

初期成長期の栄養制御による  
成長および生理特性に対する  
プログラミング効果  
に関する研究

2021

木村 中

## 目次

第 1 章	序論	
	代謝プログラミングについて	1
	家畜生産への代謝プログラミング現象の応用	3
	家畜動物における初乳の意義	5
	ラクトクライン仮説について	7
	哺乳期の栄養と免疫機能	8
	本研究の目的	10
第 2 章	妊娠後期めん羊における低タンパク質飼料給与が産子の成長，代謝特性，内臓脂肪蓄積および関連遺伝子の発現に及ぼす影響	
	緒言	12
	材料と方法	14
	結果	24
	図表	27
	考察	34
	小括	39
第 3 章	子めん羊への初乳追加給与が哺乳中の成長，血中成分および LPS 負荷試験応答に及ぼす影響	
	緒言	40
	材料と方法	43

結果	51
図表	54
考察	63
小括	66
第4章 マウスの一腹哺乳匹数調整による哺乳量の増加が成長および免疫機能に及ぼす影響	
緒言	67
材料と方法	70
結果	75
図表	78
考察	84
小括	90
第5章 総合考察	91
謝辞	96
引用文献	97

## 略語一覧

BUN	Blood urea Nitrogen	血中尿素態窒素
CP	Crude protein	粗タンパク質
DM	Dry matter	乾物
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay	酵素免疫測定法
IgA	Immunoglobulin A	免疫グロブリン A
IgG	Immunoglobulin G	免疫グロブリン G
IgM	Immunoglobulin M	免疫グロブリン M
LPS	Lipopolysaccharide	リポ多糖
NEFA	Non-esterified fatty acid	遊離脂肪酸
PBS	Phosphate buffered saline	リン酸緩衝生理食塩水
TBS	Tris buffered saline	トリス緩衝生理食塩水
TBS-T	Tris buffered saline with Tween 20	トリス緩衝生理食塩水 +Tween20
TDN	Total digestible nutrients	可消化養分総量
TNF- $\alpha$	Tumor Necrosis Factor- $\alpha$	腫瘍壊死因子 $\alpha$

## 第 1 章 序論

### 代謝プログラミングについて

1921年から1925年において新生児死亡率が高い地域では、1969年から1978年の心血管障害の死亡率が高いという英国での疫学研究結果の解析により、2,500g以下の低出生体重は成人後の心血管疾患による死亡の危険因子であることが見出された（Barker と Osmond 1986）。この報告を発端として多くの疫学研究と動物モデルを用いた研究結果を基に、胎子期の環境の悪化に適応するために低出生体重となることにより内分泌および代謝機能の恒常性が変化し成人期の生活習慣病リスクを上昇させるとする成人病胎子期起源説が Barker により提唱された（Barker 2007）。今日では、Gluckman ら（2004）により成人病胎子期起源説を発展させ発達期の個体において環境の変化に対応した不可逆的な変化が生じ、このような変化が発達の完了した時期の環境に適応できないと成人期の様々な疾患の原因となるとする Developmental Origins of Health and Disease（DOHaD）という概念として定着している。この現象は、代謝プログラミングあるいは代謝インプリメンテーションとも呼ばれている（Henley ら 2010；Fall と Kumaran 2019）。現在まで、マウス（Chen ら 2009；Barua

と Junaid 2015), ラット (Guan ら 2005; Guzmán ら 2006),  
ウシ (Martin ら 1997; Du ら 2013; Maresca ら 2019), ヤ  
ギ (He ら 2013; He ら 2015; Costa ら 2019), めん羊 (Ford  
ら 2007; Gardner ら 2005; Gauvin ら 2020; Gentili ら  
2009; Husted ら 2007), ブタ (Tatara ら 2007; Bagnell ら  
2009; Lin ら 2019; Zhu ら 2018), ウマ (Coverdale ら 2015)  
等の様々な動物モデルを用いて代謝プログラミングの検証が  
なされてきた。マウス (Chen ら 2009; Turdi ら 2013), ラッ  
ト (Guan ら 2005), めん羊 (Husted ら 2007; Nielsen ら 2013)  
では, 胎子期や着床前後の時期のタンパク質摂取量の制限,  
栄養過剰や栄養条件が成熟期以降の肥満症, 糖尿病, 脂質異  
常症, 脂肪肝などの代謝性疾患や高血圧症, 心臓疾患などの  
発症リスク増加の原因となる代謝異常や内分泌機能の異常な  
どが明らかにされている。一方, 妊娠雌めん羊のセレンの摂  
取量が産子の成長率および消化率に影響すること (Neville ら  
2010), エイコサペンタエン酸, ドコサヘキサエン酸の摂取量  
が産子の成長や血中グレリン濃度を低下させること (Nickles  
ら 2019) などが明らかにされ, ホルスタイン種牛では妊娠後  
期における母牛へのメチオニンの追加給与が産子の出生後の  
成長速度を向上させること (Alharthi ら 2018) が報告され  
ており, 炭水化物, タンパク質, 脂質などの多量栄養素だけ

でなく，妊娠中の母体における微量元素，不飽和脂肪酸，単一のアミノ酸などの栄養素の摂取量が産子の発育や内分泌機能に影響することが明らかにされつつある。

さらに，最近の研究では，胎子期のみならず，着床前後，新生子期，哺乳期，幼齢期（Adir 2014; Velazquez ら 2015）にいたる初期成長期における栄養摂取量等の様々な環境要因が，以降の発育段階の代謝，内分泌，臓器・組織の構造に影響を及ぼすことが示されている（Barua と Junaid 2015; Fudvoye ら 2019）。

#### 家畜生産への代謝プログラミング現象の応用

医学研究分野における代謝プログラミングの概念の発見以来，家畜生産分野においても生産性制御への応用を視野に飼養管理を通じたプログラミング現象の発現調節についての関心が高まっている。着床前後から，胎子期，出生前後，哺乳期に至る初期成長期における家畜の生育環境における様々な環境要因（エネルギー，タンパク質，ビタミン，ミネラルなどの栄養素摂取量，薬物や環境汚染物質への曝露，ストレス暴露など）が成長期および成熟期以降における代謝機能，内分泌機能，繁殖機能，骨格筋の成長，枝肉成績や肉質など家畜の生産性に関連深い形質に不可逆的な影響を及ぼすことが

明らかにされつつある。母畜の妊娠中の栄養摂取量などの要因が子畜の出生後における成長速度，体組成，骨格筋の筋線維数や筋肉量（Sinclairら 2016），腎臓周囲脂肪の褐色脂肪組織の発熱特性（Wallaceら 2014），体脂肪量の増加（Danielら 2007；Fordら 2007；Jaquierlyら 2012），泌乳量，繁殖能力（Sinclairら 2016）に影響する可能性が示されている。また，子羊において胎児期の発育遅延は幼齢期の毛包の発達を抑制させ（GreenwoodとBell 2003），生涯の羊毛生産量を低下させ得ることが報告されており，初期成長期の栄養は羊毛の生産性や品質（Greenwoodら 2009）を左右することが示唆されている。また，ウシ，めん羊，ブタでは胎子期の栄養水準が，ニワトリでは胚期における卵と卵黄のサイズと孵化温度が生涯の成長速度，筋形成や脂肪組織形成を変化させ，産肉性や食肉の食味性に重要な食肉の柔らかさや脂肪交雑の程度に影響する可能性（Duら 2013；Duら 2015；Robinsonら 2013；Duら 2015；Sinclairら 2016）や，フィードロット肥育での飼料摂取量，飼料効率及び枝肉成績を左右する可能性が示されている（Greenwoodら 2017）。また，母牛の妊娠期の放牧条件やタンパク質添加の有無が発育や健康に影響し，産子の繁殖を向上させ得ること（Broadheadら 2019；Cushmanら 2019）や母めん羊の妊娠初期から末期までの栄

養欠乏による胎子の重度の発育遅延は、30か月齢時の雌産子の卵巣重量と卵胞サイズを減少させる報告（Greenwoodら2017）がなされており、胎子期の栄養環境は産子の繁殖能力にも影響することが示唆されている。乳用牛においては、子牛の初乳摂取量が増加すると成長が促進され、治療費の節減や生涯の生産性が向上すること（Faberら2005）や哺乳期の代用乳の摂取量が生涯の生産性に影響すること（Soberonら2012；Soberonら2013）が明らかにされている。以上のように畜産分野では、家畜の生産性との密接な関連を示唆する多くの研究が報告されはじめ、初期成長期の栄養管理に関する研究が活発に行われている（Hammonら2020）。

#### 家畜動物における初乳の意義

ウシの初乳は、タンパク質と脂質に富み（Abd El-Fattahら2012）、乳糖、ミネラルおよびビタミンも常乳より高濃度に含んでいる。また、免疫グロブリンおよび白血球などの免疫に関連する成分に加えて、インスリン様成長因子IおよびII、血小板由来成長因子、上皮成長因子、成長ホルモン、サイトカインなどの生理活性物質を高濃度で含有しており、新生子牛の成長や生体防御に欠かせないものである（BlumとHammon2000；Ontsoukaら2003；Stelwagenら2009）。

ウシ，めん羊，ブタ，ヤギなどの家畜では，ヒトやマウスとは異なり，胎子期に胎盤を介した母親からの抗体の移行が起これず，出生後の初乳摂取による移行抗体の摂取が新生子期の生体防御機能に不可欠の役割を担っている。（Weaverら 2000；Quigleyと Drewry 1998）。子豚、子馬、子牛、子羊では出生後から 24 時間以内に小腸粘膜で起こる非特異的エンドサイトーシスとよばれる，高分子を細胞内に取込む作用により，母乳中の免疫グロブリンを産子の体内に移行させ，子畜は受動免疫を獲得する（Sangild 2003）。この受動免疫により，産子の未成熟な免疫システムが成熟して機能を開始するまでの期間，病原体の感染から生体を防御する（Goddenら 2019；Salmonら 2009；Sangild 2003；Stelwagenら 2009）。適正な受動免疫の獲得は産子の健康および生存に不可欠であり，初乳摂取の遅れや不足などにより，血中 IgG 濃度が低い子牛は，高い子牛と比較して離乳前の疾病の発生率および死廃率が上昇する（National Animal Health Monitoring system. Dairy, 1996）。子牛の血清中 IgG 濃度が 10mg/ml 未満の場合，それ以上の子牛と比較して死廃率は 2 倍以上になるとの報告がなされており，初乳を摂取できなかった乳用雌子牛では，生後 6 時間以内に初乳を摂取した子牛に比べると 21 日齢までの致死率が 74 倍も上昇したとしている（Wells

ら 1996)。このように，家畜動物では，出生後の適正な初乳摂取は，産子の生存や健康を確保するために必須であると認識されている。

#### ラクトクライン仮説について

前述のように，初乳摂取による受動免疫獲得の重要性に関する知見は多く得られているが，近年，母から子に初乳を介した高濃度の生理活性物質やホルモンの伝搬が，子畜の生理機能や臓器・組織の発達に寄与するというラクトクライン仮説（Lactocrine hypothesis）が提唱されている（Bagnellら 2009；Bagnellら；2017；Bagnellら 2019；Bagnellと Bartol 2019；Spencerら 2019）。ブタでは，初乳中に含まれるリラキシンが，新生子豚の子宮頸部および子宮内膜の受容体に作用して，エストロゲン受容体の遺伝子発現を促進することにより（Chenら 2011），雌子豚の子宮の発達に初乳中の成分が密接に関与し，繁殖機能に大きく影響することが示されている。また，アカゲザルでは泌乳初期乳中のコルチゾール濃度と産子の気性や行動との関連性（Hindeら 2015）が，ラットでは泌乳初期乳中成分が子ラットの脳下垂体のプロラクチン放出細胞の分化に必要であること（Nusserと Frawley 1997）が示されている。また，4から60日齢の期間，代用乳

あるいは全乳を1日に2回自由に摂取させた場合、代用乳給与の乳用雌子牛と比較して、全乳給与で飼育された子牛では、初産時の産乳量が向上することが報告されており、母乳に含まれる生理活性物質の摂取によるものと推察されている（Moallemら 2010）。ブタでは、初乳中の生理活性物質の摂取により産子の骨格筋と空腸のタンパク質合成が促進される可能性が示唆されている（Burrinら 1995）。ブラウンスイス種の泌乳成績を調べた研究では、出生後に初乳を倍量給与した場合、春機発動期までの成長速度が有意に増加し、出生から4ヶ月齢までの治療費が半減し、増体の向上、初産時と2産次における泌乳量の増加をもたらすことが報告されている（Faberら 2005）。以上のように、様々な動物種において初乳中の生理活性物質が産子の繁殖機能、気性、脳下垂体の機能発達、泌乳能力、筋肉や臓器のタンパク質合成促進など、様々な生理機能に影響することが明らかにされている。

### 哺乳期の栄養と免疫機能

哺乳子牛の栄養管理は、子牛の発育に大きく影響するだけでなく、将来的な強健性や生産性にも影響を与える

（Hammonら 2020）。子牛の哺育方式について、代用乳の節約や省力化等の利点から、概ね生後4－8週齢程度で離乳

させ早期に固形飼料給与に移行する早期離乳方式が過去50年間ほど世界の哺乳方式の主流であった。しかしながら、20世紀末から現在にかけて哺育子牛において、子牛の初期発育および強健性を向上させる等の効果が認められる

(Hengstら2012; Nonneckeら2003; Rinckerら2011; Raeth-Knightら2009)ことから、高タンパク低脂肪の代乳多給の長期給与する哺乳方式が急速に普及した。我が国においても、従来の早期離乳方式から高タンパク低脂肪代乳長期多給による哺乳方式が、近年普及が進んでいる。

代乳増量給与の研究結果では、乳用子牛の成長促進が初産時の乳量増加をもたらすこと(Soberonら2012; SoberonとVan Amburgh2013)や高タンパク質低脂肪代乳の増量給与が発育向上に加えて病原体に対する抵抗性や免疫機能の向上を示唆する結果が得られている(Ballouら2012; Hengstら2012; Nonneckeら2003; Obeidatら2013; Ollivettら2012)。一方、哺乳期において、乳房内の母乳を人為的に搾り捨て、母乳摂取を制限した場合、育成期における若齢めん羊の代謝障害発生の要因となることが報告されている(Frutosら2018)。

栄養は免疫機能および感染症による疾病率、死亡率を左右する重要な要因であり、エネルギーやタンパク質の不足、ビ

タミンやミネラルなどの微量栄養素の欠乏は、免疫機能、特に細胞性免疫や補体系の働きなどに深刻な影響を与えること（Calder 2013；Chandra 1992；Magginiら 2018）や母乳摂取が腸内感染に対する耐性を大幅に高める可能性（Kellyと Coutts 2000）が示されている。このように、栄養や成長、老化などと免疫機能の関連性を示す知見は多く、また、初期生育段階の栄養条件と免疫機能との関連性を示す報告は複数存在する（Nonneckeら 2003；Hengstら 2012；Obeidatら 2013；Ollivettら 2012；Ballouら 2012）。しかし、成熟時における免疫機能に着目した研究は殆どない。

## 本研究の目的

周産期や新生子期、哺乳期等の初期成長期において、母畜の栄養摂取量の制限、初乳の増量給与、哺乳量の増加などの栄養条件と、子畜の成長や免疫機能への影響との関連性解明により、効率的かつ経済的な家畜生産や、抗生物質の使用量及び治療費の低減、個体数の損耗低減等が期待される新たな家畜飼養技術に資する知見が得られる。

本研究では、代謝プログラミング現象の発現の調節が家畜の生産性制御における有用性を検討するために、胎子期、新生子期、哺乳期の初期成長期における栄養水準や初乳の追加

給与が子畜の成長や免疫機能の発達に及ぼす影響を検討することを目的とした（図1）。

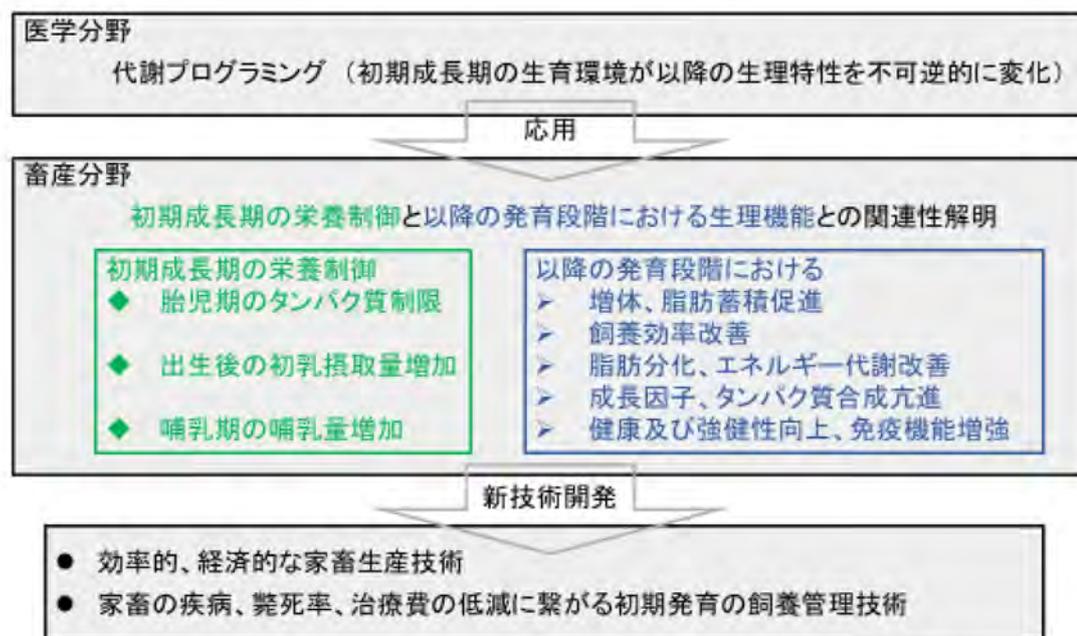


図1. 代謝プログラミング現象の解明による家畜の生産性制御技術への応用

## 第 2 章 妊娠後期めん羊における低タンパク質飼料給与が 産子の成長，代謝特性，内臓脂肪蓄積および関連遺伝子の 発現に及ぼす影響

### 緒言

ヒトの疫学研究やげっ歯類を用いた動物モデル研究により，胎子期の栄養水準をはじめとする要因が後の体質や臓器組織の機能構造に不可逆的に影響し続ける代謝プログラミング検証が近年，明らかにされた。医学研究では，栄養不良による子宮内発育遅延は，出生後，栄養条件が潤沢である場合，成熟期に肥満症の罹患リスクが上昇することが報告されている（Gluckman と Hanson 2004）。マウスでは，妊娠中の等カロリー低タンパク質飼料給与が胎子の発育遅延モデルとして，胎児期栄養制限モデルとして頻用されている（Ozanne 2001）。妊娠後期マウスに等カロリー低タンパク質飼料を給与した場合，産子の 21 日齢時の体重が増加すること（Chen ら 2009）や，成熟時（130 日齢）の内臓脂肪蓄積量が増加する（Guan ら 2005）報告がなされており，妊娠中の低タンパク質飼料給与が産子の体重増加や脂肪の蓄積を亢進することがげっ歯類を用いた研究では明らかになっている。家畜飼養において，妊娠中の栄養条件と産子の増体や脂肪蓄積との関連性が明らか

かになれば，妊娠中の栄養制御による効率的な家畜生産技術の開発に資する知見が得られることが期待される。本研究では，妊娠後期めん羊に低タンパク質飼料を給与した場合，産子の成長および脂肪蓄積に及ぼす影響を検討した。また，育成期の子めん羊へのカテーテル装着によるウシインスリンの継続的な注入は骨格筋量や組織の脂質含量を1割程度増加させることから（Wolffら 1989），子めん羊の成長にインスリンの分泌量や感受性が大きく関与することが示唆されている。育成牛では，静脈内グルコースおよびインスリン負荷試験は，インスリン感受性を評価するために用いられている方法である（Cartiffら 2013）。本研究では，胎児期の低タンパク質環境が，性成熟期のインスリン感受性および耐糖能に及ぼす影響を調べるために，22週齢時に，静脈内グルコースおよびインスリン投与試験を実施した。さらに，24週齢には成長，エネルギー代謝や脂肪分化に関与する遺伝子群の mRNA レベルを RT-qPCR 法により調査した。

## 材料と方法

本研究は弘前大学動物実験委員会の承認（承認番号：A08019）を得て，動物実験に関する規定に従って実施した。

### 給与飼料の調製

本研究では，飼料原料を各種混合し，妊娠後期めん羊への給与飼料として，通常のタンパク質含量飼料およびタンパク質含量を半減させたタンパク質制限飼料を調製し使用した。各飼料の調製方法は以下のとおりであった。通常のタンパク質含量飼料は，新鮮リンゴ粕，ビートパルプ，フスマおよび大豆粕を飼料原料とし，原物重量比でそれぞれ 70，12，12，6% の比率で混合した。タンパク質制限飼料は，新鮮リンゴ粕，ビートパルプ，圧ペントウモロコシを原物重量比でそれぞれ 70，27.5，2.5% の比率で混合した。混合したものを攪拌機により十分に混ぜた後，100 または 200L 容量のドラム缶サイロに詰め込み，一定期間サイレージ発酵させ給与した。通常のタンパク質含量飼料は乾物当たり TDN 77.4%，CP 17.3% でありタンパク質制限飼料は乾物当たり TDN 78.0%，CP 8.7% であった。

