妊娠末期における母牛の栄養状態が出生後の黒毛和種産子の 末梢血白血球ポピュレーションに及ぼす影響

田波絵里香¹⁾ 大塚浩通^{2)†} 向井真知子¹⁾ 小比類巻正幸¹⁾
安藤貴朗²⁾ 小形芳美³⁾ 川村清市²⁾

- 1) 青森県 開業 (小比類巻家畜診療サービス：〒039-2683 上北郡東北町大平63-3)
2) 北里大学獣医学部 (〒034-8628 十和田市東二十三番町35-1)
3) 山形県農業共済組合連合会 (〒990-2171 山形市大字七浦字北川原286-1)

(2008年2月25日受付・2008年12月12日受理)

要 約

妊娠末期の母牛の栄養状態が黒毛和種産子の出生後の免疫状態に及ぼす影響を調べるため、妊娠末期において異なる飼養設計にて飼育した母牛の産子を対象に出生後の末梢血白血球ポピュレーションを観察した。供試牛は一牧場で飼育されていた母牛とその産子33組で、母牛の産歴とその給与飼料内容により、分娩前の飼料内容が不足した初産牛の産子(初産不足群; N = 5)と経産牛の産子(経産不足群; N = 8)、充足した初産牛の産子(初産充足群; N = 7)と経産牛の産子(経産充足群; N = 13)の4群とした。経産不足群の産子におけるCD4⁺CD45R⁺T細胞数、CD8⁺CD45R⁺T細胞数およびB⁺細胞数は経産充足群の産子に比べ低値で推移した。このことから、経産牛の黒毛和種産子における出生後の免疫状態は、妊娠末期における母牛の飼料設計の充足状況に影響を受ける可能性がある。

——キーワード：子牛，飼料内容，黒毛和種，妊娠末期，末梢血白血球。

----- 日獣会誌 62, 623～629 (2009)

黒毛和種子牛は新生時から虚弱なものが多く、下痢や肺炎などの感染症を発症しやすい。虚弱新生子は在胎期間が正常でありながら出生時において低体重で各臓器の発達が未熟な状態とされている [1]。虚弱新生子や周産期死亡の発生要因には、血統や品種などの遺伝的要因、母牛の胎盤の構造、子宮内感染や胎子期の発育遅延、難産および難産に伴う低酸素症や敗血症などがあげられている [2, 3]。

正常な胎子の増体は胎齢が進むほど上昇するために、母体の妊娠末期における栄養要求量は著しく高くなる。妊娠期の母親の栄養状態は出生後の子供の体重に影響を与えており、出世時に低体重であった子牛では胎子期からすでに低成長である [4, 5]。このことから母体と胎盤間の適切な輸送による栄養供給がなければ、胎子は十分に成熟できないまま出生する危険性があると考えられている。

人においては、低出生体重児においてT細胞数の減少が認められている [6]。また、黒毛和種虚弱子牛におい

て、出生時から末梢T細胞数が低値で推移することも指摘されている [7]。人では胎子期における胸腺の発達が出生後の免疫機能の成熟に影響を与えるという報告があり [8]、出生子牛においても免疫抵抗性の向上のためには、胎子期から免疫機能が成熟することが重要であると考えられる。しかし母牛の妊娠末期の栄養状態と産子の細胞性免疫に関する報告は見当たらない。そこで本研究では、子牛の胎子期すなわち妊娠末期の母牛の栄養状態と出生後の黒毛和種子牛の細胞性免疫機能との関連を調べる目的で、妊娠末期の栄養状態の異なる母牛が産出した子牛の末梢血白血球ポピュレーションを中心に解析した。

材 料 お よ び 方 法

供試牛は一牧場で飼育されていた母牛とその産子33組で、母牛の産歴と分娩予定1カ月前の給与飼料内容により、飼料設計において不足した初産牛の産子(初産不足群; N = 5, 母牛の平均年齢; 2.3 ± 0.1) (平均 ± 標準

† 連絡責任者：大塚浩通 (北里大学獣医学部獣医学科大動物内科学研究室)

