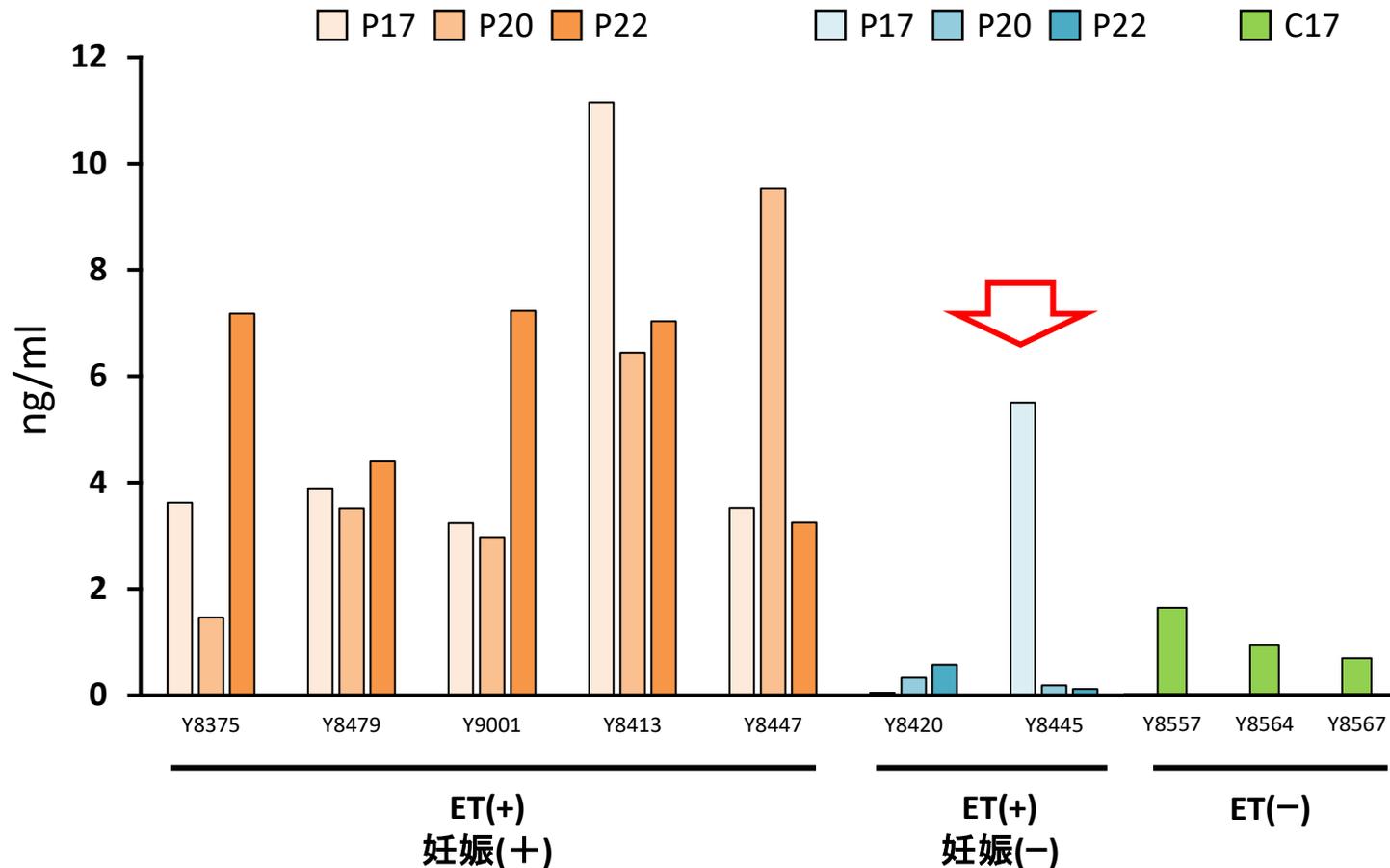
血中濃度×時間: 最高血中濃度(Cmax)や半減期(t1/2)