### 雌めん羊の交配および飼養条件について

弘前大学農学生命科学部附属生物共生教育研究センター金木農場（五所川原市，青森県）においてサフォーク種めん羊の交配を行った。2011年12月13日から2012年1月24日および2012年12月18日から2013年1月29日の期間に，雌めん羊の群に雄めん羊1頭を同居させて6週間飼育し，自由に自然交配させた。6週間の交配期間が完了した後，雌群から雄を除外し群飼し，1日に1頭あたり若齢牛育成用配合飼料（くみあい配合飼料北日本子牛；原物当たりTDN 70.0%，CP 15.5%，JA全農北日本くみあい飼料株式会社）200g相当の給与し，農場産の乾草は飽食とした。交配させた雌群から2011年度および2012年度ともに，10頭ずつ選び合計20頭の雌めん羊を本研究に供試した。両年度において，雌めん羊は，雄めん羊との同居期間完了から10週経過した時点で，弘前大学農学生命科学部（弘前市，青森県）構内の家畜舎に移送し個別のペンで飼育を開始した。雄めん羊との交配完了期間から10週経過した時点で，通常のタンパク質含量飼料を給与する対照区あるいはタンパク制限飼料を給与するタンパク質制限区を設け，各年度各区に5頭ずつ配置した。2012年度では、対照区（n=5）は年齢 $3.2\pm 0.8$ ，体重 $90.9\pm 2.7\text{kg}$ ，タンパク質制限区（n=5）は年齢 $3.3\pm 0.9\text{kg}$ ，体重 $89.4\pm 3.8\text{kg}$ であった。2013年度では，対照区（n=5）は年齢 $3.6\pm 0.9\text{kg}$ ，

体重  $81.6 \pm 5.8$  kg, タンパク質制限区 ( $n=5$ ) は年齢  $3.6 \pm 0.9$  kg, 体重  $81.2 \pm 9.1$  kg であった。通常のタンパク質飼料あるいはタンパク質制限飼料の給与量は 1 日あたり体重の 2.5% 量とし, チモシー乾草を体重の 1% 量給与した。給与飼料は朝と夕方に 2 等分して給与し, 朝 9 時と夕 17 時に給餌した。水と鉍塩は不断給与とした。分娩後の飼料給与は, 哺乳に要する TDN 要求量 (日本飼養標準めん羊 1996 年版, 農林水産技術会議事務局編) に相当する若齢牛育成用配合飼料 (くみあい配合飼料北日本子牛; 原物当たり TDN 70.0%, CP 15.5%, JA 全農北日本くみあい飼料株式会社) に加えて体重の 1% 量のチモシー乾草を給与した。給与飼料は朝と夕方に 2 等分して給与した。母畜の体重測定および採血は, 分娩まで 1 週間毎に実施した。採血はヘパリンナトリウムフィルム入り真空採血管 (TERUMO, 東京, 日本) を用いて頸静脈から採血した。採取した血液は氷冷して実験室に運び, 15 分間遠心分離 ( $4^{\circ}\text{C}$ , 3000rpm) した後, 血漿を採取して分析まで  $-30^{\circ}\text{C}$  で保管した。

#### 産子の飼養条件

2012 年度の妊娠雌めん羊 10 頭の分娩成績は単胎が 2 頭 (雄産子 1 頭, 雌産子 1 頭), 双胎が 6 頭 (雄産子 4 頭, 雌

産子 8 頭), 品胎 1 頭 (雄産子 2 頭, 雌 1 頭) であり, 合計 17 頭の生存産子が出生した。双胎の内 1 腹は, 双子のうちの 1 頭が出生翌々日に衰弱死した。2013 年度の妊娠雌めん羊 10 頭の方娩成績は, 単胎 3 頭 (雄産子 1 頭, 雌産子 2 頭), 双胎 7 頭 (雄産子 7 頭, 雌産子 7 頭) であり, 合計 17 頭の生存産子が出生した。単胎のうちの産子 1 頭が母畜の乳房炎が原因で初乳が摂取できず, 7 日齢時に以降の発育が見込まれないと判断し, 安楽死させた。2012 年度および 2013 年度あわせて, 合計 34 頭の産子が出生した。本研究では, 胎子数および哺乳頭数の違いにより生じる影響を除外するために, 双胎の母子のみを調査対象とした。本研究における供試数は, 母めん羊は対照区で 7 頭, タンパク質制限区で 5 頭であった。子めん羊の性別の内訳は対照区では去勢雄は 6 頭, 雌は 8 頭であり, タンパク質制限区では去勢雄は 4 頭, 雌 6 頭であった。出生後, 産子は母畜と同じのペンで飼育し 8 週齢の離乳まで自然哺育させた。生後 1 週間以内に断尾および去勢のため, 尾部および辜丸にラバーリングを装着した。8 週齢での離乳の順致のために 6 週齢から 8 週齢までの間に毎日 9:30 から 17:00 までの間は母子を畜舎内の異なるペンに隔離した。隔離中は, 産子に 1 頭あたり 150g の若齢牛育成用配合飼料 (CP 15.5%, TDN 70%) を給与し, チモシー乾草を飽食

させ水を自由に摂取させた。8週齢で離乳させた後、同等の週齢および体重の産子が組みになるように2-3頭のグループとし、1日に1頭あたり体重の2%量の若齢子牛育成用配合飼料（原物当たり TDN 70%， CP 15.5%）を朝と夕に2等分して給与し、チモシー乾草を不断給与して24週齢まで飼育した。給餌は9時および17時に行った。鉍塩および飲水は自由摂取とした。産子の体重測定および採血は8週齢から24週齢まで4週齢ごとに行った。採血はヘパリン処理真空採血管（TERUMO，東京，日本）を用いて頸静脈から採血した。試験期間中、残飼の量は毎日記録した。

#### グルコースおよびインスリン負荷試験

22週齢時に静脈内グルコースおよびインスリン負荷試験を実施した。負荷試験当日は、朝の給餌をせず、10:00にインスリン負荷試験を実施した。負荷試験実施前に、頸静脈に18ゲージ注射針カテーテル（TERUMO，東京）を装着した。インスリンの静脈内投与の直前に0時間の採血を行った後、10:00に体重1kg当たり0.1Uのウシインスリン（Insulin, from bovine pancreas 15500-100MG, Cat# 11070-73-8, Lot# 069K0982, activity:  $\geq$  27 USP units/mg Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA）を静脈内に注入した。投与後5, 15, 30,

60, 90 および 120 分に, ヘパリンナトリウムフィルム入り真空採血管 (TERUMO, 東京, 日本) に血液を採取した。採取した血液は氷冷しながら実験室に移送して, 15 分間遠心分離 (4°C, 3000rpm) した後, 血漿を採取して -30°C で分析まで保存した。インスリン負荷試験を実施した後, 同日の 13:00 に体重 1kg あたり 0.25g のグルコース溶液 (50% glucose solution, 和光純薬工業, 大阪, 日本) を静脈内に投与し, 前述のインスリン負荷試験時と同様の方法によりサンプリングを行った。

#### 血中成分分析

採取した母めん羊の血漿中の尿素窒素, グルコース, NEFA, リン脂質, トリグリセリドおよび総コレステロール濃度は和光純薬工業 (大阪) の L タイプ ワコー UN, グルコース C II-テストワコー, NEFA C-テストワコー, リン脂質 C-テストワコー, トリグリセライド E-テストワコー, コレステロール E-テストワコーを用いてそれぞれ測定した。血漿中  $\beta$ -ヒドロキシ酪酸濃度は  $\beta$ -Ketone Monitoring System Precision Xceed Pro (Abbott, Abbott park road, IL, USA) を用いて測定した。血漿中インスリン濃度は市販のウシインスリン ELISA キット (Mercodia, Uppsala, Sweden) により測定し

た。すべての分析は 2 反復で行った。

産子の 22 週齢時に実施したグルコースとインスリン負荷試験で採取した血漿のインスリン濃度はウシインスリン ELISA kit (MercoDia, Uppsala, Sweden) を用いて、キットの推奨プロトコルに従って測定し、血漿中グルコース濃度はグルコース C II-テストワコー (和光純薬工業, 大阪, 日本) を用いて酵素比色法により測定した。すべての測定は 2 反復で行った。

#### と畜解体調査

24 週齢に産子に体重 1kg 当たり 1.5ml のソムノペンチル (共立製薬, 東京都, 日本) を静脈内に投与して安楽死させた。死亡確認後, 直ちに頸動静脈を切開し放血した。肝臓, 最長筋, 腎臓周囲脂肪および尾根部皮下脂肪を採取して, 冷 PBS (pH 7.4) で洗浄した後, 液体窒素中で凍結した。放血後 30 分以内に凍結組織サンプルの採取は完了した。採取した凍結組織は RT-qPCR 解析まで -80℃ で保存した。凍結組織の採取完了後は血液, 肺, 心臓, 腎臓, 肝臓, すい臓, 脾臓, 腎臓脂肪, 大網膜脂肪および腸間膜脂肪重量の重量を測定した。第一胃および第二胃, 第三胃, 第四胃は水道水で胃内容を洗浄した後に重量を測定した。

## RT-qPCR

組織サンプルの IGF-1, INSR, mTOR, AMPKa, PGC-1a, Sirt1, Sirt3, IGF-1, IGF-1R, INSR, C/EBPb, PPAR $\gamma$  および Leptin の mRNA 発現量を RT-qPCR 法により定量した。Pink bead lysis kit RNase free (CYD-PINKE1-RNA, Next Advance, Troy, NY, USA) および Bullet Blender Storm (CYD-BBY24M, Next Advance, Troy, NY, USA) を用いて凍結保存した組織をホモジナイズし, 肝臓組織, 最長筋組織, 腎臓周囲脂肪および皮下脂肪組織はそれぞれ Qiagen (Maryland, CA, USA) の RNeasy plus mini kit for liver tissue, RNeasy plus mini kit for muscle tissue, RNeasy plus mini kit for adipose tissue を用いて, メーカーの推奨プロトコルに従い総 RNA を抽出した。抽出した総 RNA の純度および濃度は NanoDrop-2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて 260nm と 280nm の波長での吸光度とその比を用いて測定した。ReverTra Ace qPCR RT kit (Toyobo, 大阪, 日本) を用いて 200ng の RNA から cDNA の合成および増幅を行った。1 ウェルあたりの反応液の組成は Thunderbird SYBR Green master mix 10 $\mu$ l, 10 $\mu$ M PCR Forward および 10 $\mu$ M プライマー各 0.6 $\mu$ l, 鋳型 cDNA 8.8 $\mu$ l

を加えた最終液量 20 $\mu$ l とした。IGF-1 および IGF-1R (Gentili ら 2009), INSR (Pfaffl ら 2002) および ACTB (Peletto ら 2011) のプライマー配列は表 1 に示した。mTOR, AMPK $\alpha$ , PGC-1 $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , C/EBP $\beta$ , Leptin, Sirt1, Sirt3 のプライマーは BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) および Primer 3 (<https://sourceforge.net/projects/primer3/>) を用いて設計した。PCR 反応は, 95 $^{\circ}$ C で 1 分間の熱処理した後, 95 $^{\circ}$ C で 10 秒あるいは 15 秒, 60 $^{\circ}$ C または 59 $^{\circ}$ C で 45 秒のサイクルを 40 回繰り返した。すべての分析は 2 反復で実施した。PCR 産物の特異性は融解曲線解析により確認した。各分析では全個体の組織から得た cDNA の混合液を標準遺伝子液とし, 標準遺伝子液の希釈系列から作成した標準曲線から各遺伝子の mRNA 発現量を定量し, ACTB を内部標準遺伝子として ACTB の定量値で補正して示した。

### 計算および統計解析

母めん羊の妊娠期間中の血中代謝成分およびインスリン濃度は, 分娩以前の直近 3 時点の血中濃度の平均値を算出し, 解析した。インスリン負荷試験の血漿中グルコース濃度, およびグルコース負荷試験の血漿中グルコースおよびインスリン濃度曲線から AUC を算出した。

産子の空体重量はと畜前の体重から胃内容物の重量を引いて計算した。空体重に対する各臓器の相対重量は、臓器重量 g/空体重 kg として算出した。

母めん羊の試験開始時体重，試験処理日数および妊娠中の血中代謝成分およびインスリン濃度は t 検定により解析した。産子の飼養成績およびと畜解体調査により得られたデータは，処理区および産子の性別を要因とする 2 元配置分散分析により解析した。有意水準は  $P < 0.05$  を有意差ありとした。統計解析は SPSS Statistic version V22.0 (IBM, Armonk, NY, USA) で行った。

## 結果

表 2 に、母めん羊の試験処理日数、試験開始時体重および妊娠期間の日増体量と授乳中の日増体量を示した。母めん羊の試験開始時の体重は対照区 85.9kg、タンパク質制限区 87.9kg であり、処理区間差はなかった。妊娠中の試験処理の日数は対照区 33.4 日、タンパク質制限区 32.7 日であり、処理区間差はなかった。試験開始から分娩までの日増体は対照区が 305g/日、タンパク質制限区が 180g/日であり、タンパク質制限区が対照区より低かった ( $P = 0.01$ )。哺乳期間の日増体に処理区間に差はなかった。

母めん羊の妊娠中の血中代謝成分およびインスリン濃度を表 3 に示した。血中尿素態窒素濃度は対照区が 14.3mg/dL、タンパク質制限区が 3.9mg/dL であり、タンパク質制限区が対照区より有意に低かった ( $P < 0.01$ )。他のいずれの血中代謝成分およびインスリン濃度に処理区間差はなかった。

産子の体重と増体を表 4 に示した。出生体重は対照区の雄産子 4.45kg、雌産子 3.77kg、タンパク質制限区の雄産子 4.04kg、雌産子 3.86kg であり、処理と産子の性別による差はなかった。生時体重と 8 週齢時の離乳時体重に処理の影響はみられなかったが、24 週齢時ではタンパク質制限区は対照区より重かった ( $P = 0.01$ )。哺乳期の日増体量に処理と産子の

性別との交互作用を示し ( $P = 0.03$ ), 去勢雄産子では, 日増体量はタンパク質制限区が対照区より高かった ( $P < 0.01$ )。産子の離乳後の日増体量はタンパク質制限区が対照区より高かった ( $P = 0.02$ )。8週齢時の離乳時体重は, 去勢雄は雌よりも重く ( $P < 0.01$ ), 24週齢時も去勢雄が雌よりも重かった ( $P < 0.001$ )。哺乳期の日増体量は, 去勢雄が雌より高く ( $P = 0.02$ ), 離乳後の日増体量は, 去勢雄は雌より高かった ( $P = 0.02$ )。

22週齢時のインスリンおよびグルコース負荷試験における血中インスリンおよびグルコース濃度のAUCを図1に示した。静脈内インスリン投与後の血中グルコースAUCに処理および性別の差ははみられなかった(図1a)。静脈内グルコース投与後の血中グルコースAUCに処理区間差はなかったが, 雌より去勢雄が低かった ( $P = 0.03$ , 図1b)。グルコース静脈内投与後の血中インスリンAUCに処理区間差はなかったが, 雌が去勢雄より低かった ( $P = 0.03$ , 図1c)。

24週齢時の空体重, 各臓器と内臓脂肪の空体重に対する相対重量を表5に示した。24週齢時の空体重 ( $P = 0.02$ ) はタンパク質制限区が対照区より重かった。腸間膜脂肪は, タンパク質制限区が対照区より重かった ( $P < 0.01$ ) が, 他のいずれの臓器重量に処理区間差はなかった。24週齢時の空体重

は去勢雄が雌より重く ( $P < 0.01$ ), 腎臓周囲脂肪 ( $P = 0.04$ ), 大網膜脂肪 ( $P = 0.02$ ) は雌が去勢雄より高かった。

24 週齢時産子の肝臓, 最長筋, 腎臓周囲脂肪および大網膜脂肪組織の mRNA 発現量を表 6 に示した。産子の肝臓, 最長筋, 腎臓周囲脂肪および大網膜脂肪組織におけるいずれの遺伝子発現に処理あるいは性別による影響はみられなかった。

図表

表 1. 本研究で使用したプライマー

遺伝子	配列	アンプリコン サイズ, bp
IGF-1	Forward 5' TTGGTGGATGCTCTCCAGTTC Reverse 5' AGCAGCACTCATCCACGATTC	118
IGF-1R	Forward 5' AAGAACCATGCCTGCAGAAGG Reverse 5' GGATTCTCAGGTTCTGGCCATT	105
INSR	Forward 5' TCCTCAAGGAGCTGGAGGAGT Reverse 5' GCTGCTGTCACATTCCCA	127
mTOR	Forward 5' CAAGGAGATGGAACGGAAGAAG Reverse 5' CAGCAACAGCGAGAGTGAGG	145
AMPK $\alpha$	Forward 5' GATGAGGTGGTGGAGCAGAG Reverse 5' GTGAGAGAGCCAGAGAGTGAATG	131
PGC-1 $\alpha$	Forward 5' TTCATGGAGCAATAAAGCGAAG Reverse 5' TGTGGGTTTGGTGTGAGGAG	118
C/EBP $\beta$	Forward 5' ACAGCGACGAGTACAAGATCC Reverse 5' GACAGTTGCTCCACCTTCTTCT	154
PPAR $\gamma$	Forward 5' CGACCAACTGAACCCAGAGTC Reverse 5' GGTGATTTGTCTGTCGTCTTTCC	170
Leptin	Forward 5' ATCTCACACACGCAGTCCGT Reverse 5' CCAGCAGGTGGAGAAGGTC	202
ACTB	Forward 5' CCAACCGTGAGAAGATGACC Reverse 5' CCAGAGGCGTACAGGGACAG	148
Sirt1	Forward 5' GCCATGGTTCCTTTGCAACA Reverse 5' CATCAGCTGGGCATCTAGGA	120
Sirt3	Forward 5' CACTGCCTAGAACCCCAAGT Reverse 5' TACTAAAGAGGCCAGGGTGC	147

表 2. 対照区およびタンパク質制限区の母羊の試験処理日数, 体重および増体

項目	処理区		SEM	P値
	対照区 ( <i>n</i> =7)	タンパク質制限区 ( <i>n</i> =6)		
試験処理日数	33.4	32.7	2.9	0.80
開始時体重, kg	85.9	87.9	3.1	0.53
日増体, g/日				
試験開始一分娩	305	180	41.9	0.01
分娩-離乳	-403	-394	61.9	0.89

表 3. 対照区およびタンパク質制限区の母羊の妊娠中の血中代謝成分およびインスリン濃度<sup>1</sup>

項目	処理区		SEM	P値
	対照区 (n=7)	タンパク質 制限区 (n=6)		
BUN, mg/dL	14.3	3.9	1.0	<0.01
NEFA, µg/L	513	484	91.8	0.76
リン脂質, mg/dL	93.0	79.1	10.6	0.22
トリグリセリド, mg/dL	15.5	18.0	4.3	0.57
β-ヒドロキシ酪酸, mol/L	0.6	0.4	0.1	0.20
総コレステロール, g/dL	69.3	59.8	8.9	0.31
グルコース, mg/dL	64.8	57.2	6.2	0.25
インスリン, µg/L	0.5	0.3	0.2	0.14

<sup>1</sup> 分娩を基準にして、分娩により近い3時点の血中濃度の平均値を算出し、解析した。

表 4. 対照区およびタンパク質制限区の産子の体重および増体

項目	処理区				SEM	処理	P値	
	対照区		タンパク質制限区				性別	交互作用
	去勢雄 (n=6)	雌 (n=8)	去勢雄 (n=4)	雌 (n=6)				
体重, kg								
出生	4.4	3.8	4.0	3.9	0.29	0.60	0.16	0.41
8 週齢	21.4	20.6	23.2	19.8	0.69	0.43	<0.01	0.08
24 週齢	37.1	34.3	40.5	35.4	0.84	0.01	<0.01	0.21
日増体, g/日								
哺乳期	302	300	335	284	10.7	0.44	0.02	0.03
離乳後	140	123	154	139	6.2	0.02	0.02	0.91

哺乳期 = 出生から 8 週齢

離乳後 = 8 週齢から 24 週齢

表 5. 対照区およびタンパク質制限区の産子の 24 週齢時における空体重および相対臓器重量 (g/kg 空体重)

項目	処理区				SEM	処理区	P値	
	対照区		タンパク質制限区				性別	交互作用
	去勢雄 (n=6)	雌 (n=8)	去勢雄 (n=4)	雌 (n=6)				
空体重, kg	32.1	29.9	35.2	30.8	0.79	0.02	<0.01	0.17
相対臓器重量								
血液	42.6	42.7	42.6	42.7	1.22	0.97	0.93	0.99
心臓	5.3	5.2	5.1	5.4	0.13	1.00	0.52	0.25
肺	10.9	10.8	11.3	10.9	0.41	0.59	0.55	0.80
第 1+2 胃	20.6	21.1	19.6	20.5	0.97	0.39	0.47	0.82
第 3 胃	2.2	2.3	2.0	2.2	0.21	0.57	0.64	0.70
第 4 胃	4.4	4.3	3.9	4.3	0.14	0.05	0.26	0.08
小腸	27.6	29.3	27.9	29.5	2.10	0.90	0.43	1.00
大腸	38.7	33.4	33.4	32.0	2.35	0.17	0.17	0.42
腎臓	3.0	3.0	3.0	3.0	0.13	0.98	0.92	0.86
肝臓	15.0	15.6	15.6	16.2	0.40	0.13	0.13	0.91
膵臓	1.5	1.3	1.3	1.3	0.08	0.33	0.32	0.32
脾臓	6.6	6.3	6.3	7.3	0.97	0.71	0.71	0.50
腎臓周囲脂肪	7.1	10.5	8.4	9.2	0.93	0.99	0.04	0.20
大網膜脂肪	12.6	15.7	13.4	15.6	1.09	0.76	0.02	0.69
腸間膜脂肪	7.8	8.4	9.6	8.6	0.39	0.02	0.66	0.07