〒034-8628 十和田市東二十三番町35-1

☎ 0176-23-4371 FAX 0176-23-8703

E-mail : otsuka@vmass.kitasato-u.ac.jp

図1 各群の末梢血CD3T細胞数の比較
充足群 (●) および不足群 (○)

*は2群間に有意差あり ($P < 0.05$)。

表1 各群の飼料計算値

	初産不足群	初産充足群	経産不足群	経産充足群
CP (crude protein)	85.3	114.1	94.2	146.7
TDN (total digestible nutrients)	64.4	106.5	71.1	121.7
NDF (neutral detergent fiber)	102.3	148.3	112.7	159.7

*分娩前の妊娠牛の飼料充足状況は日本飼養標準肉用牛2000年版に従って計算した

*単位は全て充足率 (%)

誤差, 以下同様)と経産牛の産子(経産不足群; $N = 8$, 母牛の平均年齢; 6.1 ± 0.6), 飼料設計の充足した初産牛の産子(初産充足群; $N = 7$, 母牛の平均年齢; 2.4 ± 0.4)と経産牛の産子(経産充足群; $N = 13$, 母牛の平均年齢; 7.5 ± 0.3)の4群とした。初産の2群の母牛はすべて黒毛和種, 経産不足群では2頭が経産充足群では3頭が黒毛和種であり, それ以外はすべて黒毛和種とホルスタイン種の交雑種の母牛であった。なお, 黒毛和種牛は人工授精, 交雑種牛は黒毛和種の受精卵の移植により妊娠させた。またすべての子牛は出生後3日から5日に母親からの自然哺乳から人工哺乳管理に変更した。

母牛の給与飼料充足率の計算は日本飼養標準肉用牛2000年版の養分要求量に従い, 母牛の給与飼料の充足率を可消化養分総量 (TDN), 粗蛋白質要求量 (CP),

総繊維量 (NDF) の各項目において計算した。経産牛は体重500kg (黒毛和種), 600kg (交雑種), 初産牛は体重500kg (黒毛和種) および日増体量0.07kg/dayとし, 算出した。妊娠末期における母牛の給与飼料の比較では, 初産不足群ならびに経産不足群のTDN, CPが100%以下の充足率を示したのに対し, 初産充足群ならびに経産充足群では100%以上の充足率を示した (表1)。

母牛からの採血は分娩予定日の1週間から2週間前に1回, 子牛の採血は, 出生当日, 以降1週間おきに4回目まで計5回行い, 臨床所見, フローサイトメトリー法により末梢白血球ポピュレーションを観察した。血液は頸静脈から採取し, プレーン, EDTA-2Na, ヘパリンおよびフッ化Na添加真空採血管に分注した。血液中の生化学成分の検査項目として, 母牛および子牛ともに, フッ化Na血漿による血糖値測定 (Glu; 酵素法), プレーン血清による尿素窒素値 (BUN; ウレアーゼ・GLDH法) ならびに総コレステロール値 (T-Cho; 酸化酵素法) を測定した。

白血球表面抗原の解析は定法 [9] に従い実施し, 一次抗体 (VMRD, U.S.A.) としての抗ウシCD3 (MMIA), CD4 (CACT183B), CD8 (9ACT80C), CD45R (GC6A), TcR1-N12 (ACT61A), MHCclass II (TH14B) および抗ヒトCD14 (MY-4; Coulter Immunology, Hailed, Florida, U.S.A.) に対する抗体

図2 各群の末梢血 CD4⁺T 細胞数の比較

充足群 (●) および不足群 (○)

*は2群間に有意差あり (P<0.05).