AUC値が高ければアミノ酸の種類と量の信頼性が高い

血中濃度が高くて消失が早いものや血中に長くとどまっても濃度が低いもの⇒AUC値低

ウシ血清中プロゲステロン濃度：妊娠13日vs.20日の判別可能性

死滅胚には、胚伸長しえないものも胚伸長できるものも存在する



早期死滅胚の中には**胚の伸長**をしているものが存在する

⇒伸長胚が着床できない可能性あり

⇒妊娠13日での不受胎牛判別は、胚伸長しえない牛は判別できるが
伸長後に胚死滅に至る不受胎牛を判別できない

追加採材および不受胎牛判別のためのアミノ酸インデックス開発

17 d, 20dについて各群n=50以上を目標に追加採血を行い、判別可能性を評価する



2020年5月下旬

これまで採材に協力していただいた全農ET研究所より
コロナ禍の影響で、体力的に採材には協力できないとの知らせを受ける



全国的に採材協力可能者の探索⇒2020年7月下旬

北海道中央(留萌)農済 窪田健太郎 獣医師
北海道十勝農済 泉 大樹 獣医師



採材協力可能との
連絡を受ける

共同研究契約書締結などの書類に時間がかかったものの

2020年9月中旬より採材開始

2021/01/22現在、留萌35頭、十勝99頭

このうち十勝分60頭のアミノ酸解析を2月中旬～下旬に開始

⇒2020年度中に不受胎牛判別のための「アミノ酸インデックス」構築開始

その他:

子宮内アミノ酸トランスポーター遺伝子(LAT1)の発現が21dに上昇

⇒RNA-seq外注、iTRAQ外注

アミノ酸プロファイルによる不受胎牛の判別事業 2021年度 より正確な判別式(インデックス)の開発および

2021年2月中旬

血中アミノ酸解析の開始

2021年3月中旬～下旬

経産牛103頭分でアミノ酸インデックス構築開始

残り(現在採材中 n=20)の血清のアミノ酸解析の継続

2021年4月～7月

アミノ酸インデックスの構築及び調整

⇒モデル式の開発

⇒モデル式の調整:アミノ酸、**血液生化学項目**、ISG15を含めて判別能の改善可能か検討

2021年9月～

新たな採材(2回サンプル:AI時と妊娠20日目)