表 6. 対照区およびタンパク質制限区の産子の 2 4 週齢時における各組織の mRNA 発現量に及ぼす影響

項目	処理区				SEM	処理	P 値	
	適正 タンパク質区		タンパク質 制限区				性別	交互 作用
	去勢雄 (n=6)	雌 (n=8)	去勢雄 (n=4)	雌 (n=6)				
肝臓								
IGF-1	0.30	0.26	0.35	0.25	0.08	0.81	0.40	0.71
mTOR	0.30	0.25	0.31	0.30	0.07	0.68	0.66	0.81
AMPK	0.37	0.40	0.33	0.40	0.11	0.87	0.64	0.85
PGC-1	0.30	0.37	0.30	0.37	0.10	0.99	0.52	0.98
INSR	0.36	0.23	0.25	0.35	0.06	0.91	0.82	0.06
SIRT1	0.62	0.61	0.42	0.51	0.13	0.24	0.75	0.70
SIRT3	0.88	0.81	0.99	0.78	0.17	0.82	0.43	0.69
最長筋								
IGF-1	0.08	0.12	0.05	0.10	0.02	0.32	0.12	0.77
mTOR	0.09	0.14	0.08	0.14	0.03	0.95	0.08	0.93
AMPK	0.08	0.13	0.08	0.13	0.03	0.97	0.08	0.92
IGF-1R	0.05	0.10	0.06	0.08	0.02	0.72	0.10	0.53
INSR	0.09	0.16	0.07	0.12	0.03	0.38	0.09	0.69
SIRT1	0.40	0.33	0.21	0.32	0.06	0.14	0.74	0.18
SIRT3	0.45	0.44	0.41	0.43	0.06	0.67	0.93	0.88
腎周囲脂肪								
C/EBP- $\beta$	0.37	0.39	0.21	0.32	0.07	0.11	0.35	0.51
PPARG	0.24	0.24	0.14	0.21	0.04	0.12	0.44	0.45
LEPTIN	0.15	0.21	0.17	0.32	0.09	0.47	0.23	0.63
SIRT1	0.48	0.49	0.44	0.48	0.06	0.69	0.68	0.86
SIRT3	0.89	0.91	0.74	0.84	0.10	0.26	0.57	0.70
皮下脂肪								
C/EBP- $\beta$	0.14	0.17	0.09	0.15	0.05	0.50	0.37	0.82
PPARG	0.10	0.10	0.06	0.11	0.02	0.55	0.21	0.31
LEPTIN	0.18	0.49	0.26	0.28	0.13	0.61	0.20	0.29
SIRT1	0.41	0.43	0.39	0.56	0.13	0.65	0.47	0.59
SIRT3	1.12	0.95	0.83	0.76	0.17	0.19	0.49	0.79

データは ACTB の定量値で補正した値

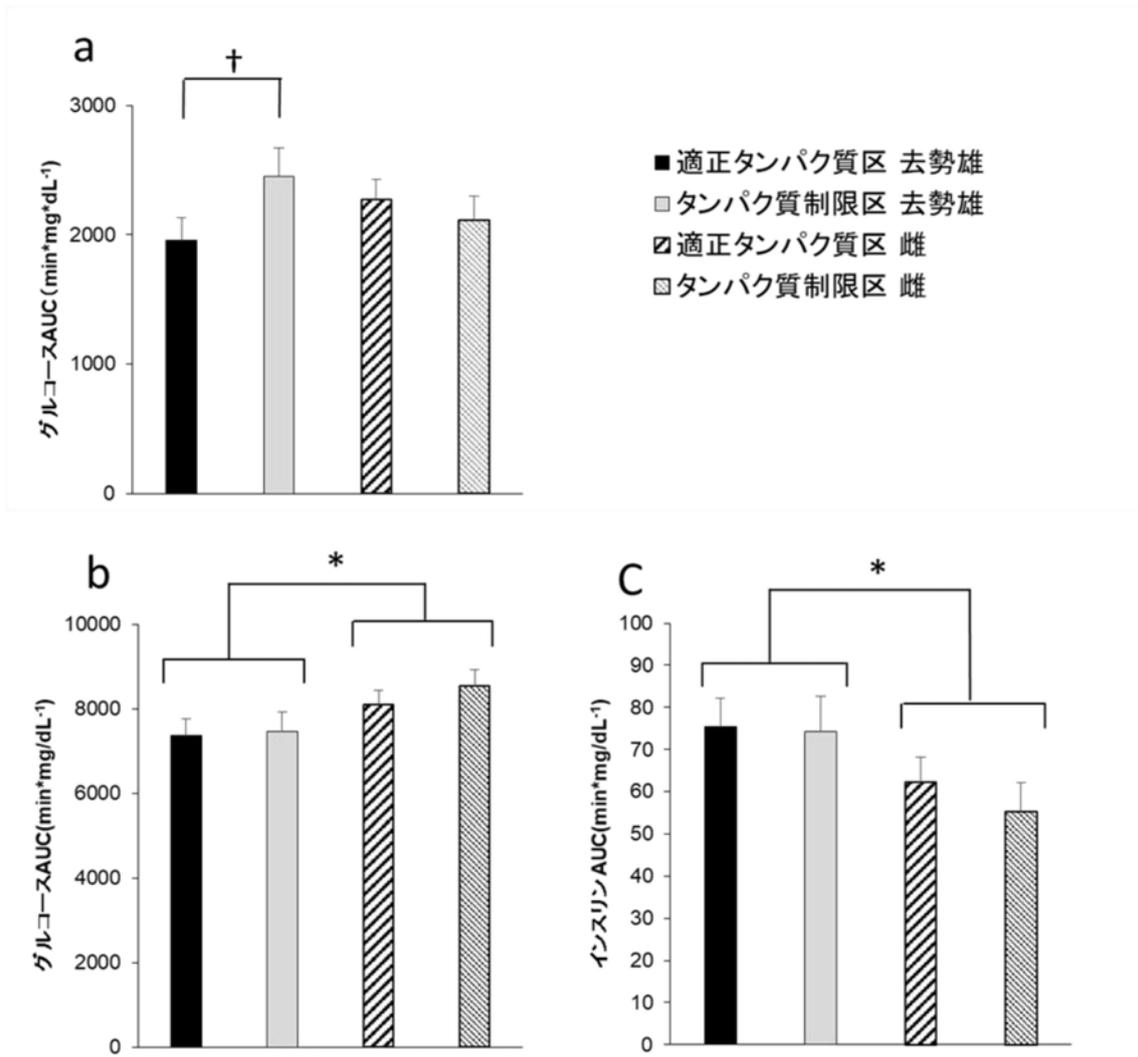


図1. 対照区およびタンパク質制限区の産子の22週齢時における静脈内インスリン投与後の血中グルコース濃度AUC (a) およびグルコース静脈内投与後の血中グルコース濃度AUC (b) および血中インスリン濃度AUC (c)

## 考察

本研究では，母めん羊の妊娠後期のタンパク質制限により制限期間中の増体および血中 BUN 濃度が半減した。BUN はタンパク質の終末代謝産物であることから，タンパク質制限区が妊娠後期にタンパク質摂取量が対照区より低いことを示している。ラットの研究では，妊娠期間にタンパク質含量を半減した飼料を給与した場合，妊娠期間の日増体量が低下することが報告されており（Joshi ら 2003），めん羊を用いた本研究においても同様の結果がみられた。

本研究では，妊娠後期のタンパク質制限により母羊の日増体量が低下したが，産子の出生体重に影響はみられなかった。シェーロップシャー種双胎妊娠雌めん羊を，分娩以前 6 週間の期間，エネルギーおよびタンパク質摂取量を半分に制限すると，子めん羊の出生体重が低下することが報告されている（Husted ら 2007）。一方で，アンガス種未経産牛の研究では，分娩以前 140 日間の摂取エネルギーが同等なタンパク質摂取量の低下は，子牛の出生体重の低下を招くことが報告されている（Martin ら 1997；Carstens ら 1987）。以上のことから，妊娠後期のエネルギーおよびタンパク質摂取量が半減した場合には，産子の出生体重が低下することが示唆された。

本研究では，妊娠後期の摂取量のタンパク質制限により，

産子の離乳後の増体，24週齢時の体重および腸間膜脂肪重量の増加がみられた。交雑種妊娠雌めん羊の受胎後110日から分娩までの期間の栄養摂取量を半減した場合，産子の1歳齢時の枝肉中脂肪組織の割合が増加する（Gardnerら2005）。分娩以前6週間の期間におけるエネルギーおよびタンパク質の要求量の半量のみのは，出生後の高脂肪飼料給与条件下では，出生体重やグルコースインスリン恒常性の変化を介さずに，6ヶ月齢時の腹腔内脂肪量を増加させる（Khanalら2014）。一方，分娩前6週間，対照区比50%のカロリー制限はめん羊産子の出生後の増体の亢進はみられない報告もある（Hustedら2007）。さらに，妊娠雌めん羊の受胎後28日から78日にわたる栄養摂取量の半減は，産子の280日齢時の体重および背脂肪厚が増加する報告もなされている（Fordら2007）。一方，マウスの研究では，Chenら（2009）は，妊娠中に等カロリー低タンパク質（タンパク質含量8%）飼料を給与した母マウスから出生した産子は，対照区（タンパク質20%）のマウスに哺育された産子より，21日齢時の体重が重いことを報告しており，本研究と同様に，マウスにおいても胎子期に母体がタンパク質摂取量を制限されると，出生後の増体が向上することが報告している。また，本研究では，妊娠後期のタンパク質制限により，22週齢時のインスリンの感

受性、分泌量および耐糖能，ならびに成長やエネルギー代謝および脂肪細胞の分化などに関連する遺伝子群の mRNA レベルに影響はみられなかった。以上のことから妊娠後期におけるタンパク質摂取量の半減は，グルコース・インスリン恒常性および成長やエネルギー代謝，脂肪細胞分化に関与する遺伝子群の発現量の変化を介さずに出生後の増体の促進および内臓脂肪蓄積量を増加させることが示唆された。

本研究では，妊娠後期におけるタンパク質制限は産子の 24 週齢時のいずれの臓器サイズに影響しなかった。Heら(2013)は母ヤギの妊娠後期のタンパク質制限は，6 週齢時の産子の心臓，肺，胃，小腸，腎臓，脾臓，肝臓，膵臓といった主要な臓器の重量に影響しなかったことを報告しており (Heら 2013)，本研究と同様の結果であった。

本研究では，妊娠後期におけるタンパク質制限による哺乳時の増体量について，雄産子のみでみられ，雄産子で顕著に代謝プログラミング効果がみられた。肉牛の研究では，妊娠初期に栄養制限した際に，雌ではなく雄産子でのみ脂肪の蓄積量が増加されることが報告されている (Fordら 2007; Jaquiereら 2016)。さらに，ラットの研究では，胎子期および新生子期のタンパク質制限は生殖機能を変更し，女性の子孫の生殖加齢を加速すること (Guzmánら 2006)や妊娠中と

授乳中のタンパク質制限は，性別特異的に，雄産子を選択的に肝臓の脂質含量をの長期的な減少を引き起こす（Qasemら2010）ことが明らかにされており，胎子期の代謝プログラミングは性別特異的に発現するものがあることが考えられ，胎子期の栄養制限による脂肪蓄積の亢進は雄性の産子で顕著であることが示唆された。

本研究では出生後の増体および24週齢時の空体重量は雌より去勢雄が高く，腎臓周囲脂肪，大網膜脂肪重量は去勢産子より雌産子で重かった。この結果は，めん羊の性別の枝肉成績の差異を調査した研究において，去勢雄は雌よりも発育速度が早く，枝肉重量が重いことと同様であった（Bennettら1991）。また，本研究では，22週齢に，去勢雄は雌よりグルコース投与時のインスリンAUCが高く，グルコースAUCが低いことから，去勢雄は雌よりインスリン分泌量が多く，耐糖能が高いことが推察された。牛ではインスリン感受性および耐糖能を評価するために，耐糖能試験が利用されている（Cartiffら2013）。インスリン感受性とグルコース代謝の変化は，エネルギー代謝および飼料効率に影響する可能性があるとして（Welchら2012），インスリンは，アミノ酸輸送量，タンパク質合成量を増加させることにより筋組織のエネルギー需要を増加させ，筋肉タンパク質分解を分解させる

(Hocquette ら 1998)。骨格筋組織のインスリン感受性の向上は、血中インスリン濃度の恒常的な低下と、枝肉重量の増加と枝肉の脂肪構成比に関与する (Hocquette ら 1998)。育成期の子めん羊の増体においてインスリン分泌量やインスリン感受性が重要である (Wolff ら 1989)。以上のことから、雄の成長が雌より早いことは、雌よりも高いインスリン分泌能と高耐糖能に部分的に起因していることが考えられた。

本研究では、胎子期 (妊娠後期) のタンパク質制限は、グルコース-インスリン恒常性や成長やエネルギー代謝、脂肪細胞分化に関与する遺伝子群の発現量の変化を介さずに、出生後の増体の促進や内臓脂肪の蓄積量を増加させることが明らかになり、胎子期の栄養制御により産子の成長および脂肪蓄積を制御できる可能性が示唆された。

## 小括

第 2 章では，妊娠後期における母めん羊のタンパク質摂取量の半減による胎子の低タンパク質環境への暴露は，出生後の成長や脂肪蓄積に関連する遺伝子群の発現量ならびにグルコースーインスリン恒常性の変化を伴わずに，離乳後の増体，内臓脂肪組織の蓄積を亢進することが明らかとなり，妊娠後期の栄養制限により産子の増体や脂肪組織の蓄積量を増加させる可能性が示唆された。

### 第 3 章 子めん羊への初乳追加給与が哺乳中の成長，血中成分および LPS 負荷試験応答に及ぼす影響

#### 緒言

前章では，胎子期のタンパク質制限環境への暴露と出生後の成長と脂肪蓄積への影響を調査し，胎生期の栄養制御による子畜の出生後の成長および脂肪蓄積亢進の可能性を明らかにした。序論において前述したように，現在では，初乳中の生理活性物質の母子間の伝搬が産子の行動，内分泌特性や生涯乳量などの生理機能に影響する可能性が示されている。ウシ，ウマ，めん羊，ヤギ，ブタなどの有蹄類家畜では，胎生期では胎盤を介して母子間で抗体が移行しないことから，新生家畜は IgG を有さずに生まれ，出生後初乳から IgG を摂取することにより受動免疫を獲得し，未成熟な免疫機能が発達するまで病原体から保護する。

ウシの初乳は常乳と比較して栄養価が高く，ミネラル，ビタミン，免疫グロブリン（主に IgG）を含み，成長ホルモン，インスリン様成長因子などの成長因子や，プロラクチン，インスリン，グルカゴンなどのホルモンを高濃度で含有し（Blum ら 2000；Blum 2006；Godden ら 2019；Stelwagen ら 2009），サイトカインや，ラクトフェリン，デフェンシン，

カテリシジンなどの免疫関連に関連する成分も多様に含み、産子の免疫機能に大きく影響することが示唆されている (Stelwagen ら 2009, Godden ら 2019)。

一方では、初乳の増量給与が産子の生理機能の発達を促進する研究が複数報告されている。新生子牛に生後 3 日間にわたり初乳を増量給与した場合、生後 5 日齢におけるキシロース経口投与時の血中キシロース濃度が対照区より増加したことから、小腸の吸収能が促進されることが報告されている (Hammon と Blum 1997)。新生子牛に初乳を生後 3 日間増量給与した場合、8 日齢時における回腸および小腸全体におけるインスリン様成長因子 I 受容体数が増加する

(Hammon と Blum 2002)。新生子牛に初乳を生後 3 日間給与し続けた場合、8 日齢時における小腸の絨毛サイズ、陰窩の深さが増大し、十二指腸、空腸の上皮細胞の増殖率に影響し、膵臓のリパーゼ活性に影響することが明らかにされている (Blättler ら 2001)。ブラウンスイス種泌乳牛の研究では、出生後に初乳を倍量給与した場合、出生から 4 ヶ月齢までの治療費が半減し、増体の向上、初産時と 2 産次における泌乳量の増加をもたらすことが報告されている (Faber ら 2005)。また、新生子牛に出生後 14 日間にわたり、初乳を原料とした添加物を代用乳に添加すると、離乳以前の増体

の向上，下痢の発生率低下，抗生物質投与量の低減することが報告されており（Bergeら 2009），初乳に含有される成分が産子の免疫機能を亢進する可能性が示されている。このように，既存の初乳の増量給与の研究は短期的な影響の調査にのみにとどまり，また，初乳増量給与の長期的な成長や免疫機能への影響を調査した研究はほとんどない。本研究では，新生子めん羊に生後7日間に渡り初乳を追加給与し，9週齢時の離乳時までの成長および免疫機能に及ぼす影響を調査することを目的とした。

## 材料と方法

本研究における動物実験は、弘前大学動物実験委員会で審査、承認された動物実験計画（動物実験計画承認番号：A08019）に従って実施した。

### 母羊の飼養管理

弘前大学農学生命科学部附属生物共生教育研究センター金木農場（五所川原市，青森県）において，サフォーク種めん羊の交配を行った。雌めん羊群に雄めん羊を5週間同居させ，自由に自然交配させた。1日の1頭あたりの給与量は体重の1%の子牛用配合飼料（「北日本子牛」，北日本くみあい飼料，原物あたり CP：15.5%，TDN：70%）とし，乾草は飽食とした。雌めん羊は，雄めん羊との同居期間完了から10週経過した時点で，交配させた雌めん羊13頭（平均体重  $71.8 \pm 7.3$  kg）を弘前大学農学生命科学部構内の家畜舎に移送し，個別のペンに収容して飼育した。分娩まで，妊娠後期（双胎）に要する TDN 要求量（日本飼養標準めん羊 1996 年版，農林水産技術会議事務局編）を給与した。給与飼料はアルファルファヘイキューブと子牛用配合飼料（「JA ビーフ後期」，北日本くみあい飼料，原物あたり CP：12.0%，TDN：75.0%）とし，各飼料で TDN 量を 50% ずつ満たす量を給与した。分娩後は，

授乳前期（双胎）に要する TDN 要求量（農林水産省農林水産技術会議事務局編 1996）をアルファルファハイキューブと子牛用配合飼料で，各飼料で TDN 量を 50% ずつ満たす量を給与した。試験期間を通して，妊娠後期に要するビタミン A 要求量のビタミン・ミネラルプレミックス剤（パワーミックス S，小田島商事，岩手）を，1 週間に 1 度，1 週間分をまとめて給与した。給与時刻は 9:00 と 17:00 とした。試験期間中，水および鉍塩は不断給与とした。

#### 産子の飼育管理

13 頭の妊娠めん羊の分娩成績は，単胎が 1 腹，双胎が 9 腹，品胎が 1 腹および空胎が 2 腹であった。単子と双子の産子とで母乳の摂取量が異なることが予想されるため，本研究では，健全に育成した双子産子のみを調査対象とした。9 頭の双胎分娩母羊のうち，1 頭が哺乳期で誤嚥性窒息により死亡，2 頭が死産，1 頭が双子産子の中の 1 頭が出生翌日に圧死，1 頭が双子産子の中の 1 頭が先天奇形であったため，これら 5 腹を調査対象から除外した。

出生後，全ての産子は母羊から初乳を摂取させた。産子の処理区への振り分けは以下のとおりであった。双子のうちの片方を自然哺育のみで飼育する対照区，もう片方の産子を自

然哺育での飼育に加えて市販の牛用初乳製剤（グッドスタート；全国酪農業協同組合連合会，東京，日本）を出生後7日間追加給与する追加給与区に配した。処理区間で出生体重に偏りがないように配置した。初乳製剤液は，初乳製剤粉末に5倍量の温湯（40℃）を加えて調製した。初乳製剤液の1日の追加給与量は体重1kgあたり50gとし，午前と午後に二等分して哺乳瓶を用いて給与した。乳追加給与処理が完了した8日齢以降は，全頭，自然哺育により9週齢まで飼育した。産子の体重測定および採血は出生日，3日齢および1週齢から9週齢まで毎週行った。血液はヘパリンナトリウムフィルム入り真空採血管（TERUMO，東京）を用いて頸静脈から採血した。採取した血液は15分間遠心分離（4℃，3000rpm）した後，血漿を分取して分析まで-30℃で保管した。また，糞中IgA含量の測定のため，3，5，7および9週齢時に直腸内から糞便サンプルを採取して分析まで-30℃で保存した。

#### リポ多糖（LPS）負荷試験およびと畜解体調査

初乳製剤の追加給与が免疫機能に及ぼす影響を評価するために2，5，8週齢時にリポ多糖負荷試験を実施した。負荷試験実施日の正午に，LPS from *Escherichia coli* 055:B5（LPS；Sigma-Aldrich，Saint Louis，MO，USA）を体重1kgあたり

300ng 皮下に投与して，0（投与直前），1，2，3，4 時間後に頸静脈からヘパリン処理真空採血管（TERUMO，東京，日本）を用いて採血および水銀温度計を用いて直腸温を測定した。採取した血液はで 15 分間遠心分離（4℃，3000rpm）した後，血漿を分取して分析まで -30℃で保存した。

2，5，8 週齢時に皮下 LPS 負荷試験を実施した。負荷試験実施日の正午に，LPS（Lipopolysaccharides from *Escherichia coli* 055:B5, Saint Louis, Sigma-Aldrich, MO, USA）を体重 1 kg 当たり 300ng の量を皮下に注入して 0（投与直前），1，2，3，4 時間後に水銀温度計を用いて直腸温を測定した。投与 1 時間後にヘパリンナトリウムフィルム入り真空採血管（TERUMO，東京）を用いて頸静脈から採血した。採取した血液は 15 分間遠心分離（4℃，3000rpm）した後，血漿を分取して TNF- $\alpha$  分析まで -30℃で保存した。