を用いた。また標識抗体として抗マウス IgG PE 標識二次抗体 (Serotec Ltd, Oxford, U.K.) と抗マウス IgM FITC 標識二次抗体 (Southern Biotech, Birmingham, U.S.A.) を用いた。なお、各細胞の数値はフローサイトメーター (FACScan, Becton Dickinson, U.S.A.) により解析した顆粒球と単核球の比率および白血球数から算出した実数値によって数を求めた。

すべての項目は平均±標準偏差で表記した。検査成績は一元配置分布後に Scheffe の方法により2群間の比較を行い解析した。分散分布が正しくないものについては Kruskal Wallis Test を行い、Scheffe の方法により4群間の比較を行い解析した。いずれも5%以下の危険率で有意な差とした。

子牛の下痢発生の状況調査として、泥状あるいは水様性下痢を発症し、治療の必要であったものを下痢症と判断した。

成 績

母牛の血液検査では、初産不足群の母牛の BUN (5.7 ± 0.7mg/dl) は初産充足群 (8.7 ± 1.4mg/dl) の母牛に比べて有意な低値を示した (P<0.05) もの、経産不足群 (8.0 ± 0.5mg/dl) と経産充足群 (6.8 ± 1.1mg/dl) との間には有意な差を認めなかった。母牛の Glu および T-cho においては有意な差を認めなかった。

初産不足群以外の3群における子牛の T-cho は出生日に最低値を示し、その後徐々に上昇した。1週後における初産不足群の T-cho は初産充足群に比べ有意な低値を示した。子牛の Glu ならびに BUN においては有意な差を認めなかった。

初産不足群の CD3⁺TcR1-N12⁺T 細胞数ならびに CD3⁺TcR1-N12⁻T 細胞数は初産充足群に比べて低値で推移したものの有意な差はなかった。経産不足群の CD3⁺TcR1-N12⁺T 細胞数ならびに CD3⁺TcR1-N12⁻T 細胞数も経産充足群に比べ低値で推移し、経産の不足群と充足群との間では1, 3および4週において有意な差を認めた (図1)。初産不足群ならびに経産不足群の CD4⁺CD45R⁺T 細胞数および CD8⁺CD45R⁺細胞数は初産充足群ならびに経産充足群に比べておのおの低値で推移し、初産群の CD4⁺CD45R⁺T 細胞数では1週、また経産群の CD4⁺CD45R⁺T 細胞数ならびに CD8⁺CD45R⁺T 細胞数では1, 2および4週において有意な差を認めた (図2, 3)。すべての群の MHC class II⁺CD14⁻B 細胞数は出生後から徐々に上昇した。経産不足群の MHC class II⁺CD14⁻B 細胞数および CD21⁺IgM⁺B 細胞数は経産充足群に比べ低値で推移し、3週目には有意な差を認めたものの、初産の2群間では有意差を認めなかった (図4)。CD14⁺単球には有意な変化が認められなかった。

子牛の下痢症の発生は、初産不足群で5頭中4頭

図3 各群の末梢血CD8⁺T細胞数の比較

充足群 (●) および不足群 (○)

*は2群間に有意差あり ($P < 0.05$).

(80.0%), 初産充足群で7頭中5頭 (71.4%), 経産不足群で8頭中5頭 (62.5%) 認められたものの, 経産充足群では観察されなかった。

なお, 本研究ではすべての測定項目において, 人工受精と受精卵移植による産子の間に差は認められなかった。

考 察

本研究では妊娠末期における牛の飼料内容と産子の出生後の末梢白血球ポピュレーションとの関連を評価した。その結果, 経産母牛の分娩予定1カ月前での飼料設計内容が産子の出世後4週間までの免疫細胞数の変化に影響を与えることが明らかとなった。

経産充足群のCD4⁺CD45R⁺T細胞およびCD8⁺CD45R⁺T細胞数が経産不足群に比べて出生日から高く, 観察期間を通して高値を持続した。牛のCD45R⁺細胞は人のCD45RA⁺細胞に相当するとされ, 新生子の血中CD45RA⁺細胞割合は成人に比べ多い [10, 11]。T細胞は特異的抗原による刺激をまだ受けていない未感作 (未熟) T細胞から, 胸腺で分化を終え成熟T細胞であるCD45RA⁺細胞として末梢血中に移行する [12]。胸腺はおもにT細胞の分化・増殖を担う中枢リンパ組織であり, 胎子期から機能している [13]。飼料不足の2群の子牛における持続的な低CD45R⁺T細胞数の原因に, 胎生期から哺乳期にかけてのT細胞の分化能の低下が影