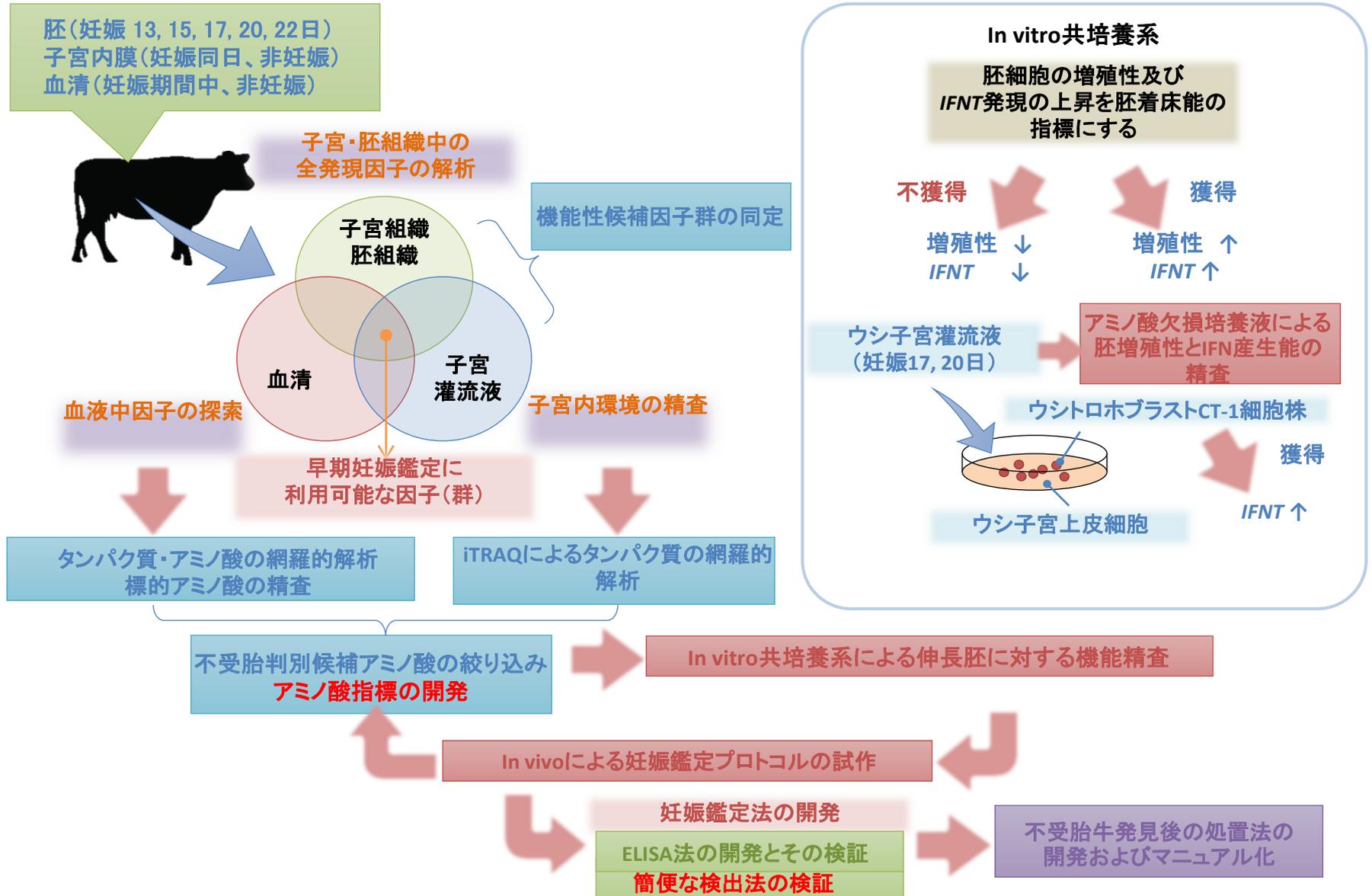
2022年2月～

判別式調整のための層別解析

2回サンプルのISG15及びアミノ酸プロファイルの解析

アミノ酸プロファイルによる不受胎牛の判別事業

偶然を避けるために共培養系を用い科学的な裏付け



アミノ酸プロファイルによる不受胎牛の判別事業 2021年度

モデル式の開発および調整

目標パフォーマンス

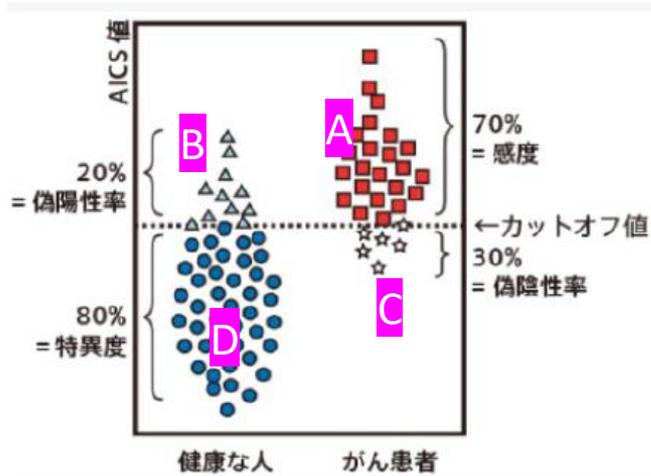
偽陽性(受胎牛を誤って不受胎と判別する確率) < 5%

真陽性(不受胎牛を正しく不受胎と判別する確率) > 80-90%

解析手順

- ①規格化した数値のデータを作成
項目により単位が異なるため、値の範囲が同じになるように調整
- ②Lassoによる正則化アルゴリズムを用いてモデリング
説明変数が多すぎると過学習の恐れがあるため、モデルに取り込まれる説明変数を減らしつつモデルを構築
- ③規格化されていないデータで選択された変数を用いてモデリング
- ④クロスバリデーション
母データを学習データと検証データに分割して作成したモデル評価

陽性率や偽陽性率など



	不受胎	受胎
検査 不受胎	真陽性 (A)	偽陽性 (B)
検査 受胎	偽陰性 (C)	真陰性 (D)