9 週齢時に体重 1kg 当たり 97.2mg のペントバルビタールナトリウム（ソムノペンチル，64.8mg/mL，共立製薬，東京）を静脈内に投与した後速やかに頸動静脈を切開，放血して安楽死させた。開腹して臓器重量を測定した。胃腸管は水道水で内容物を洗浄した後に重量を測定した。空体重量は体重から消化管内容物重量を引いて算出した。各臓器の空体重に対する相対重量は空体重 1kg あたりの相対重量として算出した。

## 血中成分分析

出生日と3日齢と1週齢以降9週齢まで毎週採取した血漿は、血漿中の尿素態窒素、グルコース、NEFA、リン脂質、トリグリセリド、総コレステロール、総タンパク質、アルブミン、グロブリン濃度および血中アルブミン/グロブリン比を市販のキット（尿素態窒素-B test, グルコース CII test, NEFA C-test, リン脂質 C-test, トリグリセリド E-test, コレステロール E-test, 総タンパク質 test および A/G キット（和光純薬工業, 大阪, 日本）を用いて測定した。血漿中インスリン濃度は Bovine insulin ELISA kit (Merckodia, Uppsala, Sweden) を用いてサンドイッチ ELISA 法により測定した。血漿中コルチゾール濃度は Cortisol ELISA kit (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA) により競合 ELISA 法により測定した。測定方法は、キットの推奨手順に従った。

血中 IgG, IgA および IgM 濃度は Bethyl laboratories の ELISA reagent kits を使用してサンドイッチ ELISA 法により測定を行った。すなわち、MAXI SORP 96 ウェルマイクロプレート (NUNC) に炭酸/重炭酸緩衝液 (pH9.6) で希釈したウサギポリクローナル抗ヒツジ IgG, IgA, IgM 抗体 (Bethyl laboratories, Montgomery, TX, USA) を 100ul/ウェルずつ分注して室温で1時間放置した。その後、オートプレートウ

オッシュャー (Biorad, Hercules, CA, USA) を用いて TBS-T (pH 8.0) で 5 回洗浄した後, TBS-T (pH 8.0) を 200ul/ウェルで加え室温で 30 分間放置した。その後, 前述と同様に, プレート洗浄して標準物質希釈系列および 20 万倍に希釈した血清を 100ul/ウェルで加え 1 時間室温で静置した。標準物質の希釈系列および血清の希釈は TBS-T (pH 8.0) により行い, ヒツジ IgG, IgA および IgM の標準物質はそれぞれ Sheep Purified IgG (Bethyl laboratories, Montgomery, TX, USA), Normal/Pre-immune control sheep IgA (Alpha Diagnostic international, San Antonio, TX, USA) および Sheep IgM whole molecule (Rockland, Limerick, PA, USA) を用いた。その後, プレート洗浄して TBS-T (pH 8.0) により希釈した HRP 標識ウサギポリクローナル抗ヒツジ IgG, IgA, IgM 抗体 (Bethyl laboratories, Montgomery, TX, USA) を 100ul/ウェルで加え, 室温で 1 時間放置した。プレート洗浄して発色基質として TMB 溶液 (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD, USA) を 100ul/ウェルで加え, 暗所で 15 分間酵素基質反応させた。その後, 0.18M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液を 100/well 加え反応を停止させ, マイクロプレートリーダー (Varioskan LUX ; Thermo fisher scientific, Waltham, MA, USA) を用いて 450nm で吸光度測定した。すべての血中

成分の測定は2反復で行った。

糞中 IgA 含量の測定方法は以下のとおりである。糞便サンプルを 50mg に対して 20 倍量のプロテイナーゼインヒビター (Complete mini; Roche, Basel, Switzerland) 溶液を加えよく攪拌した後, 室温で 120 分静置した。5 分間遠心分離 (15000×g, 4°C) した後, この上清を IgA ELISA 分析に用いた。測定方法は血中 IgA と同様の手順により測定を行った。

LPS 投与 1 時間後に採取した血漿は血中 TNF- $\alpha$  濃度を測定した。TNF- $\alpha$  は Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit For Ovine Tumor Necrosis Factor Alpha (Cat# SEA133OV; Cloud clone corp, Katy, TX, USA) を用いてサンドイッチ ELISA 法によりキットの測定手順に従って測定した。

#### 計算および統計解析

補正日増体量は, 各期間の日増体量を生時体重で除して算出した。

飼養成績のデータおよび 3 日齢と 7 日齢時の血中成分濃度は対応のある t 検定により解析した。血中成分, 糞中 IgA 含量, LPS 負荷試験時の体温データは処理および時間を要因とした反復測定分散分析により解析した。統計処理は SPSS Statistics V 22.0 (IBM, NY, USA) を用いた。要因間に交

相互作用が認められた ( $P < 0.10$ ) 項目は各測定時で対応のある t 検定により解析を行った。データは平均  $\pm$  標準誤差で示した。有意水準は  $P < 0.05$  を有意差ありとし,  $0.05 \leq P < 0.10$  を傾向ありとした。

## 結果

産子の性別の内訳は，対照区が雄産子 3 頭，雌産子 1 頭，追加給与区が雄産子 1 頭，雌産子 3 頭であった。産子の体重と増体を表 1 に示した。出生時，7 日齢および 9 週齢の体重に処理区間差はなかった。出生から 1 週齢および出生から 9 週齢までの日増体に処理区間差はなかった。しかし，出生体重で補正した出生から 7 日齢までの日増体は追加給与区が対照区より低い傾向がみられた ( $P = 0.09$ )。

産子の 9 週齢時の空体重，空体重に対する各臓器，内臓脂肪重量，組織構成割合を表 2 に示した。空体重に処理区間差はなく，脾臓の相対重量は追加給与区が対照区より有意に低かった ( $P = 0.01$ )。腎臓周囲脂肪 ( $P = 0.09$ ) と腹腔内臓脂肪の合計重量 ( $P = 0.06$ ) は追加給与区が対照区より高い傾向がみられた。脾臓以外の臓器の相対重量に処理区間差はなかった。枝肉中の赤肉，脂肪および骨の割合に初乳追加給与の効果は認められなかった。

2, 5, 8 週齢時に実施した LPS 負荷試験時の LPS 投与後の直腸温の推移を図 1 に示した。2 週齢時の直腸温は対照区より追加給与区が低く推移する傾向がみられた ( $P = 0.07$ )。5 週齢では処理の効果は認められなかったが，8 週齢時では処理と時間の交互作用の傾向 ( $P = 0.08$ ) がみられ，投与後 1

時間時点で追加給与区が対照区より高く ( $P < 0.05$ ), 投与後 4 時間時点では対照区より低い傾向 ( $P < 0.10$ ) がみられた。

2,5 および 8 週齢時に実施した LPS 投与後 1 時間時点における血漿中 TNF- $\alpha$  濃度を図 2 に示した。いずれの週齢においても LPS 投与後 1 時間時点における血漿中 TNF- $\alpha$  濃度に初乳追加給与の影響はみられなかった。

試験期間中の血中成分, インスリンおよびコルチゾール濃度の推移を図 3 に示した。血漿中の尿素態窒素, グルコース, NEFA, リン脂質, トリグリセリド, 総コレステロール, 総タンパク質, アルブミン, グロブリン濃度, および血中アルブミン/グロブリン比に処理の効果あるいは処理と時間の交互作用は認められなかった。また, 血漿中インスリンおよびコルチゾール濃度においても処理区間差および交互作用はなかった。

表 3 に産子の 3 日齢と 7 日齢時の血中代謝成分, インスリンおよびコルチゾール濃度を示した。血中トリグリセリド濃度は 7 日齢時に初乳追加給与区が対照区より低かった ( $P = 0.04$ )。血漿中コルチゾール濃度は 3 日齢時に初乳追加給与区が対照区より高かった ( $P = 0.03$ )。

血中免疫グロブリン濃度の推移を図 4 に示した。血中 IgG, IgA および IgM で日齢の進行に伴い血中濃度の低下がみられた ( $P < 0.01$ ) が, いずれの免疫グロブリンのクラスに処理区間差および交互作用はなかった。

3, 5, 7 および 9 週齢の糞中 IgA 含量の推移を図 5 に示した。3 週齢時で高く, 週齢に伴い糞中の IgA 濃度は低下した ( $P < 0.01$ ) が処理区間に差は認められなかった。

図表

表 1. 対照区および初乳追加給与区における産子の体重, 増体 (平均±標準誤差)

項目	処理区		P値
	対照区	追加給与区	
体重, kg			
出生	3.46±0.41	3.84±0.71	0.65
3日齢	4.65±0.53	5.05±0.95	0.70
1週齢	6.05±0.61	6.32±1.15	0.84
9週齢	22.2±2.3	22.9±1.5	0.64
日増体量, kg/日			
出生から3日齢	0.40±0.04	0.40±0.09	0.93
3日齢から1週齢	0.35±0.03	0.32±0.05	0.60
出生から1週齢	0.37±0.03	0.35±0.06	0.79
1週齢から9週齢	0.29±0.03	0.30±0.01	0.71
出生から9週齢	0.29±0.03	0.30±0.02	0.79
補正日増体量			
出生から3日齢	0.115±0.007	0.103±0.010	0.36
3日齢から1週齢	0.104±0.008	0.084±0.006	0.02
出生から1週齢	0.109±0.006	0.092±0.001	0.09
1週齢から9週齢	0.085±0.009	0.085±0.015	0.98
出生から9週齢	0.087±0.008	0.086±0.013	0.94

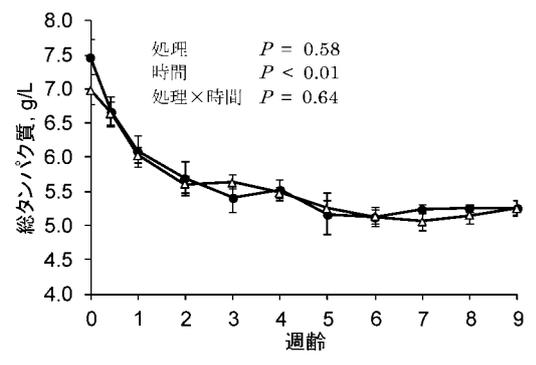
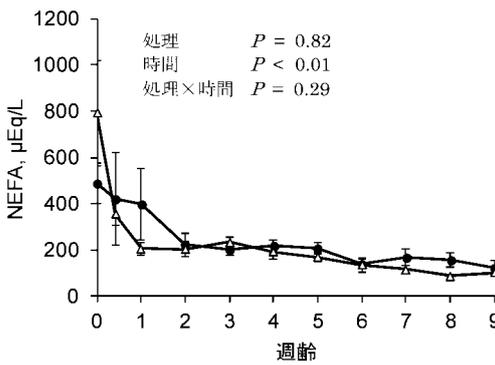
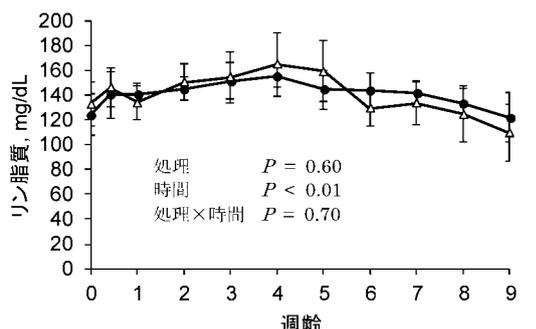
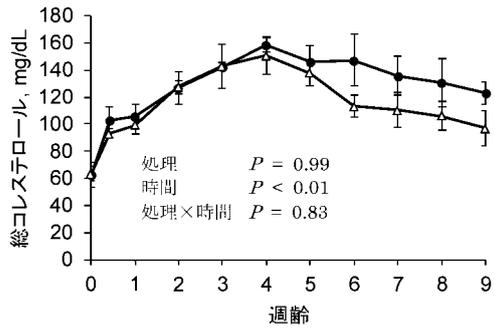
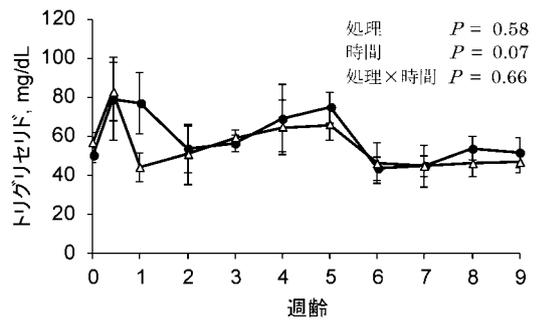
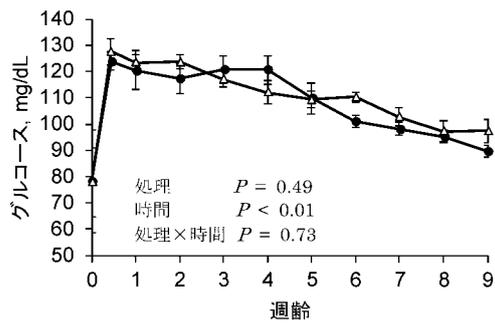
補正日増体量 = 日増体量/出生時体重, kg

表 2. 対照区および初乳追加給与区における産子の 9 週齢時の空体重および相対臓器重量  
(平均±標準誤差)

項目	処理区		P 値
	対照区	追加給与区	
空体重, kg	18.7±1.8	18.7±1.1	0.98
枝肉重量, kg	10.9±1.1	10.7±1.8	0.73
頭部, kg	1.25±0.08	1.24±0.05	0.98
皮+羊毛+四肢, kg	2.59±0.18	2.60±0.14	0.92
相対臓器重量, g/空体重 kg			
脳	3.83±0.47	3.91±0.25	0.80
血液	47.6±1.42	46.9±1.28	0.64
心臓	5.78±0.10	5.71±0.05	0.56
肺	12.1±0.31	12.7±0.35	0.28
胸腺	4.00±0.43	4.21±0.64	0.83
甲状腺	0.074±0.01	0.094±0.01	0.17
肝臓	16.9±0.57	18.5±0.50	0.17
膵臓	1.34±0.09	1.40±0.13	0.29
脾臓	7.43±0.56	4.93±0.59	<0.01
副腎	0.08±0.01	0.09±0.01	0.77
腎臓	4.15±0.12	4.32±0.14	0.27
第 1 胃および第 2 胃	16.2±1.63	18.5±1.13	0.41
第 3 胃	1.42±0.14	1.71±0.11	0.29
第 4 胃	5.35±0.37	5.69±0.39	0.63
小腸	30.3±1.3	36.9±2.7	0.14
大腸	9.5±0.4	10.4±0.5	0.41
心臓周囲脂肪	4.38±0.40	4.06±0.17	0.36
大網膜脂肪	8.92±1.52	11.03±0.62	0.15
腸間膜脂肪	8.22±0.81	9.60±0.53	0.33
腎臓周囲脂肪	8.66±0.96	10.05±1.30	0.09
腹腔内脂肪合計	25.8±2.3	30.7±2.1	0.06
枝肉の組織構成割合, %			
赤肉	59.1±0.63	58.7±0.37	0.49
脂肪	17.7±0.84	17.7±0.53	0.95
骨	22.3±0.26	22.9±0.19	0.36
その他	0.87±0.02	0.71±0.07	0.43

表 3. 対照区および初乳追加給与区における産子の 3 および 7 日齢時の血中成分濃度 (平均±標準誤差)

項目		処理区		P値
		対照区	追加給与区	
グルコース, mg/dl	3 日齢	124±4	128±5	0.69
	7 日齢	121±7	123±3	0.62
トリグリセリド, mg/dl	3 日齢	79±21	83±15	0.91
	7 日齢	77±16	44±7	0.04
総コレステロール, mg/dl	3 日齢	103±10	93±3	0.41
	7 日齢	106±9	99±6	0.31
リン脂質, mg/dl	3 日齢	140±19	146±16	0.84
	7 日齢	141±9	134±14	0.51
NEFA, $\mu$ Eq/L	3 日齢	420±198	354±52	0.80
	7 日齢	398±154	204±30	0.27
総タンパク質, g/L	3 日齢	6.7±0.2	6.6±0.2	0.95
	7 日齢	6.1±0.2	6.0±0.1	0.82
アルブミン, g/L	3 日齢	2.7±0.1	2.7±0.1	0.95
	7 日齢	2.8±0.1	2.8±0.1	0.63
グロブリン, g/L	3 日齢	4.0±0.2	4.0±0.2	0.97
	7 日齢	3.3±0.2	3.3±0.1	0.95
アルブミン/グロブリン比	3 日齢	0.7±0.1	0.7±0.1	1.00
	7 日齢	0.9±0.1	0.8±0.1	0.89
コルチゾール, ng/ml	3 日齢	19.4±3.9	40.0±6.9	0.03
	7 日齢	19.3±3.3	22.3±5.2	0.33
IgG, mg/ml	3 日齢	24.4±2.1	22.2±1.2	0.41
	7 日齢	19.2±1.9	18.4±0.3	0.74
IgA, mg/ml	3 日齢	3.0±1.2	3.2±1.3	0.88
	7 日齢	0.5±0.3	0.6±0.2	0.77
IgM, mg/ml	3 日齢	4.6±1.0	4.3±1.4	0.69
	7 日齢	2.7±0.6	2.6±0.9	0.87



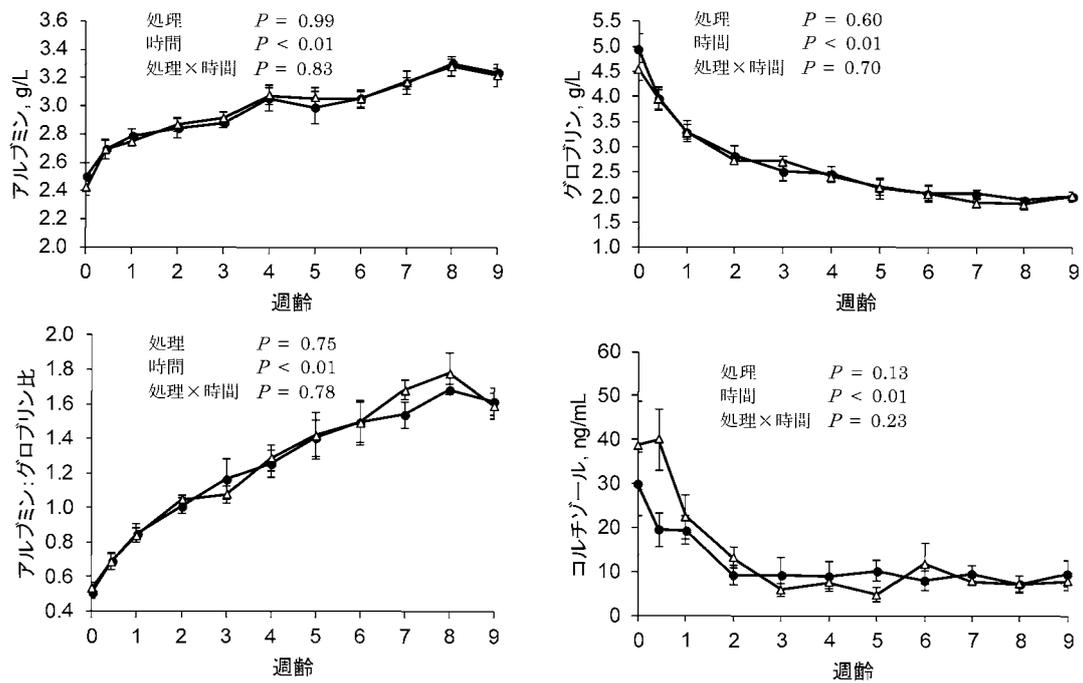


図 1. 対照区 (●) および初乳追加給与区 (△) の産子の血中成分濃度の推移 (平均±標準誤差)

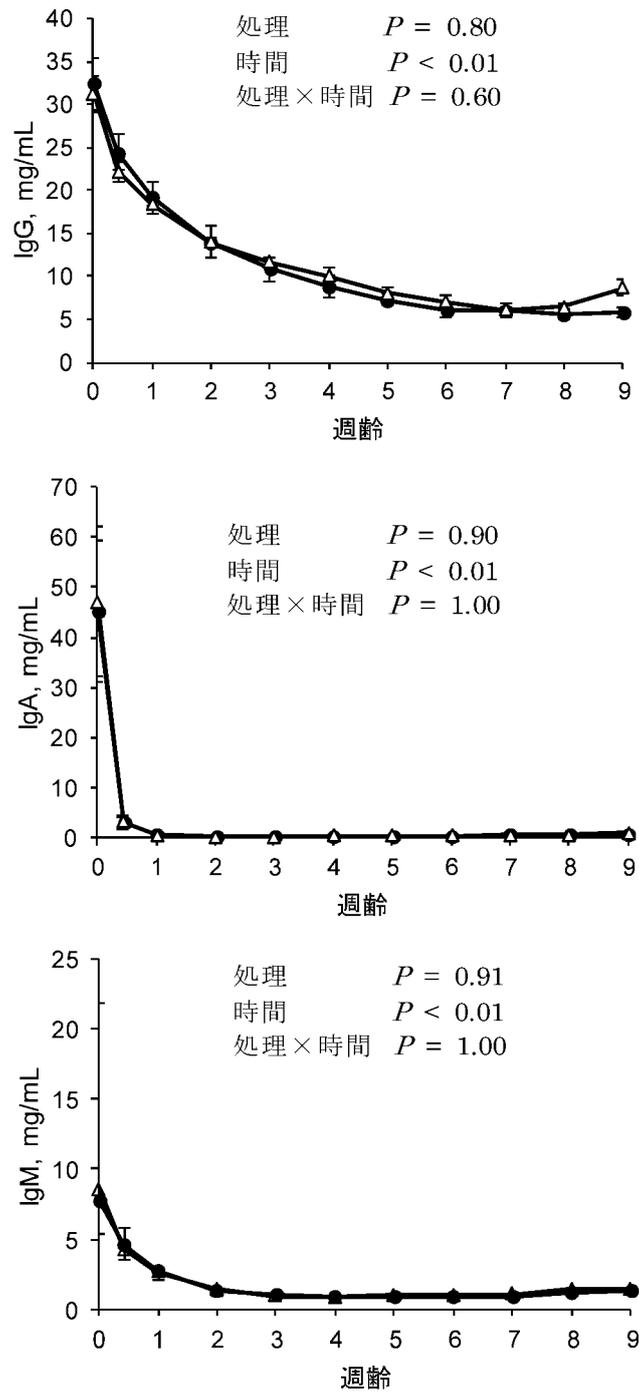


図 2. 対照区 (●) および初乳追加給与区 (△) の産子の血中 IgG, IgA および IgM 濃度の推移 (平均±標準誤差)