響したものと示唆される。

人では分裂・増殖の活発なリンパ系組織を中心に栄養の要求量が高いとされ, 胎子期における蛋白-エネルギー栄養失調症の新生児では, リンパ球の細胞分裂が盛んな胸腺の形成不良が起こり, 重量が半分以下で出生することがある [7]。また胸腺機能の低下にともなってT細胞の分化・成熟が停滞し, CD4⁺T細胞数の大幅な減少とCD8⁺T細胞数の減少がみられる [14]。本研究においても胎生期からの子牛の低栄養が出生時における免疫状態に影響を及ぼした可能性がある。

いっぽう, 充足群のT細胞は出生後から徐々に増加し, これまでの健康な黒毛和種子牛の変化に類似したが [15], 不足群における子牛のT細胞の増加は緩慢であった。下痢に罹患した子牛ではコルチゾルが上昇する [16] が, コルチゾルは胸腺にアポトーシスを惹起するホルモンであり, 強力な末梢T細胞数の減少作用を有する [17]。本研究の飼料不足の2群の子牛において下痢の発症が持続的な低リンパ球数に影響を与えたと示唆される。

飼料が不足した2群のTcR1-N12⁺T細胞は充足した2群に比べ低値であり, 経産産子においては出生日から有意な低値が認められた。健康な子牛の末梢血 $\gamma\delta$ 型T細胞数は出生後徐々に増加するが [15], 黒毛和種の虚弱子牛においては, 出世時から持続的な末梢血 $\gamma\delta$ 型T細胞の低値を示すとされており, 不足であった2群の子牛の成績に類似した [7]。 $\gamma\delta$ 型T細胞は胸腺外で分化し

図4 各群の末梢血 MHC class-II⁺およびCD21⁺B細胞数の比較

充足群 (●) および不足群 (○)

*は2群間に有意差あり ($P < 0.05$).

ておもに消化管、表皮や生殖器などのリンパ系組織以外の粘膜面に多く存在し、第一線の防御因子としてサイトカイン産生などの反応をしている [18]. 末梢血 $\gamma\delta$ 型T細胞数の少ない黒毛和種子牛では下痢の発生率が高くなることも報告されている [19]. $\gamma\delta$ 型T細胞の低値である子牛では消化管など粘膜組織の免疫反応が低下しやすく、腸管粘膜での感染が容易であったため下痢を発症しやすかった可能性がある.

経産産子において、母牛の飼料設計が充足した群では不足群に比べ観察期間中にいくつかのリンパ球数において有意な高値を示したものの、初産産子においては、飼料内容が充実していたにも関わらず、 $CD4^+CD45R^+$ T細胞を除いて不足群と充足群との間に有意な増加が認められなかった. 人においては10代の若齢妊婦の産児で、低出生体重児、未熟児、新生児死の発生率が多く、その理由として胎盤の未発達、多量栄養素の母子間の競合、微量栄養素の欠乏、感染症や妊娠性高血圧などがあげられている [20, 21]. 低出生体重児や未熟児はT細胞数の減少や γ -グロブリン産生能が低下しており [6], 免疫機能が低下していると考えられる. 虚弱黒毛和種子牛では下痢を発症しやすく、出生後から末梢血 $CD8^+$ T細胞や $\gamma\delta$ 型T細胞の低下が持続するとされており、本研究の初産産子の成績に類似する [7]. 本研究において母牛の年齢や産歴は胎生期における子牛の免疫機能の発達と新生時の健康に大きく関与したことが示唆される.

黒毛和種牛は血中インスリン濃度やインスリン感受性が他の品種に比べて高く、糖の蓄積に優れている栄養代謝の特徴を有する [22, 23]. この特性は、他品種に比べて黒毛和種妊娠牛が胎盤を介した胎子への栄養供給能に劣っており、低体重産子を分娩するリスクが高くなることを示唆する. 加えて、初産母牛は発育段階にあり、胎子の成長に必要な栄養素の他に自身の成長に要する栄養素も必要である [24]. このことから黒毛和種初産母牛は、経産母牛や他の品種の妊娠牛に比べて栄養素を自身に蓄積しやすく、妊娠末期の飼料設計が日本飼養標準の充足率を満たしていても、胎子への栄養供給不足による成長不良に至り、虚弱子牛が出生する可能性もある. 初産産子は母牛の生理的特色から虚弱子牛となる危険性があり、本研究においても虚弱子牛であったために低リンパ球数であったものと推察される.