B: 受胎しているのに不受胎と判断 = 最も避けるべき事例
 C: 不受胎なのに検査では受胎
 D: 受胎で、検査でも受胎

$$\text{真陽性率} = A / (A + C) \Rightarrow \text{感度}$$

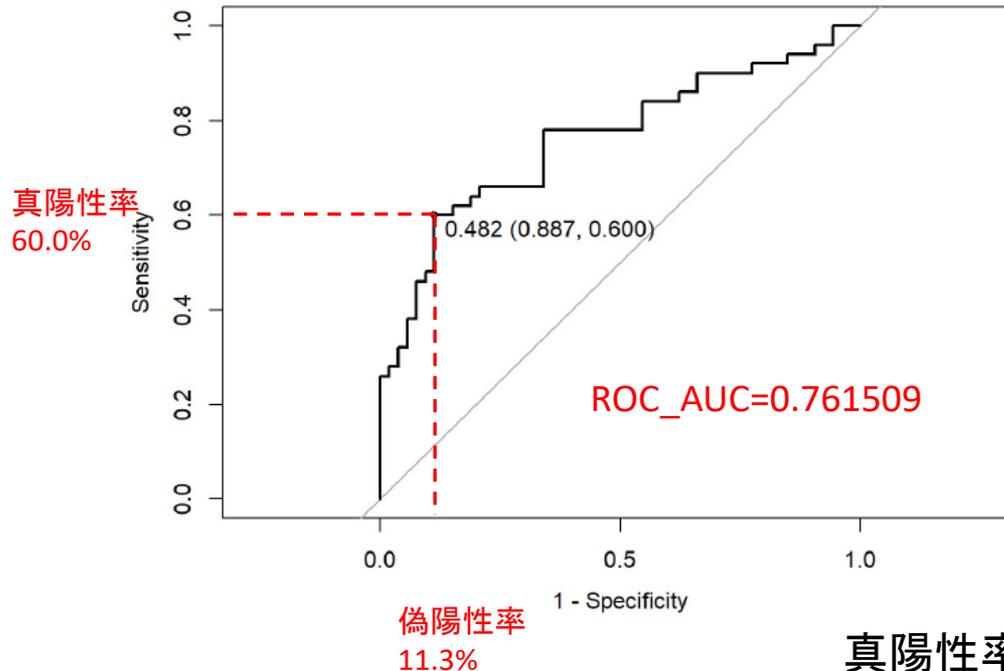
$$\text{真陰性率} = D / (B + D) \Rightarrow \text{特異度}$$

$$1 - \text{特異度} = B / (B + D) \Rightarrow \text{偽陽性率}$$

ROC曲線：感度（真陽性率）と1- 特異度（偽陽性率）の関連を表す曲線

結果

- ① 規格化した数値データを作成
- ② Lassoによる正則化アルゴリズムを用いてモデリング
- ③ 規格化されていないデータで選択された変数を用いてモデリング



- ✓ ROC_AUC=0.76程度のモデルが得られたが、目標性能 (ROC_AUC>0.8)には未達
- ✓ 説明変数として3Mehis、TP、ALB、無機リンが選択された