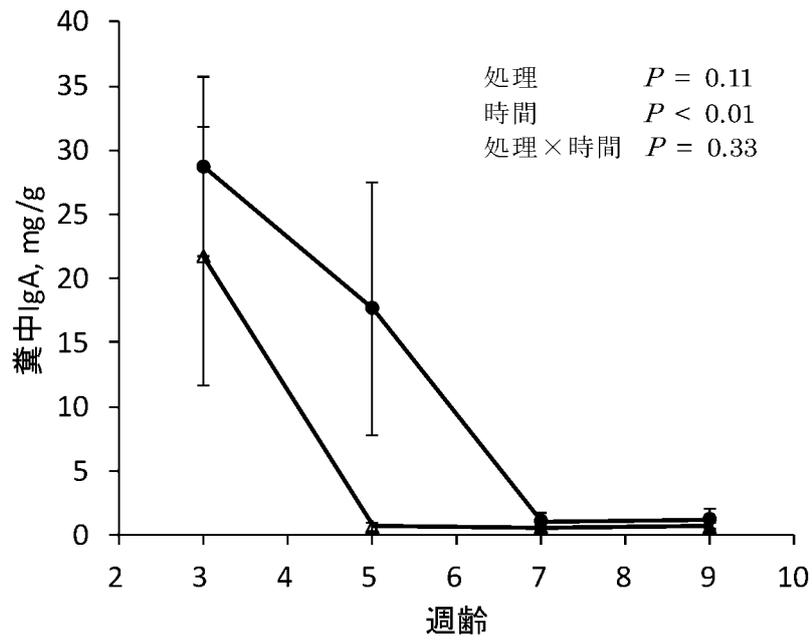


図 3. 産子の対照区 (●) および初乳追加給与区 (Δ) の 3, 5, 7 および 9 週齡時における糞中 IgA 含量 (mg/新鮮糞 g) の推移 (平均±標準誤差)

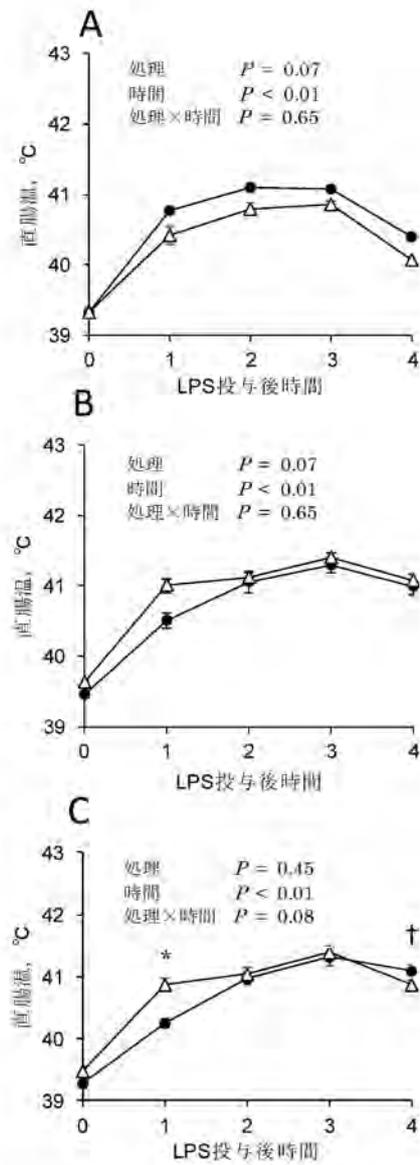


図 4. 対照区 (●) および初乳追加給与区 (Δ) の産子の 2 (A), 5 (B) および 8 (C) 週齢時における LPS 投与 (300ng/kgBW) 後の直腸温の推移 (平均±標準誤差)  
 \* および † は同測定時点における処理区間差を示す (\*,  $P < 0.05$ ; †,  $0.05 \leq P < 0.10$ ) .

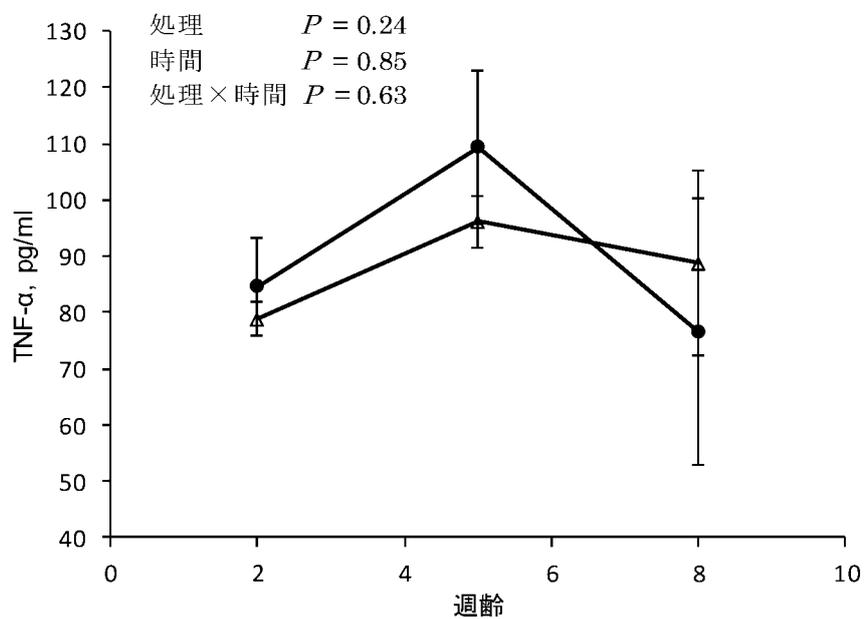


図 5. 産子の対照区 (●) および初乳追加給与区 (△) の 2, 5 および 8 週齢時における LPS 投与 (300ng/kgBW) 後 1 時間時点の血中 TNF-α 濃度 (平均±標準誤差)

## 考察

本研究では，初乳追加給与区において，7日間の初乳の追加給与期間の増体の低下傾向および9週齢時の脾臓重量の低下がみられた。本研究の初乳追加給与時は，産子は追加給与量の設定量の95%以上を摂取したが，追加給与作業は作業が遅れた場合1時間程度継続し，追加給与後のしばらくの間は，同腹の産子と比較して母親からの吸乳行動がやや停滞していたことが観察された。ラットの研究では，水泳運動の強制およびガラス製円筒拘束器内への拘束によるストレスに暴露された場合，脾臓重量が有意に低下することが報告されている（Sarjanら，2017）。また，鳥類の研究では，野生のイエスズメを捕獲後，人為的に飼育した際，ストレスを受け脾臓の重量が低下する報告がなされている（Loveら，2017）。以上から，本研究では初乳の追加給与と同時に，追加給与にあたっての人為的な哺乳作業が産子へのストレスとなり，追加給与期間中の母乳の摂取量が低下し増体が抑制されるとともに，脾臓の発達が抑制されることが推察された。

本研究では，LPS投与後の直腸温が2週齢時では対照区に比べて初乳追加給与区で低く推移し，8週齢時では，体温の上昇パターンに変化がみられた。病原体感染後の体温上昇の生理学的意義は，体内に侵入した病原体の増殖を抑制し，免

疫系の活性化を促す (Dianzani と Baron, 1996) ことから、初乳追加給与区では、人為的な哺育作業によるストレスは病原体感染時の発熱応答を弱め、病原体への抵抗性を低下させる可能性が考えられた。

本研究では、血中免疫グロブリン濃度が出生後に最も高く、その後週齢に伴い血中濃度が低下した。新生子めん羊は 4-8 週齢程度から、血中 IgG 濃度が上昇し始めることが報告されており (Hernández-Castellano ら 2017; McGovern ら 2017)、本研究でも血中 IgG 濃度が 9 週齢には上昇傾向がみられた。

本研究では、初乳追加給与により 7 日齢時の血中トリグリセリド濃度の上昇および 9 週齢時の腹腔内脂肪重量の増加傾向がみられた。新生子牛に生後 3 日間初乳を増量給与した研究では、2 日齢時の血中トリグリセリド濃度と 7 日齢時の血中コレステロールおよびリン脂質濃度が有意に増加することを報告しており、この理由を著者らは初乳増量給与による脂肪吸収率の増加によると考察している (Hammon と Blum 1998)。本研究でも初乳追加給与により脂肪吸収率が改善され、9 週齢時の内臓脂肪の脂肪蓄積量が増加したことが考えられた。

以上より、本研究では、出生後 7 日間の初乳製剤の追加給与は、人為的な哺育作業が産子のストレスとなる可能性がある

り，脾臓の発達を抑制し，抗原感作時の発熱応答の低下をもたらし，追加給与期間中の増体抑制および離乳時の免疫機能を抑制する可能性が示された。

## 小括

第 3 章では，出生後 7 日間の初乳追加給与は，追加給与時の人為的な哺乳作業は，増体の抑制および脾臓サイズの低下，抗原感作時の発熱応答を低下させ 9 週齢時の免疫機能を抑制する可能性，ならびに子めん羊の出生後の小腸における脂質の吸収を促進し 9 週齢時の内臓脂肪蓄積量を増加させることが明らかになった。

## 第 4 章 マウスの一腹哺乳匹数調整による哺乳量の増加が成長および免疫機能に及ぼす影響

### 緒言

第 3 章では，出生後の初乳の追加給与により腸の脂質吸収促進により内臓脂肪蓄積を促進されることが示された。序論で述べたように，現在では，胎子期のみならず，出生後の哺乳期の栄養水準を始めとする環境要因と以降の発育段階における内分泌機能や代謝機能に影響することがげっ歯類の研究で明らかにされつつある。哺乳期の栄養水準を制御する手法として，マウスやラットを用いて哺乳期の栄養状態の影響を調べるために，一腹あたりの産子数を分娩後に 3-4 匹（高栄養条件），8-10 匹程度（通常栄養条件），16 匹程度（栄養欠乏区）に調整して個々の産子の哺乳量を変化させる手法（Fiorotto ら 1991）が利用され，成熟期以降の代謝機能，内分泌機能および炭水化物代謝の酵素活性に対する永続的な影響（Aubert ら 1980；Duff と Snell 1982）や，成熟期のインスリン抵抗性発症との関連（Bei ら 2015），インスリン分泌への長期的な影響などが明らかにされている。

家畜生産の現場において，現在，子牛の発育促進や慣行的な早期離乳方式における疾病や斃死などの損耗発生率低下を

意図して成分組成を調整した代用乳の増量給与が普及しつつある。哺乳期の代用乳の増量給与による乳用子牛の成長促進が初産時の乳量増加につながること (Soberon ら 2012 ; Soberon と Van Amburgh 2013) や高タンパク質低脂肪の代用乳の増量給与が発育向上に加えて病原体に対する抵抗性など免疫能の向上を示唆する結果が得られている (Nonnecke ら 2003 ; Hengst ら 2012 ; Obeidat ら 2013 ; Ollivett ら 2012 ; Ballou ら 2012) が, 成熟後の免疫機能への影響は明らかになっていない。

出生後, ヒトやマウスでも, 母体由来の受動免疫を取得した後, ヒトでは 1-2 歳 (Calder 2013), マウスでは 3-4 週齢から, 自身の IgG の産生を開始して (Stecher と Thorbecke 1967) 免疫機能が発達していく (Maggini ら 2018))。栄養は免疫機能および感染症による疾病率, 死亡率を左右する重要な要因であり, エネルギーやタンパク質, ビタミンやミネラルなどの微量栄養素の欠乏は免疫機能, 特に細胞性免疫や補体系の働きなどに深刻な影響を与えること (Calder 2013 ; Chandra 1992 ; Maggini ら 2018) や母乳摂取が腸内感染に対する耐性を大幅に高める可能性 (Kelly と Coutts 2000) が示されている。また, 免疫機能は加齢に伴って低下して, 病原体への感染リスクが高まる (Calder 2013)。この

ように，栄養や発育，加齢などと免疫機能との関連性を示す知見は少なくないが，初期生育段階の栄養摂取と成熟後における免疫能との関連性を検討した研究はほとんどなく，哺乳量増加による成熟期以降の免疫機能改善の可能性が期待される。

そこで，第4章では，マウスの一腹哺育匹数を調整して哺乳期の哺乳量を制御することにより，哺乳期の哺乳量の増加が性成熟期にいたるまでの成長，臓器発達および免疫機能に及ぼす影響を調査することを目的とした。免疫機能を評価にあたっては，TNF- $\alpha$ ，IL-6などの炎症性サイトカインの急激な産生を伴う全身性の炎症応答モデルとして認められているリポ多糖(LPS)腹腔内投与試験(Fanninら 2005; Smedegårdら 1989)を実施し，骨髓由来のT前駆細胞が選択，増殖，機能分化を経て成熟T細胞が産生される胸腺組織(KochとRadtke 2011; ThapaとFaber 2019)におけるサイトカインのmRNA発現を調査した。

## 材料と方法

本動物実験は弘前大学動物実験委員会で承認され（承認番号：A15002）、動物実験実施に関する規定に従って実施した。

## 供試動物および飼育条件

6週齢の雄および雌のICRマウス（Clea Japan, Tokyo, Japan）を購入して使用した。試験期間を通して、実験動物は、室温  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ，照明 14 時間（5:00 - 19:00）で飼育され，ペレット飼料（飼育繁殖用飼料 CE-2，水分 8.65% CP 25.1%，339.9kcal/100g，Clea Japan）および水道水を自由摂取させた。雄マウスと雌マウスを同一のケージに入れて 5 日間同居させ，自由に交配させた。同居後，雌マウスは個別のケージで飼育し，妊娠判別を体重の増加および腹部の膨隆の有無を目視で確認した。分娩後は全ての出生産子の体重を測定し，産子数が 10 匹以上であることを確認した後，一腹の産子数を 10 匹（雌雄各 5 匹；対照区）あるいは 4 匹（雌雄各 2 匹；栄養強化区）に調整して各区 4 腹ずつを得た。産子数の調整にあたっては，各腹の雌雄それぞれの平均生時体重に，より近い個体を残すように選抜した。産子数調整後は自然哺育で 3 週齢の離乳時まで飼育し，離乳時に各腹から雌雄の平均体重に最も近い個体を雌雄 1 匹ずつ選び，個別のケージで上記

のペレット飼料と水を自由摂取させ 8 週齢まで成長試験を実施した。産子の体重は 3 週齢時と 8 週齢に測定し，飼料摂取量は 3 週齢の離乳から 8 週齢まで毎週測定し，飼料の原物摂取量と増体から飼料効率を算出した。

### と畜解体調査

離乳時と 8 週齢時に，各腹から平均体重に最も近い雄産子と雌産子を選び個別のケージに移し，10mM リン酸緩衝生理食塩水液 (PBS, pH7.4) に溶解した *Escherichia coli* serotype 055:B5 由来のリポ多糖 (LPS, 1mg/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US) を体重 20gBW 当たり 5 $\mu$ g 腹腔内に投与した。投与 3 時間後に頸椎脱臼により安楽死させ，直ちに断頭して血液を採取した。採取した血液は室温で 30 分静置した後，5 分間遠心分離 (10000 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C) により血清を分取して -30 $^{\circ}$ C で保存した。血液を採取した後，開腹して心臓，肝臓，肺，副腎および腎臓，胸腺の重量を計測し，胸腺は速やかに液体窒素で凍結した後 -80 $^{\circ}$ C で保存した。その後，速やかに直腸内糞便を採取して液体窒素中で凍結し分析まで -80 $^{\circ}$ C で保存した。

血中 TNF- $\alpha$  濃度および血中，糞中免疫グロブリン濃度測定

血清中 TNF- $\alpha$  濃度は Legend MAX<sup>TM</sup> mouse TNF- $\alpha$  ELISA kit (Biolegend, San Diego, CA, USA) を用いて、キットの測定手順に従ってサンドイッチ ELISA により測定した。血清中 IgG, IgM および IgA 濃度ならびに糞中 IgA 含量は、それぞれ Mouse IgG ELISA Quantitation Set (Bethyl laboratories, Montgomery, TX, USA), Mouse IgM ELISA Quantitation Set (Bethyl laboratories, Montgomery, TX, USA) および Mouse IgA ELISA Quantitation Set (Bethyl laboratories, Montgomery, TX, USA) を用いて、試薬セットの操作手順に従ってサンドイッチ ELISA により測定した。血清サンプルの希釈倍率は、予備検討の結果から IgG は 5000 倍, IgM および IgA は 1000 倍とした。糞中 IgA については、解凍した糞便 50mg にプロテアーゼインヒビター (Complete Mini; Roche, Basel, Switzerland) を含む PBS を 20 倍量加えて激しく攪拌し室温で 2 時間放置した後、遠心分離 (15000 $\times$ g, 5min, 4 $^{\circ}$ C) して上清を得た。この上清を無希釈あるいは 50 倍希釈して IgA ELISA に用いた。すべての分析は 2 反復で実施した。糞中の IgA 含量は水分含量を 50% と仮定して計算し新鮮物重量あたりの重量で示した。

## **RT-qPCR**

胸腺組織の TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$  および IL-10 の mRNA 発現量を RT-qPCR 法で定量した。Pink bead lysis kit RNase free (CYD-PINKE1-RNA, Next Advance, Troy, NY, USA) および Bullet Blender Storm (CYD-BBY24M, Next Advance, Troy, NY, USA) を用いて凍結保存した胸腺をホモジナイズした後, RNeasy plus mini kit (Qiagen, Maryland, CA, USA) を用いて総 RNA を抽出した。抽出した総 RNA の純度および濃度は NanoDrop-2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて 260nm と 280nm の波長での吸光度とその比を用いて測定した。ReverTra Ace qPCR RT kit (Toyobo, Osaka, Japan) を用いて 200ng の RNA から cDNA の合成を行った。1 ウェルあたりの反応液の組成は Thunderbird SYBR Green master mix 10 $\mu$ l, 10 $\mu$ M PCR Forward および 10 $\mu$ M プライマー各 0.6 $\mu$ l, 鋳型 cDNA 8.8 $\mu$ l を加えた最終液量 20 $\mu$ l とした。PCR 反応は, 95 $^{\circ}$ C で 1 分間の熱処理した後, 92 $^{\circ}$ C で 15 秒と 60 $^{\circ}$ C で 1 分間のサイクルを 40 回繰り返した。すべての分析は 2 反復で実施した。使用したプライマーの配列は Duan ら (2017) が用いたプライマー配列を使用した (表 1)。PCR 産物の特異性は融解曲線解析により確認した。全個体の胸腺から得た cDNA の混合液を標準遺伝子液とし, 標準遺伝子液の希釈系列から作成した標準曲線から各遺伝子の mRNA

発現量を定量し，GAPDHを内部標準遺伝子として GAPDH の定量値で補正して示した。

## 統計処理

産子の1週齢から3週齢までの体重は処理と時間を要因とする反復測定分散分析により解析した。有意水準は  $P < 0.05$  を有意差ありとし，  $0.05 \leq P < 0.10$  を傾向ありとした。要因間に交互作用が認められた項目については各測定時で t 検定を行った。

産子の出生時体重，離乳後の飼養成績，3および8週齢のと畜解体調査により得られたデータは，哺乳期の処理区および産子の性別を要因とする二元配置分散分析により解析した。有意水準は  $P < 0.05$  を有意差ありとし，  $0.05 \leq P < 0.10$  を傾向ありとした。統計解析は SPSS Statistic version 22 (IBM, Armonk, NY, USA) で行った。

## 結果

分娩時の母マウスの週齢は，対照区および哺乳量増加区でそれぞれ 12.1 および 12.3 週であった。一腹あたりの平均産子数は対照区が 13 匹，哺乳量増加区は 12.5 匹であった。産子の出生体重の平均値は，対照区の雄が 1.70g (n=23)，雌が 1.65g (n=29)，哺乳量増加区は雄が 1.65g (n=28)，雌が 1.62g (n=22) で，処理区および性別による有意差はなかった。

表 2 に離乳後の飼養試験における体重，増体，飼料摂取量及び飼料効率を示した。産子の体重は 3 週齢時及び 8 週齢時ともに対照区より哺乳量増加区が重かった ( $P < 0.01$ )。3 週齢時には性差が認められなかったが，8 週齢時の体重は雄産子が雌産子より重かった ( $P < 0.01$ )。3 週齢から 8 週齢までの日増体は処理区間で差はなく，雌産子よりも雄産子が高い結果であった ( $P < 0.01$ )。飼料摂取量は哺乳量増加区が対照区より多く ( $P < 0.01$ )，雄が雌より多かった ( $P < 0.01$ )。代謝体重あたりの飼料摂取量には処理区間差はなく，雄が雌よりも低かった ( $P < 0.01$ )。その結果，飼料効率は哺乳量増加区よりも対照区で高く ( $P = 0.04$ )，雄が雌より高かった ( $P < 0.01$ )。