本研究から、分娩前に飼料不足にあった妊娠牛の産子では、出生後に下痢が頻発し、免疫抵抗性の低下を誘発しやすいものと示唆された. 抗病性の高い黒毛和種子牛の生産の一助として、妊娠末期における母牛の飼料の充実を考慮することが望まれる.

引用文献

- [1] 小形芳美, 高橋浩吉, 漆山芳吉, 佐藤 光, 酒井淳一, 渡辺英次, 板垣昌志: 黒毛和種における母体内発育遅延虚弱子牛と血統の関係, 日獣会誌, 50, 271-273

- (1997)
- [2] 小形芳美, 阿部浩之, 三澤 隆, 高橋洪吉, 伴 顕, 加藤敏英, 酒井淳一: 黒毛和種子牛における周産期死亡の原因と出生時体重, *J Reprod Dev*, 41, 77-81 (1995)
  - [3] 小形芳美, 高橋浩吉, 安部浩吉, 三澤 隆, 漆山芳郎, 加藤敏英, 酒井淳一: 黒毛和種虚弱子牛の血液性状および母牛との関係, *日獣会誌*, 50, 253-257 (1997)
  - [4] Anthony RV, Bellows RA, Short RE, Staigmiller RB, Kaltenbach CC, Dunn TG: Fetal growth of beef calves. II. Effect of sire on prenatal development of the calf and related placental characteristics, *J Anim Sci*, 62, 1375-1387 (1986)
  - [5] Vobecky JS: Nutritional aspects of preconceptional period as related to pregnancy and early infancy, *Food Nutr Sci*, 10, 205-236 (1986)
  - [6] Gennaro S, Fehder WP, Cnaan A, York R, Campbell DE, Gallagher PR, Douglas SD: Immune responses in mothers of term and preterm very-low-birth-weight infants, *Clin Diagn Lab Immunol*, 4, 565-571 (1997)
  - [7] Ohtsuka H, Fukunaga N, Hara H, Fukuda S, Hayashi T, Hoshi F, Yoshino T, Koiwa M, Kawamura S: Changes in Peripheral Leukocyte Populations of Weak Calf Syndrome of Japanese Black Calves, *J Vet Med Sci*, 65, 793-796 (2003)
  - [8] McDade TW, Beck MA, Kuzawa CW, Adair LS: Prenatal undernutrition and postnatal growth are associated with adolescent thymic function, *J Nutr*, 131, 1225-1231 (2001)
  - [9] Ohtsuka H, Watanabe C, Kohiruimaki M, Ando T, Watanabe D, Masui M, Hayashi T, Abe R, Koiwa M, Sato S, Kawamura S: Comparison of two different nutritive conditions against the changes in peripheral blood mononuclear cells of periparturient dairy cows, *J Vet Med Sci*, 68, 1161-1166 (2006)
  - [10] Haward C, Naessens J: Summary of workshop finding for cattle, *Vet Immunol Immunopathol*, 39, 25-48 (1993)
  - [11] Horgan KJ, Van Seventer GA, Shimizu Y, Shaw S: Hyporesponsiveness of "naive" (CD45RA⁺) human T cells to multiple receptor-mediated stimuli but augmentation of responses by co-stimuli, *Eur J Immunol*, 20, 1111-1118 (1990)
  - [12] Bembridge GP, MacHugh ND, McKeever D, Awino E, Sopp P, Collins RA, Gelder KI, Howard CJ: CD45RO expression on bovine T cells: relation to biological function, *Immunology*, 86, 537-544 (1995)
  - [13] Steinman GG: Changes in the human thymus during aging, *Curr Top Pathol*, 75, 43-88 (1986)
  - [14] Chandral RK: Symposium on 'Nutrition, infection and immunity' Nutrition and Immunology from the clinic to cellular biology and back again, *Proc Nutr Soc*, 58, 681-683 (1999)
  - [15] 大塚浩通, 小松勝一, 今内 覚, 福田茂夫, 菊 佳男, 吉野知男, 小岩政照, 川村清市: 黒毛和種とホルスタイン種の子牛における末梢血白血球の比較, *日獣会誌*, 55, 789-795 (2002)
  - [16] Cabello G.: Plasma cortisol and aldosterone levels in healthy and diarrhoeic calves, *Br Vet J*, 136, 160-167 (1980)
  - [17] Vanmuylder N, Dourov N.: Immunocytochemical investigations of heat shock proteins expression during thymic apoptosis induced by glucocorticoids, *Pathol Res Pract*, 196, 119-124 (2000)
  - [18] Sopp P, Howard CJ: IFN γ and IL-4 production by CD4, CD8, and WC1 $\gamma\delta$ TCR + T cell from cattle lymph nodes and blood, *Vet Immunol Immunopathol*, 81, 3856-3864 (2001)
  - [19] 松田敬一: 黒毛和種子牛における下痢症の免疫学的な病態の解析と予防に関する研究, *日家畜臨床誌* 29, 78-87 (2006)
  - [20] Haaga JG: How are young maternal age and primiparity related to infant health? Malays, *J Reprod Health*, 7, 27-40 (1989)
  - [21] Naeye RL: Teenaged and pre-teenaged pregnancies: consequences of the fetal-maternal competition for nutrients, *Pediatrics*, 67, 146-150 (1981)
  - [22] Shingu H, Hodate K, Kushibiki S, Ueda Y, Watanabe A, Shinoda M, Matsumoto M.: Profiles of growth hormone and insulin secretion, and glucose response to insulin in growing Japanese Black heifers (beef type): comparison with Holstein heifers (dairy type), *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 30, 259-270 (2001)
  - [23] Ohtsuka H, Kitagawa M, Kohiruimaki M, Tanami E, Masui M, Hayashi T, Ando T, Watanabe D, Koiwa M, Sato S, Kawamura S.: Comparison of the insulin reaction of peripheral blood T cells between healthy Holstein dairy cows and JB during the periparturient period, *J Vet Med Sci* 68, 1211-1214 (2006)
  - [24] Hickson RE, Morris ST, Kenyon PR, Lopez-Villalobos N: Dystocia in beef heifers: a review of genetic and nutritional influences, *N Z Vet J*, 54, 256-264 (2006)