真陽性率 = $A/(A+C)$ ⇒ 感度

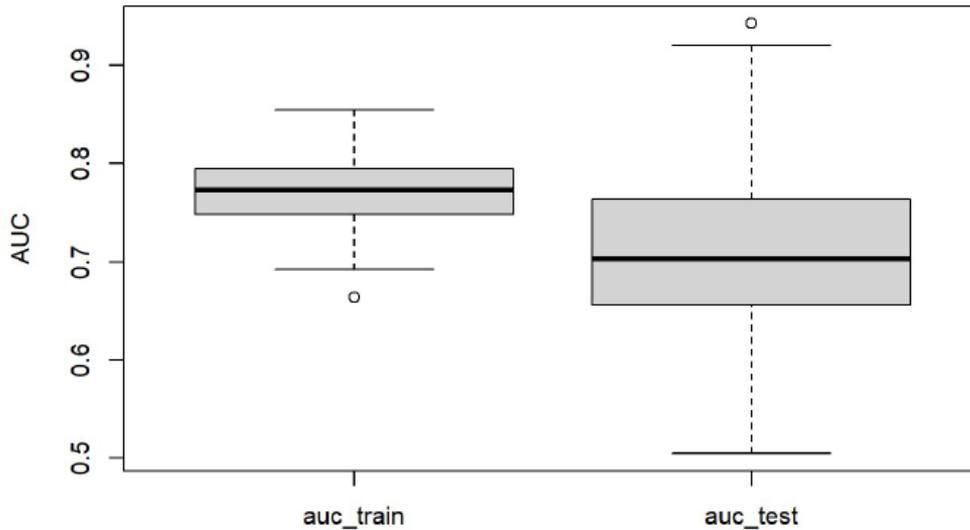
真陰性率 = $D/(B+D)$ ⇒ 特異度

1 - 特異度 = $B/(B+D)$ ⇒ 偽陽性率

④ クロスバリデーションによる性能の評価

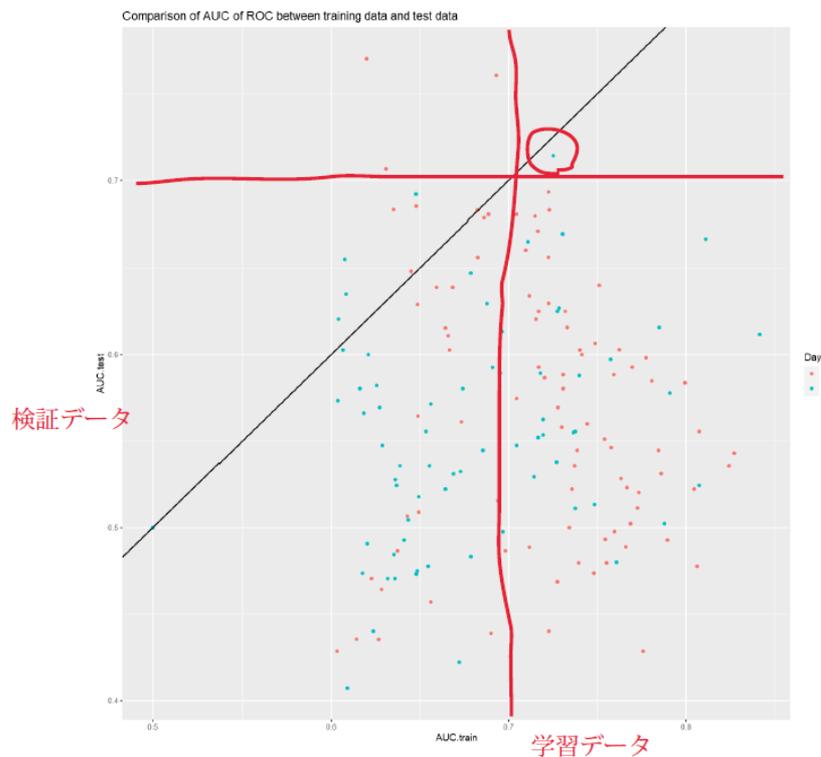
新規データに対する判別性能がどのくらいか分からないので、

母データをランダムに学習データ (train): 検証データ (test)=7:3に分割し、検証データでの性能がどの程度になるかを見積もる



✓ 検証データでの性能にはばらつきがあるが、大体ROC_AUC=0.7くらいを中心に分布することを確認

アミノ酸のみの解析結果 (FY2020の解析)



✓ Phe、Gluが
説明変数に選択された

学習データ、検証データ双方でAUC > 0.7となったモデルは以下の通り

A data.frame: 1 × 6

MDL.No	Day	Formula	AUC.train	AUC.test	AUC.cross
<dbl>	<fct>	<chr>	<dbl>	<dbl>	<dbl>
164	20	1 + Phe + Glu	0.7252252	0.7142857	0.5211321

判別式調整のまとめ

- 3Mehis、TP、ALB、無機リンを説明変数とするモデルが得られた
- 性能は大体ROC_AUC=0.7程度になると推測される
- 目標性能(ROC_AUC>0.8以上)には届かず