表 3 に，3 週齢時と 8 週齢時における空体重に対する臓器重量を示した。3 週齢時の心臓の相対重量は哺乳量増加区が

対照区よりも有意に低かった ( $P < 0.01$ )。また、3週齢時の胸腺の相対重量は哺乳量増加区が対照区よりも重い傾向がみられた ( $P = 0.07$ )。8週齢時には、肺の相対重量は哺乳量増加区で対照区よりも低い傾向 ( $P = 0.09$ ) を示し、腎臓および副腎は哺乳量増加区で対照区より重い傾向 ( $P = 0.09$ ) がみられた。肺の相対重量は3週齢 ( $P = 0.02$ ) および8週齢 ( $P = 0.04$ ) とともに雄産子よりも雌産子で高かった。8週齢時には胸腺 ( $P < 0.01$ ) と脾臓 ( $P < 0.01$ ) の重量が雌で雄より有意に重く、腎臓および副腎は雄が雌より有意に重かった ( $P < 0.01$ )。また、肝臓の相対重量は3週齢には雄が雌よりも重い傾向を示した ( $P = 0.08$ ) が、8週齢時にはこの傾向はみられなくなった。

表4に3および8週齢における腹腔内LPS投与3時間後の血清中TNF- $\alpha$ 濃度の結果を示した。血清中TNF- $\alpha$ 濃度は3週齢において哺乳量増加区で対照区よりも高い傾向 ( $P = 0.09$ ) がみられたが、この傾向は8週齢時にはみられなかった。3および8週齢のいずれにおいても性差はみられなかった。

表5に産子の血中IgG, IgAおよびIgM濃度および糞中IgA含量を示した。3週齢時の血中IgG濃度は哺乳量増加区で対照区より有意に低かった ( $P = 0.01$ ) が、8週齢時には処

理区間差がみられなかった。血清中の IgA および IgM 濃度に処理区間差はみられなかったが，8 週齢時に血清中 IgM 濃度が雌で雄よりも高い傾向がみられた ( $P = 0.07$ )。糞中 IgA 含量に処理区間差はみられなかったが，8 週齢時には雄よりも雌で有意に高かった ( $P = 0.02$ )。

表 6 に胸腺のサイトカイン mRNA 発現量を示した。3 週齢時の IFN- $\gamma$  発現量は哺乳量増加区が対照区よりも高い傾向 ( $P = 0.08$ ) を示したが，8 週齢時にはこの傾向は見られなくなった。8 週齢において，TNF- $\alpha$  発現量は哺乳量増加区が対照区よりも高くなる傾向を示した ( $P = 0.07$ )。8 週齢時の IL-10 発現量は処理 ( $P = 0.03$ ) および処理と性の交互作用を示す傾向 ( $P = 0.08$ ) が認められ，哺乳量増加区で対照区よりも高く，雄でその差が大きかった。

図表

表 1. 本研究で使用したプライマー配列

遺伝子	配列
TNF- $\alpha$	Forward 5'-CCCCAAAGGGATGAGAAGTTC-3'
	Reverse 5'-GGCTTGTCACTCGAATTTTGAGA-3'
IL-6	Forward 5'-CGGAGAGGAGACTTCACAGAG-3'
	Reverse 5'-ATTTCCACGATTTCCCAGAG-3'
IFN- $\gamma$	Forward 5'-AAGCGTCATTGAATCACACCTG-3'
	Reverse 5'-TGACCTCAAACCTGGCAATACTC-3'
IL-10	Forward 5'-GGGGCCAGTACAGCCGGGAA-3'
	Reverse 5'-CTGGCTGAAGGCAGTCCGCA-3'
GAPDH	Forward 5'-TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3'
	Reverse 5'-TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG-3'

表 2. 産子の体重および離乳時（3 週齢）から 8 週齢までの日増体，飼料摂取量および飼料効率への哺乳量増加の影響（平均±標準誤差）

項目	処理区				P 値		交互作用
	対照区		哺乳量増加区		処理	性別	
	雄	雌	雄	雌			
供試数	<i>n</i> = 20	<i>n</i> = 20	<i>n</i> = 8	<i>n</i> = 8			
3 週齢時体重	14.3±0.6	13.5±0.7	18.0±0.7	17.7±0.5	<0.01	0.13	0.60
供試数	<i>n</i> = 4	<i>n</i> = 4	<i>n</i> = 4	<i>n</i> = 4			
8 週齢時体重	37.4±1.0	29.8±0.4	42.4±1.8	33.0±0.5	<0.01	<0.01	0.41
離乳-8 週齢							
日増体, g/日	0.65±0.01	0.46±0.01	0.69±0.04	0.43±0.02	0.82	<0.01	0.21
飼料摂取量, g/日	5.52±0.03	5.02±0.13	6.19±0.21	5.51±0.21	<0.01	<0.01	0.60
飼料摂取量/代謝体重	0.43±0.01	0.46±0.01	0.44±0.01	0.46±0.01	0.95	0.04	0.66
飼料効率	0.12±0.01	0.09±0.01	0.11±0.01	0.08±0.01	0.04	<0.01	0.51

代謝体重 = 3-8 週齢の平均体重<sup>0.75</sup>

飼料効率 = 3-8 週齢の増体(g) / 3-8 週齢の飼料摂取量(g)

表 3. 産子の離乳時（3 週齢）と 8 週齢時の相対臓器重量（%BW）への哺乳量増加の影響（平均±標準誤差）

項目	処理区				P 値		
	対照区		哺乳量増加区				
	雄 (n=4)	雌 (n=4)	雄 (n=4)	雌 (n=4)	処理	性別	交互作用
離乳時							
胸腺	0.58±0.02	0.59±0.02	0.62±0.04	0.67±0.04	0.07	0.29	0.52
脾臓	0.72±0.02	0.69±0.07	0.64±0.05	0.71±0.05	0.60	0.63	0.35
肝臓	4.67±0.09	4.37±0.11	4.72±0.17	4.55±0.10	0.34	0.08	0.60
心臓	0.56±0.02	0.55±0.01	0.50±0.02	0.52±0.02	<0.01	0.91	0.29
肺	0.88±0.03	1.00±0.06	0.83±0.03	1.18±0.03	0.47	0.02	0.20
腎臓+副腎	1.76±0.05	1.64±0.05	1.62±0.05	1.69±0.05	0.46	0.67	0.15
8 週齢時							
胸腺	0.17±0.02	0.29±0.01	0.17±0.01	0.30±0.02	0.54	<0.01	0.87
脾臓	0.25±0.01	0.35±0.01	0.28±0.01	0.35±0.01	0.16	<0.01	0.20
肝臓	5.27±0.12	5.13±0.13	5.35±0.13	5.37±0.12	0.22	0.63	0.55
心臓	0.52±0.03	0.50±0.04	0.48±0.02	0.47±0.06	0.40	0.74	0.84
肺	0.58±0.03	0.70±0.05	0.54±0.05	0.59±0.04	0.09	0.04	0.43
腎臓+副腎	1.97±0.04	1.57±0.09	2.15±0.10	1.69±0.09	0.09	<0.01	0.73

表 4. 離乳時 (3 週齢) および 8 週齢時の産子の腹腔内 LPS 投与後の血中 TNF- $\alpha$  濃度 (pg/ml) への哺乳量増加の影響 (平均 $\pm$ 標準誤差)

項目	処理区				<i>P</i> 値		
	対照区		哺乳量増加区				
	雄( <i>n</i> =4)	雌( <i>n</i> =4)	雄( <i>n</i> =4)	雌 ( <i>n</i> =4)	処理	性別	交互作用
離乳時	256 $\pm$ 62	264 $\pm$ 57	441 $\pm$ 51	429 $\pm$ 160	0.09	0.98	0.92
8 週齢	138 $\pm$ 104	368 $\pm$ 136	209 $\pm$ 86	272 $\pm$ 13	0.90	0.15	0.40

表 5. 離乳時 (3 週齢) および 8 週齢時の産子の血中 IgG, IgA, IgM 濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ ) および糞中 IgA 含量 ( $\mu\text{g/g}$  新鮮糞) への哺乳量増加の影響 (平均 $\pm$ 標準誤差)

項目	処理区				処理	性別	P 値	交互作用
	対照区		哺乳量増加区					
	雄 (n=4)	雌 (n=4)	雄 (n=4)	雌 (n=4)				
離乳時								
IgG	136 $\pm$ 13	149 $\pm$ 16	88 $\pm$ 15	100 $\pm$ 21	0.01	0.47	0.97	
IgA	2.9 $\pm$ 1.0	3.2 $\pm$ 0.1	4.3 $\pm$ 1.4	3.0 $\pm$ 0.5	0.50	0.59	0.36	
IgM	56 $\pm$ 9	59 $\pm$ 8	68 $\pm$ 10	54 $\pm$ 4	0.70	0.54	0.29	
糞中 IgA	5.0 $\pm$ 3.4	4.8 $\pm$ 1.0	4.9 $\pm$ 1.2	2.6 $\pm$ 0.8	0.56	0.53	0.59	
8 週齢								
IgG	195 $\pm$ 36	255 $\pm$ 29	204 $\pm$ 62	281 $\pm$ 38	0.69	0.14	0.85	
IgA	225 $\pm$ 10	160 $\pm$ 15	198 $\pm$ 18	208 $\pm$ 43	0.68	0.29	0.16	
IgM	114 $\pm$ 5	150 $\pm$ 27	119 $\pm$ 17	165 $\pm$ 24	0.63	0.07	0.79	
糞中 IgA	199 $\pm$ 30	501 $\pm$ 141	148 $\pm$ 26	303 $\pm$ 95	0.18	0.02	0.42	

表 6. 離乳時 (3 週齢) および 8 週齢時産子の胸腺のサイトカイン mRNA レベルへの哺乳量増加の影響 (平均±標準誤差)

項目	処理区				処理	P 値	
	対照区		哺乳量増加区			性別	交互作用
	雄 (n=4)	雌 (n=4)	雄 (n=4)	雌 (n=4)			
離乳時							
TNF- $\alpha$	0.99±0.23	0.94±0.27	1.20±0.10	1.22±0.34	0.35	0.94	0.88
IL-6	0.84±0.29	1.19±0.81	0.89±0.32	1.31±0.51	0.87	0.48	0.95
IFN- $\gamma$	0.51±0.12	0.41±0.03	0.91±0.33	1.16±0.48	0.08	0.80	0.57
IL-10	0.83±0.14	0.93±0.34	0.94±0.15	1.14±0.24	0.51	0.53	0.84
8 週齢							
TNF- $\alpha$	0.56±0.21	1.16±0.30	1.45±0.23	1.49±0.44	0.07	0.32	0.38
IL-6	0.65±0.50	1.09±0.31	13.3±9.7	1.68±0.48	0.20	0.28	0.24
IFN- $\gamma$	0.59±0.20	0.60±0.09	6.27±4.16	3.13±2.42	0.11	0.53	0.53
IL-10	0.53±0.11	1.09±0.12	2.66±0.88	1.34±0.38	0.03	0.45	0.08

各遺伝子の mRNA 発現量は GAPDH の発現量で補正した数値で示した。

## 考察

マウスが性成熟に達する週齢は系統によって異なるものの一般的には7週齢程度とされている（Duttaら 2016）ことから、本研究で飼養試験の終了時とした8週齢時において性成熟期に達していたものと考えられる。本研究では、哺乳期の増体は哺乳量増加区が対照区よりも大きく、離乳後の飼養試験における増体速度は両試験区とも同様であったため、離乳時点での体重差がそのまま持続されて、8週齢時の体重も哺乳量増加区が重かった。ICRマウスの標準的な体重は3週齢では雄12.7g、雌12.4g、8週齢では雄37.2g、雌28.9gと報告されており（Kimuraら 1986）、本研究の対照区の体重はこれらとほぼ同等の体重であったことから、対照区は標準的な発育を示したものと考えられる。これに対して、哺乳量増加区の体重は、3週齢時および8週齢時のいずれにおいても対照区より有意に増加していた。すなわち、哺乳期の哺乳量増加による発育促進は、性成熟期におけるICRマウスの標準的な体重を超えて、持続されることが判明した。乳用子牛の研究においても、哺乳期の母乳摂取量を増加させると離乳時の体重が増加し、その体重差が離乳後も持続することが報告されている（Rosenbergerら 2017）。また、ホルスタイン種牛の研究では、ボディサイズが大きい個体より小さい個体で

飼料効率が向上することが報告されており (Yerex ら 1988), マウスを用いた本研究において体重の大きい哺乳量増加区でみられた飼料効率の低下と同様な関係が, 離乳後の栄養整理機構の異なる反芻動物においても認められている。

人工哺育めん羊への代用乳増量給与による増体促進が, 体重に対する心臓の相対重量の低下と胸腺および腎臓の相対重量の増加を引き起こす (Greenwood ら 2004) ことや, 哺乳期子牛への高タンパク質高脂肪代用乳の増量給与が胸腺の重量増加につながる事 (Geiger ら 2016) が報告されており, 本研究で観察された哺乳期の哺乳量増加による離乳時の心臓重量の低下と胸腺の増大傾向, 8 週齢時の腎臓と副腎の増大傾向と一致していた。本研究では哺乳量の増加によって 8 週齢時の肺重量の低下傾向がみられた。哺乳期の栄養過剰による肥満が 150 日齢時のマウスの肺の炎症応答を高め, 肺の機能を損なうことが報告されており (Ye ら 2012), 本研究の哺乳量増加区における 8 週齢時の肺の重量低下が肺の機能低下につながる可能性が危惧される結果であった。

マウスの臓器重量の性差は, 8 週齢時頃には脾臓が雌で雄より大きくなり, 肝臓と腎臓は雄で雌より大きくなる (茨木 ら 1969) とされており, さらに加齢が進んで 18 週齢時においては脾臓だけでなく肺も雌で雄より大きく, 腎臓は雄で雌

より重いことが報告されており (Iwata ら 1993), 本研究においても 3 週齢時に肝臓が雄で雌より大きい傾向が, 8 週齢時には胸腺, 脾臓および肺が雌で雄より大きく, 腎臓は雄で雌よりも大きく, 既存の研究と同様の性差が観察された。

本研究では, 哺乳期の哺乳量増加により離乳時の血中 IgG 濃度が低下した。マウスでは胎子期に胎盤経由で獲得した IgG (Kim ら 2009) に加えて, 出生後数週間も母乳由来の IgG 摂取により IgG の母子移行を継続して (Ghetie ら 1996 ; Pentsuk ら 2009) 受動免疫を獲得する。産子は 3-4 週齢から自身の IgG 産生を開始する (Stecher と Thorbecke 1967)。以上から, 哺乳量増加では母乳由来 IgG の吸収量の低下や, 血中半減期の短縮, 産子自身の IgG 産生開始時期の遅延または産生量の一時的な低下を引き起こす可能性が考えられた。哺乳量増加区における離乳時の血中 IgG 濃度の低下は, 8 週齢時には回復していたことから, 3 週齢時の産子の免疫グロブリン産生量の低下は哺乳量増加による不可逆的な反応ではなく, 一時的な変化であると考えられた。

本研究では, 8 週齢時の糞便中 IgA 含量と血清中 IgM 濃度に性差が認められ, 雌で雄よりも高かった。マウス脾細胞と 17 $\beta$ -エストラジオールを共培養した場合, 培養液中の IgM および IgE 濃度が増加し, 免疫グロブリン産生がエストロジェ

ンにより促進されることが示されており (Hanら 2002), 本研究の 8 週齢時における雌マウスの高い血中 IgM と糞中 IgA 濃度は性成熟にともなって上昇したエストロジェンの作用によるものと考えられた。

ヒトおよびマウスでは, 胸腺は T 細胞の成熟が進行する主要なリンパ組織である (Thapa と Farber 2019)。胸腺のサイズはヒトでは出生後増大し思春期に最大に達した後, 加齢に伴って退縮していく (Shichkinら 2020)。また, マウスでも胸腺は出生後増大し 4-6 週齢時に最大となり, その後は加齢とともに徐々に退縮していく (Grayら 2006)。初期成長期における胸腺の発達不全は, 末梢 T 細胞数の減少および機能障害を引き起こす (Thapa と Farber 2019)。本研究で観察された哺乳期の哺乳量増加による 3 週齢時における胸腺重量の増加傾向は, T 細胞産生やその機能状態に影響していた可能性が考えられる。

本研究では, 哺乳量増加区で離乳時の LPS 投与後の血清中 TNF- $\alpha$  濃度および胸腺の IFN- $\gamma$  mRNA 発現量の増加傾向がみられた。Ballouら (2015) の研究では, ジャージー種子牛に高タンパク質低脂肪の代用乳を 6 週齢の離乳時まで多給すると, 11 週齢時において試験牛から採取した血液を大腸菌由来 LPS と共培養した際の TNF- $\alpha$  産性能の増大や大腸菌に対

する好中球の酸化バースト量の増大がみられ、高タンパク質低脂肪代用乳の多給は細胞性免疫の応答性を増強しうると推察している。炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  は主にマクロファージから産生され、好中球やマクロファージなどの食作用の活性化や炎症応答を仲介し (Turner ら 2014)、IFN- $\gamma$  は T 細胞およびナチュラルキラー細胞により主に産生され、マクロファージの活性化や白血球の遊走を促進する (Schroder ら 2003) ことから、哺乳量増加区で観察された離乳時の血清中 TNF- $\alpha$  濃度や胸腺の IFN- $\gamma$  mRNA 発現量の上昇傾向は、哺乳期の哺乳量増加により細胞性免疫の応答性が増強された可能性を示しているものと考えられる。Ballou ら (2015) も、ジャージー種子牛への高タンパク質低脂肪代用乳の多給が細胞性免疫の応答性増強の可能性を示唆している。

本研究では、哺乳量増加により性成熟に達した 8 週齢時の胸腺において TNF- $\alpha$  の mRNA 発現量の増加傾向と IL-10 mRNA 発現量の増加がみられた。Ye ら (2012) は、ICR マウスを用いて出생日に一腹産子数を 3 匹に調整して 3 週齢まで哺乳した栄養過剰区と一腹産子数 10 匹とした対照区を比較検討した結果、150 日齢時における気管支肺胞洗浄液中と血清中の TNF- $\alpha$  濃度ならびに肺の TNF- $\alpha$  mRNA 発現量が対照区より栄養過剰区で上昇することを報告しており (Ye ら

2012), 哺乳期の栄養摂取量の増加が成熟期以降の TNF- $\alpha$  産生能増大にまで関与することを示している。IL-10 は骨髄組織, リンパ系組織,  $\gamma\delta$ T 細胞, ナチュラルキラー細胞, マスト細胞, 顆粒球などの様々な細胞から産生され, 炎症性サイトカインの TNF- $\alpha$  とは逆に炎症を抑制する作用を有している (Couper ら 2008)。すなわち, 本研究の哺乳期の哺乳量増加は性成熟期において LPS 抗原感作後の炎症性ならびに抗炎症性双方のサイトカインの産生量を高める可能性が示唆された。

以上より, マウスの哺乳期の哺乳量増加は血中 IgG 濃度の一時的な低下を引き起こすものの, 離乳時の胸腺サイズの増大, 抗原感作時の自然免疫の応答性増大を引き起こすことが示唆された。さらに, 成熟期においても哺乳期の増体促進が持続され, 抗原感作時の IL-10 および TNF- $\alpha$  の産生を増大させる可能性が示された。近年, 哺乳期子牛の発育促進と事故率低下を意図して成分組成を調整した代用乳の増量給与が普及しつつあるが, 本研究で観察された哺乳量増加による免疫機能への持続的な影響が哺乳機に栄養強化した子牛においても認められるのか検証が必要である。

## 小括

第 4 章では，マウスにおいて，哺乳期の哺乳量増加による成長促進は離乳後の飼料摂取量の増加と飼料効率の低下を招き，成熟時のサイトカイン産生能を増強する可能性が明らかになった。

## 第 5 章 総合考察

疫学研究分野において、胎子期に母体の栄養条件が悪く、低出生体重で生まれた子では、成熟期以降の肥満、心臓疾患、糖尿病や高血圧の発症リスクが高まること(Barkerら 2002; Gluckmanら 2007)が報告されて以来、胎子期などの初期成長期の栄養水準などの環境要因と以降の発育段階における生理機能に影響するとされる代謝プログラミング現象についてマウス、ラット、めん羊、ウシ、ブタなどの様々な動物モデルを用いて研究が行われてきた。また、最近では家畜生産分野においても、初期成長期の栄養水準などの環境要因が家畜の代謝機能、内分泌機能、繁殖機能、骨格筋の成長、枝肉成績や肉質などの家畜の生産性に関連深い形質に不可逆的な影響を及ぼす可能性があることから、代謝プログラミングに焦点を当てはじめている(Danielら 2007; Fordら 2007; Greenwoodら 2009; Jaquieryら 2012; Duら 2015; Sinclairら 2016)。そこで、本研究では家畜生産における代謝プログラミングの有用性を検討するために種々の検討を行った。

疫学研究により胎子期の栄養制限により成熟期の肥満症発症リスクが向上する(GluckmanとHanson 2004)ことや、マウスおよびラットのモデル実験により胎子期のタンパク質