Effect of Nutritive Condition of a Dam in Later Pregnancy on Peripheral Leukocyte Population in Postnatal Japanese Black Calves

Erika TANAMI *, Hiromichi OHTSUKA †, Machiko MUKAI, Masayuki KOHIRUIMAKI, Yoshimi OGATA and Seiichi KAWAMURA

* Kohirumaki Animal Medical Service, 63-3 Ohdaira, Tohoku, Kamikita-gun, 039-2683, Japan

SUMMARY

To clarify the effect of the nutritive condition of a dam in late pregnancy on the immunity of postnatal Japanese Black (JB) calves, the peripheral leukocyte population was observed in JB calves from dams receiving different feed content during the last pregnancy. The combined total of 33 dams and calves were fed in one herd, but divided four groups based on feed content during the last pregnant period : insufficient nutrition and first calving (N = 5), insufficient nutrition and calving history (N = 8), sufficient nutrition and first calving (N = 7), and sufficient nutrition and calving history (N = 13). The observation revealed that the numbers of CD4⁺CD45R⁺ T cell, CD8⁺CD45R⁺ T cell and B cells were higher in the group with sufficient nutrition and calving history than those in calves in the insufficient nutrition and calving history group. This finding suggested that the peripheral leukocyte population in JB calves could be susceptible to the feed given to their dam during the last pregnancy. — Key words : calves, feeding content, Japanese Black, later pregnant period, peripheral leukocyte.

† Correspondence to : Hiromichi OHTSUKA (School of Veterinary Medicine, Kitasato University)

35-1 Higashi, niyu-san-ban-cho, Towada, 034-8628, Japan

TEL 0176-23-4371 FAX 0176-23-8703 E-mail : otsuka@vmas.kitasato-u.ac.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 62, 623 ~ 629 (2009)