追加解析案

- 本データセットには様々な条件の個体が含まれる
産次、AI時期、AI時のDIMなど
- 個体条件の違いが判別性能に影響している可能性

⇒層別解析を実施し、判別性能が向上するか検討する

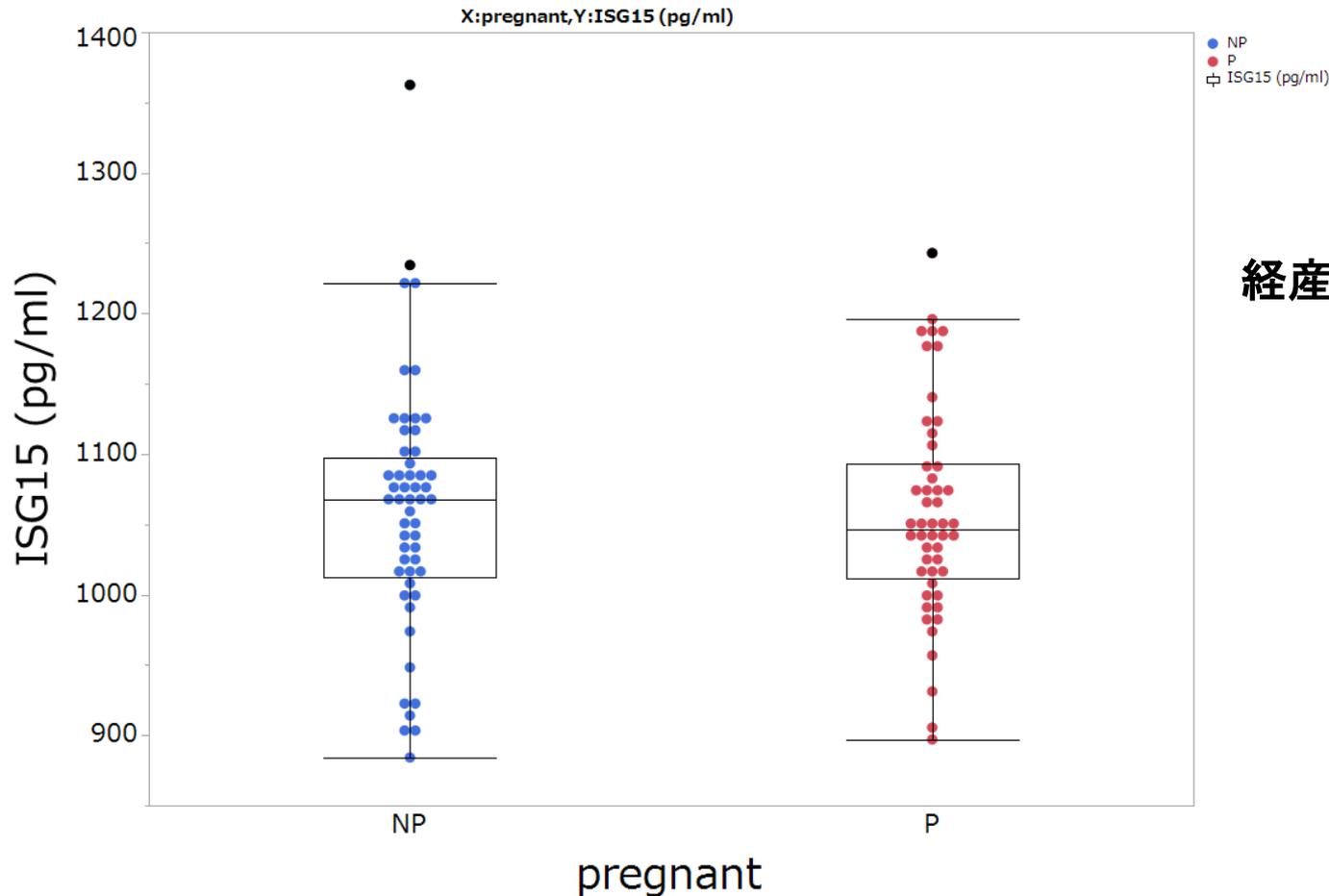
層別解析候補

層	NP	P	合計
分娩回数			
1	4	6	10
2	18	19	37
3以上	17	15	32
AI時の季節			
9月-10月分娩 (平均気温 >5°C)	26	30	56
11月-1月分娩(平均気温 <5°C)	27	20	47
AI時のDIM			
100日以内	13	13	26
100日-150日	11	14	25
150日以上	15	13	28
AI時乳量			
30 kg以下	0	3	3
30 kg-40 kg	24	26	50
40 kg以上	14	10	24

DIM: days in milk(ing)

アミノ酸事業全体のまとめ(2021年8月)

- 未経産牛の初回妊娠ではアミノ酸での判別能が高い
- 経産牛での判別性能はそれほど高くない
- ISG15は未経産牛では「マーカー」になりうる
- ISG15は経産牛では「マーカー」ならない(下図)



未経産牛と経産牛での正確性の差異:アミノ酸も ISG15も

2021年9月～

新たな採材(2回サンプル:AI時と妊娠20日目)

2022年3月～

2回サンプルのISG15及びアミノ酸プロファイルの解析

⇒資金不足のため休止

2021年12月

複合マーカーによる不受胎牛判別事業申請中

⇒SNX5、アミノ酸及び核酸

⇒コアラボの設立(一日以内に送付可能、翌日に結果)