制限により出生後の増体や内臓脂肪の蓄積量の増加が報告されていることから (Guanら 2005; Chenら 2009), 家畜の胎子期のタンパク質制限により出生後の子畜の増体の促進が期待されるが, ウシやめん羊などでは胎子期のタンパク質制限のみの実験処理を用いた研究例は殆どなく, また, 子畜の成長について詳細に検討した研究例は少ない。そこで, 第2章では, タンパク質制限飼料を妊娠後期めん羊に給与して, 胎児期にタンパク質制限環境に暴露された産子の出生後の成長および脂肪蓄積を検討し, 成長や脂肪蓄積に関連する遺伝子群の発現量ならびにグルコース-インスリン恒常性の変化を伴わずに, 離乳後の増体, 内臓脂肪組織の蓄積を亢進することを明らかにした。げっ歯類を用いた先行研究と同様に, めん羊においても同様に出生後の増体と脂肪蓄積亢進がなされることを本研究で明らかにした。

ウシの初乳はタンパク質, 脂質, ミネラル, ビタミンを常乳より高濃度に含み, 免疫グロブリンならびに成長ホルモン, IGF-1などの成長因子や酵素, 白血球などの免疫関連物質なども含む (Abd El-Fattahら 2012; Blumと Hammon 2000; Ontsoukaら 2003; Stelwagenら 2009)。また, ウシ, めん羊などの家畜は, 胎子期に胎盤を介して抗体移行が起きず, 出生後初乳の摂取を介して IgGを獲得し受動免疫移行がなさ

れ (Weaver ら 2000; Quigley と Drewry 1998), 出生後の適正な初乳摂取は, 産子の生存や健康に重要である。前述のとおり, 現在では, 初乳中の種々の生理活性物質の伝搬が子畜の生理機能や臓器・組織の発達に寄与するとされるラクトクライン仮説が提唱され (Begnell ら 2009; Bagnell ら 2017; Bagnell ら 2019; Bagnell と Bartol 2019; Spencer ら 2019), 初乳, 母乳中の成分が子の気性, 繁殖機能, 内分泌機能等に影響することが明らかにされつつある。また, 初乳の増量給与研究が複数報告されている (Hammon と Blum 1997; Blättler ら 2001; Hammon と Blum 2002; Faber ら 2005; Berge ら 2009)。しかしながら, いずれの研究も増量給与後 7 日齢などの短期的な影響の検討にとどまり, 長期的に初乳増量給与の影響を調べた研究は少ない。第 3 章では, 子めん羊を用いて出生後 7 日間の初乳製剤の追加給与が 9 週齢時の成長や免疫機能に及ぼす影響を調査した。その結果, 出生後 7 日間の初乳追加給与は, 追加給与時の人為的な哺乳作業が, 増体の抑制および脾臓サイズの低下, 抗原感作時の発熱応答を低下させ 9 週齢時の免疫機能を抑制する可能性があるが, 子めん羊の出生後の小腸における脂質の吸収を促進し 9 週齢時の内臓脂肪蓄積量を増加させることが示され, 初乳の追加給与が小腸の脂質吸収促進を介して, 離乳時程度の内臓脂肪

蓄積量を増加させることが明らかにされた。以上のように、本研究では、新生子期における初乳の増量給与により、離乳時点での小腸吸収や内蔵脂肪の蓄積を制御し、初乳の給与量により、離乳時点の生理機能を制御できる可能性が示唆された。

げっ歯類を用いた代謝プログラミング研究では、一腹産子数を調整することで出生後の哺乳期の栄養水準を操作する手法により成熟期以降の代謝機能、内分泌機能および炭水化物代謝の酵素活性に対する永続的な影響 (Aubertら 1980; Duffと Snell 1982) や、成熟期のインスリン抵抗性発症との関連 (Beiら 2015) が示されており、胎子期のみならず、哺乳期の栄養水準も成熟期の産子の内分泌機能を左右することが明らかにされている。また、家畜生産の現場において、現在、子牛の発育促進や慣行的な早期離乳方式における疾病や斃死などの損耗発生率低下を意図して高タンパク質低脂肪の代用乳の増量給与が普及しつつあり、哺乳期の代用乳の増量給与による乳用子牛の成長促進が初産時の乳量増加につながること (Soberonら 2012; Soberonと Van Amburgh 2013) や高タンパク質低脂肪の代用乳の増量給与が発育向上に加えて病原体に対する抵抗性など免疫能の向上を示唆する結果が得られている (Nonneckeら 2003; Hengstら 2012; Obeidatら

2013; Ollivettら 2012; Ballouら 2012)。しかし，成熟後の免疫機能への影響は明らかになっていない。そこで，第4章では，マウスの哺乳匹数調整による哺乳量増加が離乳時と性成熟程度の免疫機能への影響を検討した。免疫機能の評価にあたっては，LPS腹腔内投与試験を実施し，TNF- $\alpha$ 酸性および胸腺組織におけるサイトカインの mRNA 発現を調査した。その結果，マウスの哺乳期の哺乳量増加は血中 IgG 濃度の一時的な低下を引き起こすものの，離乳時の胸腺サイズの増大，抗原感作時の自然免疫の応答性増大を引き起こすことが示唆された。さらに，成熟期においても哺乳期の増体促進が持続され，抗原感作時の IL-10 および TNF- $\alpha$  の産生を増大させる可能性が示された。

以上の結果から，胎子期の栄養制限，初乳の追加給与，哺乳期の哺乳量の増加などの初期成長期における栄養水準や初乳の摂取量により，産子の出生後の成長や脂肪蓄積，免疫機能を向上させることを実証した。

## 謝 辞

本研究および本論文をまとめるにあたり、終始懇切なるご指導とご協力を賜りました弘前大学農学生命科学部畜産学教室 松崎正敏教授に深く感謝致します。また、本論文をまとめるにあたり、終始懇切なるご指導を賜りました岩手大学動物科学科食肉科学研究室 村元隆行准教授および弘前大学農学生命科学部生物共生教育研究センター 房家琛助教に深謝致します。さらに、本研究の遂行にあたり、弘前大学農学生命科学部附属生物共生教育研究センター金木農場職員の皆様、畜産学教室の学生諸氏に深謝致します。

## 引用文献

Abd El-Fattah AM, Abd Rabo FH, El-Dieb SM, El-Kashef HA. 2012. Changes in composition of colostrum of Egyptian buffaloes and Holstein cows. BMC Veterinary Research 8:19.

安部良. 2008. 粘膜免疫－腸管免疫に焦点を当てて－. 日本家畜臨床感染症学会誌 3 巻, 61-65.

Adair LS. 2014. Long-term consequences of nutrition and growth in early childhood and possible preventive interventions. Nestle Nutritional Institute Workshop 78: 111-120.

Alharthi AS, Batistel F, Abdelmegeid MK, Lascano G, Parys C, Helmbrecht A, Trevisi E, Loor JJ. 2018. Maternal supply of methionine during late-pregnancy enhances rate of Holstein calf development in utero and postnatal growth to a greater extent than colostrum source. Journal of Animal Science and Biotechnology 9: 83.

Alvarenga TIRC, Copping KJ, Han X, Clayton EH, Meyer RJ, Rodgers RJ, McMillen IC, Perry VEA, Geesink

G. 2016. The influence of peri-conception and first trimester dietary restriction of protein in cattle on meat quality traits of entire male progeny. *Meat Science* 121: 141-147.

Bagnell CA, Steinetz BG, Bartol FF. 2009. Milk-borne relaxin and the lactocrine hypothesis for maternal programming of neonatal tissues. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1160: 152-157.

Bagnell CA, Ho TY, George AF, Wiley AA, Miller DJ, Bartol FF. 2017. Maternal lactocrine programming of porcine reproductive tract development. *Molecular Reproduction and Development* 84: 957-968.

Bagnell CA, Bartol FF. 2019. Review: Maternal Programming of Development in the Pig and the Lactocrine Hypothesis. *Animal* 13: 2978-2985.

Bagnell CA, Ho TY, George AF, Wiley AA, Miller DJ, Bartol FF. 2017. Maternal lactocrine programming of porcine reproductive tract

development. *Molecular Reproduction and Development* 84: 957-968.

Bagnell CA, Bartol FF. 2019. Relaxin and the 'Milky Way': The lactocrine hypothesis and maternal programming of development. *Journal of Molecular Endocrinology* 487: 18-23.

Bartol FF, Wiley AA, Miller DJ, Silva AJ, Roberts KE, Davolt ML, Chen JC, Frankshun AL, Camp ME, Rahman KM, Vallet JL, Bagnell CA. 2013. Lactation Biology Symposium: lactocrine signaling and development. *Journal of Animal Science* 91: 696-705.

Ballou M. 2012. Immune responses of Holstein and Jersey calves during the preweaning and immediate postweaned periods when fed varying planes of milk replacer. *Journal of Dairy Science* 95: 7319-7330.

Ballou MA, Hanson DL, Cobb CJ, Obeidat BS, Sellers MD, Pepper-Yowell AR, Carroll JA, Earleywine TJ, Lawhon SD. 2015. Plane of nutrition influences the performance, innate leukocyte

responses, and resistance to an oral *Salmonella* enterica serotype Typhimurium challenge in Jersey calves. *Journal of Dairy Science* 98: 1972-1982.

Barker DJ, Osmond C. 1986. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet* 1: 1077-1081.

Barker DJ. 1998. Mothers, babies and health in later life.

Barker DJ, Eriksson JG, Forsén T, Osmond C. 2002. Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. *International Journal of Epidemiology* 31: 1235-1235.

Barker DJ. 2007. The origins of the developmental origins theory. *Journal of Internal Medicine* 261: 412-417.

Barua S, Junaid MA. 2015. Lifestyle, pregnancy and epigenetic effects. *Epigenomics* 7: 85-102.

Berge AC, Besser TE, Moore DA, Sisco WM. 2009. Evaluation of the effects of oral colostrum supplementation during the first fourteen days on

the health and performance of preweaned calves.

Journal of Dairy Science 92: 286-295.

Bennett GL, Kirton AH, Johnson DL, Carter AH. 1991.

Genetic and environmental effects on carcass characteristics of Southdown x Romney lambs: I. Growth rate, sex, and rearing effects. Journal of Animal Science 69: 1856-1863.

Blum JW, Hammon H. 2000. Colostrum effects on the gastrointestinal tract, and on nutritional, endocrine and metabolic parameters in neonatal calves. Livestock Production Science 66: 151-159.

Blättler U, Hammon HM, Morel C, Philipona C, Rauprich A, Romé V, Le Huërou-Luron I, Guilloteau P,

Blum JW. 2001. Feeding colostrum, its composition and feeding duration variably modify proliferation and morphology of the intestine and digestive enzyme activities of neonatal calves.

Journal of Nutrition 131: 1256-1263.

Broadhead D, Mulliniks JT, Funston RN. 2019.

Developmental Programming in a Beef Production System. Veterinary Clinics of North America: Food

Animal Practice 35: 379-390.

Burrin DG, Davis TA, Ebner S, Schoknect PA, Fiorotto

ML, PJ Reeds, SMcAvoy. 1995. Nutrient-

independent and nutrient-dependent factors

stimulate protein synthesis in colostrum-fed

newborn pigs. Pediatric Research 37: 593-599.

Carstens GE, Johnson DE, Holland MD, Odde KG. 1987.

Effects of prepartum protein nutrition and birth

weight on basal metabolism in bovine neonates.

Journal of Animal Science 65: 745-751.

Cartiff SE, Fellner V, Eisemann JH. 2013.

Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids

increase insulin sensitivity in growing steers.

Journal of Animal Science 91: 2332-2342.

Chavatte-Palmer P, Velazquez MA, Jammes H, Duranthon

V. 2018. Review: Epigenetics, developmental

programming and nutrition in herbivores. Animal

12: 363-371.

Chen JC, Frankshun AL, Wiley AA, Miller DJ, Welch KA,

Ho TY, Bartol FF, Bagnell CA. 2011. Milk-borne

lactocrine-acting factors affect gene expression

patterns in the developing neonatal porcine uterus.  
Reproduction. 141:675-83.

Chen JH, Martin-Gronert MS, Tarry-Adkins J, Ozanne  
SE. 2009. Maternal protein restriction affects  
postnatal growth and the expression of key  
proteins involved in lifespan regulation in mice.  
PLoS One 4: e4950.

Costa TC, Moura FH, Souza RO, Lopes MM, Fontes MMS,  
Serão NVL, Sanglard LP, Du M, Gionbelli MP,  
Duarte MS. 2019. Effect of maternal feed  
restriction in dairy goats at different stages of  
gestation on skeletal muscle development and  
energy metabolism of kids at the time of births.  
Animal Reproduction Science 206: 46-59.

Couper KN, Blount DG, Riley EM. 2008. IL-10: the master  
regulator of immunity to infection. Journal of  
Immunology 180: 5771-5777.

Coverdale JA, Hammer CJ, Walter KW. 2015. HORSE  
SPECIES SYMPOSIUM: Nutritional programming  
and the impact on mare and foal performance.  
Journal of Animal Science 93: 3261-3267.

- Cushman RA, Perry GA. 2019. Developmental Programming of Fertility in Livestock. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 35: 321-330.
- Daniel ZC, Brameld JM, Craigon J, Scollan ND, Buttery PJ. 2007. Effect of maternal dietary restriction during pregnancy on lamb carcass characteristics and muscle fiber composition. *Journal of Animal Science* 85: 1565-1576.
- Dianzani F, Baron S. 1996. Nonspecific Defenses. In: *Medical Microbiology*. 4th ed. Chapter 49. Univ. of Texas Medical Branch Press. Galveston.
- Du M, Huang Y, Das AK, Yang Q, Duarte MS, Dodson MV, Zhu MJ. 2013. Meat Science and Muscle Biology Symposium: manipulating mesenchymal progenitor cell differentiation to optimize performance and carcass value of beef cattle. *Journal of Animal Science* 91: 1419-1427.
- Du M, Wang B, Fu X, Yang Q, Zhu MJ. Fetal programming in meat production. 2015. *Meat Science* 109: 40-47.

- Duan X, Gao S, Li J, Wu L, Zhang Y, Li W, Zhao L, Chen J, Yang S, Sun G, Li B. 2017. Acute arsenic exposure induces inflammatory responses and CD4+ T cell subpopulations differentiation in spleen and thymus with the involvement of MAPK, NF- $\kappa$ B, and Nrf2. *Molecular Immunology* 81: 160-172.
- Dutta S, Sengupta P. 2016. Men and mice: Relating their ages. *Life Science* 152: 244-248.
- Fannin RD, Auman JT, Bruno ME, Sieber SO, Ward SM, Tucker CJ, Merrick BA, Paules RS. 2005. Differential gene expression profiling in whole blood during acute systemic inflammation in lipopolysaccharide-treated rats. *Physiological Genomics* 21: 92-104.
- Faber SN, Faber NE, Mccauley TC, Ax RL. 2005. Case Study: Effects of Colostrum Ingestion on Lactational Performance. *The Professional Animal Scientist* 21: 420-425.
- Fall CHD, Kumaran K. 2019. Metabolic programming in early life in humans. *Philosophical Transactions*

of the Royal Society B ; Biological Sciences 374:  
20180123.

Fiorotto ML, Burrin DG, Perez M, Reeds PJ. 1991. Intake and use of milk nutrients by rat pups suckled in small, medium, or large litters. American Journal of Physiology 260: 1104-1113.

Ford SP, Hess BW, Schwope MM, Nijland MJ, Gilbert JS, Vonnahme KA, Means WJ, Han H, Nathanielsz PW. 2007. Maternal undernutrition during early to mid-gestation in the ewe results in altered growth, adiposity, and glucose tolerance in male offspring. Journal of Animal Science 5: 1285-1294.

福島護之，大坂郁夫，木村信熙．2009．“子牛の科学 胎子期から出生，育成期まで”115-124．監修；小形芳美，岡本全弘，木村信熙，小岩政照，津曲茂久，日本家畜臨床感染症研究会編，チクサン出版社．東京．

Frutos J, Andrés S, Trevisi E, Yáñez-Ruiz DR, López S, Santos A, Giráldez FJ. 2018. Early Feed

Restriction Programs Metabolic Disorders in  
Fattening Merino Lambs. *Animals* 8:83.

Gardner DS, Tingey K, van Bon BWM, Ozanne SE, Wilson  
V, Dandrea J Keisler DH, Stephenson T, Symonds  
ME, 2005. Programming of glucose-insulin  
metabolism in adult sheep aftermaternal  
undernutrition. *American Journal of Physiology-  
Regulatory, Integrative and Comparative  
Physiology* 289: 947-954.

Gauvin MC, Pillai SM, Reed SA, Stevens JR, Hoffman ML,  
Jones AK, Zinn SA, Govoni KE. 2020. Poor maternal  
nutrition during gestation in sheep alters prenatal  
muscle growth and development in offspring.  
*Journal of Animal Science* 98: skz388.

Geiger AJ, Parsons CLM, Akers RM. 2016. Feeding a  
higher plane of nutrition and providing exogenous  
estrogen increases mammary gland development in  
Holstein heifer calves. *Journal of Dairy Science* 99:  
7642-7653.

Gentili S, Morrison JL, McMillen IC. 2009. Intrauterine  
growth restriction and differential patterns of

- hepatic growth and expression of IGF1, PCK2, and HSDL1 mRNA in the sheep fetus in late gestation. *Biology of Reproduction* 80: 1121-1127.
- Ghetie V, Hubbard JG, Kim JK, Tsen MF, Lee Y, Ward ES. 1996. Abnormally short serum half-lives of IgG in beta 2-microglobulin-deficient mice. *European Journal of Immunology* 26: 690-696.
- Gluckman PD, Hanson MA. 2004. Living with the past : evolution, development, and patterns of disease. *Science* 305 : 1733-1736.
- Gluckman PD, Hanson MA. 2004. Developmental origins of disease paradigm : a mechanistic and evolutionary perspective. *Pediatric Research* 56 : 311-317.
- Gluckman PD, Hanson MA. 2004. The developmental origins of the metabolic syndrome. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 15: 183-187.
- Gluckman PD, Hanson MA. 2005. The fetal matrix: Evolution, development and disease. *Journal of the Royal Society of Medicine* 98: 130-131.
- Gluckman PD, Hanson MA, Beedle AS. 2007. Early life events and their consequences for later disease: a

life history and evolutionary perspective. *American Journal of Human Biology* 19: 1-19.

Gomes RM, Bueno FG, Schamber CR, de Mello JCP, de Oliveira JC, Francisco FA, Moreira VM, Junior MDF, Pedrino GR, de Freitas Mathias PC, Miranda RA, de Moraes SMF, Natali MRM. 2018. Maternal diet-induced obesity during suckling period programs offspring obese phenotype and hypothalamic leptin/insulin resistance. *Journal of Nutritional Biochemistry* 61: 24-32.

Gray DH, Seach N, Ueno T, Milton MK, Liston A, Lew AM, Goodnow CC, Boyd RL. 2006. Developmental kinetics, turnover, and stimulatory capacity of thymic epithelial cells. *Blood* 108: 3777-3785.

Greenwood PL, Bell AW. 2003. Consequences of intra-uterine growth retardation for postnatal growth, metabolism and pathophysiology. *Reproduction Supplement* 61: 195-206.

Greenwood PL, Hunt AS, Bell AW. 2004. Effects of birth weight and postnatal nutrition on neonatal sheep: IV. Organ growth. *Journal of Animal Science* 82:

422-428.

Greenwood PL, Bell AW, Vercoe PE, Viljoen GJ. 2009. Managing the Prenatal Environment to Enhance Livestock Productivity. Springer Netherlands Press. Amsterdam.

Greenwood PL, Clayton E, Bell A. 2017. Developmental programming and beef production. *Animal Frontiers* 7: 38-47

Guan H, Arany E, van Beek JP, Chamson-Reig A, Thyssen S, Hill DJ, Yang K. 2005. Adipose tissue gene expression profiling reveals distinct molecular pathways that define visceral adiposity in offspring of maternal protein-restricted rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 288: 663-673.

Guzmán C, Cabrera R, Cárdenas M, Larrea F, Nathanielsz PW, Zambrano E. 2006. Protein restriction during fetal and neonatal development in the rat alters reproductive function and accelerates reproductive ageing in female progeny. *Journal of Physiology* 572: 97-108.

Hammon H, Blum JW. 1997. Prolonged colostrum feeding enhances xylose absorption in neonatal calves.

Journal of Animal Science 75: 2915-2919.

Hammon H, Blum JW. 1998. Metabolic and Endocrine Traits of Neonatal Calves Are Influenced by

Feeding Colostrum for Different Durations or

Only Milk Replacer. Journal of Nutrition 128:

624-632.

Hammon HM, Blum JW. 2002. Feeding different amounts of colostrum or only milk replacer modify

receptors of intestinal insulin-like growth factors

and insulin in neonatal calves. Domestic Animal

Endocrinology 22: 155-168.

Hammon HM, Steinhoff-Wagner J, Flor J. 2013. Lactation Biology Symposium: Role of colostrum and

colostrum components on glucose metabolism in

neonatal calves. Journal of Animal Science 91:

685-695.

Hammon HM, Liermann W, Frieten D, Koch C. 2020 Review: Importance of colostrum supply and milk

feeding intensity on gastrointestinal and systemic

development in calves. *Animal* 14: 133-143.

Han D, Denison MS, Tachibana H, Yamada K. 2002. Effects of estrogenic compounds on immunoglobulin production by mouse splenocytes. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 25: 1263-1267.

Hanley B, Dijane J, Fewtrell M, Grynberg A, Hummel S, Junien C, Koletzko B, Lewis S, Renz H, Symonds M, Gros M, Harthoorn L, Mace K, Samuels F, van Der Beek EM. 2010. Metabolic imprinting, programming and epigenetics - a review of present priorities and future opportunities. *British Journal of Nutrition* 104: 1-25.

林智人. 2008. 粘膜免疫の基礎—全身性免疫と粘膜性免疫—.  
—. 日本家畜臨床感染症研究会誌 3 卷 105-109.

He ZX, Wu DQ, Sun ZH, Tan ZL, Qiao JY, Ran T, Tang SX, Zhou CS, Han XF, Wang M, Kang JH, Beauchemin KA. 2013. Protein or energy restriction during late gestation alters fetal growth and visceral organ mass: an evidence of intrauterine programming in goats. *Animal Reproduction Science* 137: 177-182.

- He ZX, Wu DQ, Sun ZH, Tan ZL, Qiao JY, Ran T, Tang SX, Zhou CS, Han XF, Wang M, Kang JH, Beauchemin KA. 2013. Protein or energy restriction during late gestation alters fetal growth and visceral organ mass: an evidence of intrauterine programming in goats. *Animal Reproduction Science* 137: 177-182.
- Hengst BA, Nemeč LM, Rastani RR, Gressley TF. 2012. Effect of conventional and intensified milk replacer feeding programs on performance, vaccination response, and neutrophil mRNA levels of Holstein calves. *Journal of Dairy Science* 95: 5182-5193.
- Hernández-Castellano LE, Suárez-Trujillo A, Martell-Jaizme D, Cugno G, Argüello A, Castro N. 2015. The effect of colostrum period management on BW and immune system in lambs: from birth to weaning. *Animal* 9: 1672-1679.
- Hinde K, Skibił AL, Foster AB, Del Rosso L, Mendoza SP, Capitanió JP. 2015. Cortisol in mother's milk across lactation reflects maternal life history

and predicts infant temperament. *Behavioral Ecology* 26: 269-281.

Hocquettea JF, Ortigues-Marty I, Pethick D Herpin P  
Fernandez X. 1998. Nutritional and hormonal  
regulation of energy metabolism in skeletal  
muscles of meat-producing animals. *Livestock  
Production Science* 56: 115-143.

Hodgson JC. 2006. Endotoxin and mammalian host  
responses during experimental disease. *Journal  
of Comparative Pathology* 135: 157-175.

Husted SM, Nielsen MO, Tygesen MP, Kiani A, Blache D,  
Ingvarlsen KL. 2007. Programming of  
intermediate metabolism in young lambs affected  
by late gestational maternal undernourishment.  
*American Journal of Physiology-Endocrinology  
and Metabolism* 293: 548-557.

茨木弟介，野村晋一．1969．ICR-JCL系マウスの発育成長に  
関する研究 第2報 主要臓器の重量．*実験動物* 19,  
133-140．

Iwata H, Hagiwara T, Katoh M, Yamamoto S, Yamakawa S,  
Shiga A, Hirouchi Y, Kobayashi K, Inoue H, Enomoto

M. 1993. Historical control data of organ weight and gross findings in F344/DuCrj rats and B6C3F1 mice. *Jikken Dobutsu* 42: 383-396.

Jaquiery AL, Oliver MH, Honeyfield-Ross M, Harding JE, Bloomfield FH. 2012. Periconceptual under-nutrition in sheep affects adult phenotype only in males. *Journal of Nutrition and Metabolism* 123: 610.

Jaquiery AL, Park SS, Phua HH, Berry MJ, Meijler D, Harding JE, Oliver MH, Bloomfield FH. 2016. Brief neonatal nutritional supplementation has sex-specific effects on glucose tolerance and insulin regulating genes in juvenile lambs. *Pediatric Research* 80: 861-869.

Joshi S, Garole V, Daware M, Girigosavi S, Rao S. 2003. Maternal protein restriction before pregnancy affects vital organs of offspring in Wistar rats. *Metabolism* 52: 13-18.

Khanal P, Husted SV, Axel AM, Johnsen L, Pedersen KL, Mortensen MS, Kongsted AH, Nielsen MO. 2014. Late gestation over- and undernutrition

predispose for visceral adiposity in response to a post-natal obesogenic diet, but with differential impacts on glucose-insulin adaptations during fasting in lambs. *Acta Physiologica* 210: 110-126.

Khanal P, Axel AM, Kongsted AH, Husted SV, Johnsen L, Pandey D, Pedersen KL, Birtwistle M, Markussen B, Kadarmideen HN, Nielsen MO. 2015. Late gestation under- and overnutrition have differential impacts when combined with a post-natal obesogenic diet on glucose-lactate-insulin adaptations during metabolic challenges in adolescent sheep. *Acta Physiologica* 213: 519-536.

Kimura K, Takeuchi K, 1986. Growth of the Jcl: ICR mouse. *Okajimas Folia Anatomica Japonica* 63: 265-280.

Koch U, Radtke F. 2011. Mechanisms of T cell development and transformation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 27: 539-562.

Kucia M, Langhammer M, Görs S, Albrecht E, Hammon HM, Nürnberg G, Metges CC. 2011. High-protein diet during gestation and lactation affects mammary gland mRNA abundance, milk

composition and pre-weaning litter growth in mice. *Animal* 5: 268-277.

Kühne S, Hammon HM, Bruckmaier RM, Morel C, Zbinden Y, Blum JW. 2000. Growth performance, metabolic and endocrine traits, and absorptive capacity in neonatal calves fed either colostrum or milk replacer at two levels. *Journal of Animal Science* 78: 609-620.

Langley-Evans SC, McMullen S. 2010. Developmental origins of adult disease. *Medical Principles and Practice* 19: 87-98.

Le Dividich J, Esnault T, Lynch B, Hoo-Paris R, Castex C, Peiniau J. 1991. Effect of colostrum fat level on fat deposition and plasma metabolites in the newborn pig. *Journal of Animal Science* 69: 2480-2488.

Lin Y, Xu XY, Wu D, Lin H, Fang ZF, Feng B, Xu SY, Che LQ, Li J, Zhuo Y, Wu CM, Zhang JJ, Dong HJ. 2019. Maternal energy insufficiency affects testicular development of the offspring in a swine model. *Scientific Reports* 2019 9: 14533.

- Love AC, Lovern MB, DuRant SE. 2017. Captivity influences immune responses, stress endocrinology, and organ size in house sparrows (*Passer domesticus*). *General and Comparative Endocrinology* 252: 18-26.
- McGovern FM, Sweeney T, Ryan MT, Lott S, Campion FP, Boland TM. 2017. An investigation into the effects of maternal supplementation with excess iodine on the mechanisms and impacts of reduced IgG absorption in the lamb postpartum. *British Journal of Nutrition* 117: 951-963.
- Maresca S, Valiente SL, Rodriguez AM, Testa LM, Long NM, Quintans GI, Pavan E. 2019. The influence of protein restriction during mid- to late gestation on beef offspring growth, carcass characteristic and meat quality. *Meat Science* 153: 103-108.
- Martin GS, Carstens GE, Taylor TL, Sweatt CR, Eli AG, Lunt DK, Smith SB. 1997. Prepartum protein restriction does not alter norepinephrine-induced thermogenesis or brown adipose tissue function in

newborn calves. *Journal of Nutrition* 127: 1929-1937.

Meganck V, Hoflack G, Opsomer G. 2014. Advances in prevention and therapy of neonatal dairy calf diarrhea: a systematical review with emphasis on colostrum management and fluid therapy. *Acta Veterinaria Scandinavica* 56: 75.

Micke GC, Sullivan TM, Soares Magalhaes RJ, Rolls PJ, Norman ST, Perry VE. 2010. Heifer nutrition during early- and mid-pregnancy alters fetal growth trajectory and birth weight. *Animal Reproduction Science* 117: 1-10.

Moallem U, Werner D, Lehrer H, Kachut M, Livshitz L, Yakoby S, Shamay A. 2010. Long-term effects of feeding ad libitum whole milk prior to weaning and prepubertal protein supplementation on skeletal growth rate and first-lactation milk production. *Journal of Dairy Science* 93: 2639-2650.

Mohrhauser DA, Taylor AR, Underwood KR, Pritchard RH, Wertz-Lutz AE, Blair AD. 2015. The influence

of maternal energy status during midgestation on beef offspring carcass characteristics and meat quality. *Journal of Animal Science* 93: 786-793.

National Animal Health Monitoring System. Dairy 1996;

National dairy health evaluation project. Dairy heifer morbidity, mortality and health management focusing on pre-weaned heifers. Ft. Collins (CO); USDA-APHIS Veterinary Service.

Neville TL, Caton JS, Hammer CJ, Reed JJ, Luther JS,

Taylor JB, Redmer DA, Reynolds LP, Vonnahme

KA. 2010. Ovine offspring growth and diet

digestibility are influenced by maternal selenium supplementation and nutritional intake during pregnancy despite a common postnatal diet.

*Journal of Animal Science* 88: 3645-56.

Nickles KR, Hamer L, Coleman DN, Relling AE. 2019.

Supplementation with eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in late gestation in ewes changes adipose tissue gene expression in the ewe and growth and plasma concentration of ghrelin

in the offspring. *Journal of Animal Science* 97:  
2631-2643.

Nielsen MO, Kongsted AH, Thygesen MP, Strathe AB,  
Caddy S, Quistorff B, Jørgensen W, Christensen  
VG, Husted S, Chwalibog A, Sejrsen K, Purup S,  
Svalastoga E, McEvoy FJ, Johnsen L. 2013. Late  
gestation undernutrition can predispose for  
visceral adiposity by altering fat distribution  
patterns and increasing the preference for a  
high-fat diet in early postnatal life. *British  
Journal of Nutrition* 109: 2098-2110.

農林水産省農林水産技術会議事務局編（編）。1996。日本飼  
養標準・めん羊（1996年度版）中央畜産会。東京。

Novaes Soares P, Silva Tavares Rodrigues V, Cherem  
Peixoto T, Calvino C, Aparecida Miranda R,  
Pereira Lopes B, Peixoto-Silva N, Lopes Costa L,  
Claudio-Neto S, Christian Manhães A, Oliveira E,  
Gaspar de Moura E, Cristina Lisboa P. 2018.  
Cigarette Smoke during Breastfeeding in Rats  
Changes Glucocorticoid and Vitamin D Status in

Obese Adult Offspring. *International Journal of Molecular Sciences* 19: 3084.

Nusser KD, Frawley S. 1997. Depriving Neonatal Rats of Milk from Early Lactation Has Long-Term Consequences on Mammatrope Development. *Endocrine* 7: 319-323.

Nonnecke BJ, Foote MR, Smith JM, Pesch BA, Van Amburgh ME. 2003. Composition and functional capacity of blood mononuclear leukocyte populations from neonatal calves on standard and intensified milk replacer diets. *Journal of Dairy Science* 86: 3592-3604.

Obeidat BS, Cobb CJ, Sellers MD, Pepper-Yowell AR, Earleywine TJ, Ballou MA. 2013. Plane of nutrition during the preweaning period but not the grower phase influences the neutrophil activity of Holstein calves. *Journal of Dairy Science* 96: 7155-7166.

Ollivett TL, Nydam DV, Linden TC, Bowman DD, Van Amburgh ME. 2012. Effect of nutritional plane on health and performance in dairy calves after

experimental infection with *Cryptosporidium parvum*. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 241: 1514-1520.

Ontsouka CE, Bruckmaier RM, Blum JW. 2003.

Fractionized milk composition during removal of colostrum and mature milk. *Journal of Dairy Science* 86: 2005-2011.

Ontsouka EC, Hammon HM, Blum JW. 2004. Expression of insulin-like growth factors (IGF) -1 and -2, IGF-binding proteins-2 and -3, and receptors for growth hormone, IGF type-1 and -2 and insulin in the gastrointestinal tract of neonatal calves. *Growth Factors* 22: 63-69.

Osmond C, Barker DJ. 2000. Fetal, infant, and childhood growth are predictors of coronary heart disease, diabetes, and hypertension in adult men and women. *Environmental Health Perspectives* 108: 545-553.

Ozanne SE. 2001. Metabolic programming in animals. *British Medical Bulletin* 60: 143-152.

- Peletto S, Bertuzzi S, Campanella C, Modesto P, Maniaci MG, Bellino C, Ariello D, Quasso A, Caramelli M, Acutis PL. 2011. Evaluation of internal reference genes for quantitative expression analysis by real-time PCR in ovine whole blood. *International Journal of Molecular Sciences* 12: 7732-7747.
- Paneth N, Susser M. 1995. Early origin of coronary heart disease (the "Barker hypothesis"). *British Medical Journal* 310: 411-412.
- Pentsuk N, van der Laan JW. 2009. An interspecies comparison of placental antibody transfer: new insights into developmental toxicity testing of monoclonal antibodies. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology* 86: 328-344.
- Pfaffl MW, Georgieva TM, Georgiev IP, Ontsouka E, Hageleit M, Blum JW. 2002. Real-time RT-PCR quantification of insulin-like growth factor (IGF) -1, IGF-1 receptor, IGF-2, IGF-2 receptor, insulin receptor, growth hormone receptor, IGF-

- binding proteins 1, 2 and 3 in the bovine species.  
Domestic Animal Endocrinology 22: 91-102.
- Pollock JM, Rowan TG, Dixon JB, Carter SD. 1994. Level  
of nutrition and age at weaning: effects on  
humoral immunity in young calves. British  
Journal of Nutrition 71: 239-248.
- Puppel K, Gołębiowski M, Grodkowski G, Slósarz J,  
Kunowska-Slósarz M, Solarczyk P, Łukasiewicz M,  
Balcerak M, Przysucha T. 2019. Composition and  
Factors Affecting Quality of Bovine Colostrum: A  
Review. Animals 9: 1070.
- Qasem RJ, Cherala G, D'mello AP. 2010. Maternal  
protein restriction during pregnancy and  
lactation in rats imprints long-term reduction in  
hepatic lipid content selectively in the male  
offspring. Nutrition Research 30: 410-417.
- Quigley JD, Wolfe TA, Elsasser TH. 2006. Effects of  
additional milk replacer feeding on calf health,  
growth, and selected blood metabolites in calves.  
Journal of Dairy Science 89: 207-216.

- Quigley JD, Drewry JJ. 1998. Nutrient and immunity transfer from cow to calf pre- and postcalving. *Journal of Dairy Science* 81: 2779-2790.
- Raeth-Knight M, Chester-Jones H, Hayes S, Linn J, Larson R, Ziegler D, Ziegler B, Broadwater N. 2009. Impact of conventional or intensive milk replacer programs on Holstein heifer performance through six months of age and during first lactation. *Journal of Dairy Science* 92: 799-809
- Redl H, Bahrami S, Schlag G, Traber DL. 1993. Clinical detection of LPS and animal models of endotoxemia. *Immunobiology* 187: 330-345.
- Reuter RR, Carroll JA, Dailey JW, Cook BJ, Galyean ML. 2008. Effects of dietary energy source and level and injection of tilmicosin phosphate on immune function in lipopolysaccharide-challenged beef steers. *Journal of Animal Science* 86: 1963-1976.
- Reynolds LP, Caton JS. 2012. Role of the pre- and post-natal environment in developmental programming of health and productivity. *Molecular and Cellular Endocrinology* 354: 54-59.

- Reynolds LP, Borowicz PP, Caton JS, Crouse MS, Dahlen CR, Ward AK. 2019. Developmental Programming of Fetal Growth and Development. *Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice* 35: 229-247.
- Rincker LE, Vandehaar MJ, Wolf CA, Liesman JS, Chapin LT, Nielsen MS. 2011. Effect of intensified feeding of heifer calves on growth, pubertal age, calving age, milk yield, and economics. *Journal of Dairy Science*. 94:3554-3567.
- Robinson DL, Cafe LM, Greenwood PL. 2013. Meat Science and Muscle Biology Symposium: developmental programming in cattle: consequences for growth, efficiency, carcass, muscle, and beef quality characteristics. *Journal of Animal Science* 91: 1428-1442.
- Rosenberger K, Costa JHC, Neave HW, Weary DM, von Keyserlingk MAG. 2017. The effect of milk allowance on behavior and weight gains in dairy calves. *Journal of Dairy Science* 100: 504-512.
- Salmon H, Berri M, Gerdtts V, Meurens F. 2009. Humoral and cellular factors of maternal immunity in

- swine. *Developmental and Comparative Immunology* 33: 384-93.
- Sandra GD. 2008. Colostrum management for dairy calves. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 24: 19-39.
- Sangild PT. 2003. Uptake of colostral immunoglobulins by the compromised newborn farm animal. *Acta Veterinaria Scandinavica* 98: 105-122.
- Sarjan HN, Divyashree S, Yajurvedi HN. 2017. The protective effect of the Vacha rhizome extract on chronic stress-induced immunodeficiency in rat. *Pharmaceutical Biology* 55: 1358-1367.
- Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. 2003. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of Leukocyte Biology* 75: 163-189.
- Shichkin VP, Antica M. 2020. Thymus Regeneration and Future Challenges. *Stem Cell Reviews and Reports* 16: 239-250.
- Sinclair KD, Rutherford KM, Wallace JM, Brameld JM, Stöger R, Alberio R, Sweetman D, Gardner DS,

Perry VE, Adam CL, Ashworth CJ, Robinson JE, Dwyer CM. 2016. Epigenetics and developmental programming of welfare and production traits in farm animals. *Reproduction, Fertility and Development* 28: 1443-1478.

Smedegård G, Cui LX, Hugli TE. 1989. Endotoxin-induced shock in the rat. A role for C5a. *The American Journal of Pathology* 135: 489-497.

Soberon F, Raffrenato E, Everett RW, Van Amburgh ME. 2012. Prewaning milk replacer intake and effects on long-term productivity of dairy calves. *Journal of Dairy Science* 95: 783-793.

Soberon F, Van Amburgh ME. 2013. Lactation Biology Symposium: The effect of nutrient intake from milk or milk replacer of preweaned dairy calves on lactation milk yield as adults: a meta-analysis of current data. *Journal of Animal Science* 91: 706-712.

Spencer TE, Kelleher AM, Bartol FF. 2019. Development and Function of Uterine Glands in Domestic

Animals. Annual Review of Animal Biosciences. 7:  
125-147.

Stecher VJ, Thorbecke GJ. 1967. Beta-1C and immune  
globulin formation in vitro by tissues from germ-  
free and conventional rodents of various ages.  
Immunology 12: 475-487.

Stelwagen K, Carpenter E, Haigh B, Hodgkinson A,  
Wheeler TT. 2009. Immune Components of Bovine  
Colostrum and Milk Journal of Animal Science  
87:3-9.

Sullivan EC, Hinde K, Mendoza SP, Capitanio JP. 2011.  
Cortisol concentrations in the milk of rhesus  
monkey mothers are associated with confident  
temperament in sons, but not daughters.  
Developmental Psychobiology 53: 96-104.

Tatara MR, Sliwa E, Krupski W. 2007. Prenatal  
programming of skeletal development in the  
offspring: effects of maternal treatment with  
beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) on  
femur properties in pigs at slaughter age. Bone  
40: 1615-1622.

- Thapa P, Farber DL. 2019. The Role of the Thymus in the Immune Response. *Thoracic Surgery Clinics* 29: 123-131.
- Turdi S, Ge W, Hu N, Bradley KM, Wang X, Ren J. 2013. Interaction between maternal and postnatal high fat diet leads to a greater risk of myocardial dysfunction in offspring via enhanced lipotoxicity, IRS-1 serine phosphorylation and mitochondrial defects. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 55:117-29.
- Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ. 2014. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signaling and inflammatory disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 1843: 2563-2582.
- Uetake K. Newborn calf welfare: a review focusing on mortality rates. 2013. *Animal Science Journal* 84: 101-105.
- Velazquez MA. 2015. Impact of maternal malnutrition during the periconceptual period on mammalian preimplantation embryo development. *Domestic Animal Endocrinology* 51: 27-45.

Wallace JM, Milne JS, AitkenRP, Adam CL. 2014.

Influence of birthweight and gender on lipid status and adipose tissue gene expression in lambs. *Journal of Molecular Endocrinology* 53: 131-144.

Wasowska E, Puppel K J 2018. Changes in the content of immunostimulating components of colostrum obtained from dairy cows at different levels of production. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 98: 5062-5068.

Weaver DM, Tyler JW, VanMetre DC, Hostetler DE, Barrington GM. 2000. Passive transfer of colostral immunoglobulins in calves. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 14: 569-577.

Wells SJ, Dargatz DA, Ott SL. 1996. Factors associated with mortality to 21 days of life in dairy heifers in the United States. *Preventive Veterinary Medicine* 29: 9-19.

Whitney, T. R., G. C. Duff, J. K. Collins, D. W. Schafer, and D. M. Hallford. 2006. Effects of diet for early-weaned crossbred beef steers on metabolic

profiles and febrile response to an infectious bovine herpesvirus-1 challenge. *Livestock Science* 101: 1-9.

Wolff JE, Dobbie PM, Petrie DR. 1989. Anabolic effects of insulin in growing lambs. *Quarterly Journal of Experimental Physiology* 74: 451-463.

Yan W, Wiley AA, Bathgate RA, Frankshun AL, Lasano S, Crean BD, Steinetz BG, Bagnell CA, Bartol FF. 2006. Expression of LGR7 and LGR8 by neonatal porcine uterine tissues and transmission of milk-borne relaxin into the neonatal circulation by suckling. *Endocrinology* 147: 4303-4310.

Ye Z, Huang Y, Liu D, Chen X, Wang D, Huang D, Zhao L, Xiao X. 2012. Obesity induced by neonatal overfeeding worsens airway hyper responsiveness and inflammation. *PLOS ONE* 7: e47013.

Yerex RP, Young CW, Donker JD, Marx GD. 1988. Effects of selection for body size on feed efficiency and size of Holsteins. *Journal of Dairy Science* 71: 1355-1360.

Zhu Y, Li T, Huang S, Wang W, Dai Z, Feng C, Wu G,  
Wang J. 2018. Maternal L-glutamine  
supplementation during late gestation alleviates  
intrauterine growth restriction-induced  
intestinal dysfunction in piglets. *Amino Acids* 50:  
1289-1299.