⇒不採択

これまでのデータを基にしたデータ発表・公表

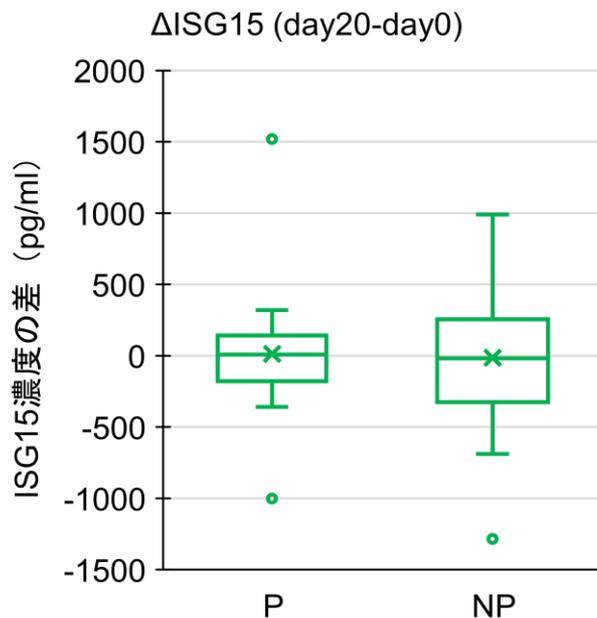
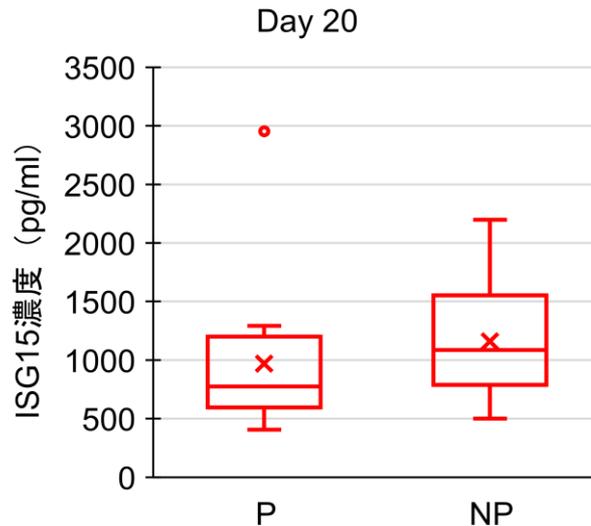
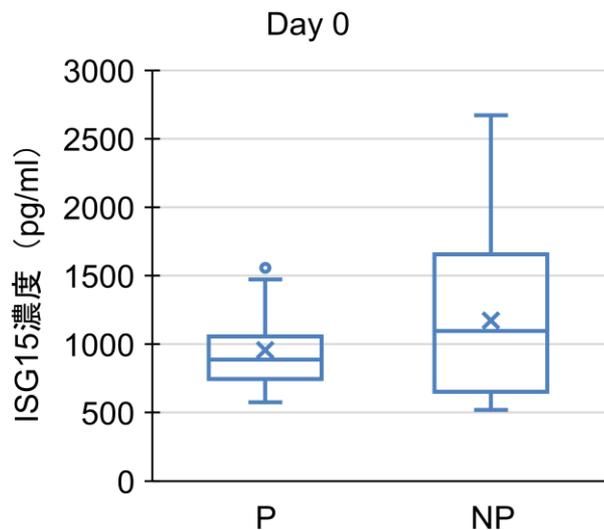
Kusama K, Bai R, Matsuno Y, Ideta A, Sakurai T, Nagaoka K, Hori M, Imakawa K.

Characterization of Serum Metabolome and Proteome Profiles Identifies SNX5

Specific for Pregnancy Failure in Holstein Heifers. **Life (Basel)**. 2022 Feb 18;12(2):309.

doi: 10.3390/life12020309

2回サンプルでの血中ISG15濃度



ただし、これらは血中濃度

子宮頸管などからの採材では
違った結果かも・・・

アミノ酸インデックス

⇒血液サンプル vs. 組織サンプル

⇒**未経産牛**の受胎・不受胎発見では非常に良いツールとなる

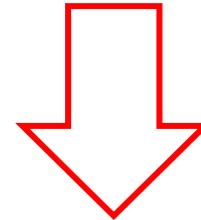
⇒**経産牛**では、陽性率を上げ、11.3%の擬陽性をどのように減らすか？

⇒P4との組み合わせ

⇒SNX5など他のマーカーとの組み合わせ

⇒北大プロジェクトとの関連 vs. 血液以外から

複合マーカーでの検証



コアラボでの解析と
結果の発信