

日本家禽学会誌, 39: J1-J10, 2002

Copyright ©2002, Japan Poultry Science Association

カルシウムの給与時期が卵殻形成と血漿カルシウム濃度及び 卵殻腺部におけるCaBP-D_{28K} mRNA濃度に及ぼす影響

後藤尚也¹⁾・田上雅之¹⁾・有賀美保子²⁾・高間智浩²⁾・武石勝¹⁾・
山村奈美子²⁾・上吉道治²⁾

¹⁾ 日本配合飼料株式会社中央研究所, 栃木県芳賀郡茂木町字天子451,321-3621

²⁾ 岐阜大学農学部生物資源生産学科, 岐阜県岐阜柳戸 1-1,501-1193

キーワード: カルシウム結合蛋白質, 遺伝子発現, カルシウム, 卵殻質, ニワトリ

Influence of Time of Calcium Intake on Plasma Concentrations of Calcium and Shell Gland
Concentration of CaBP-D_{28K}mRNA

HisayaGoto¹⁾, MasayukiTagami¹⁾, MihokoAruga²⁾, TomohiroTakama²⁾, MasaruTakeishi¹⁾,
NamikoYamamura²⁾ and Michiharu Kamiyoshi²⁾

¹⁾ Laboratory of Nippon Formula Feed Mfg.Co.,Ltd. Tochigi 321-3621

²⁾ The United Graduate School of Agricultural Science, Gifu University, Gifu 501-1193

Keyword: calcium-binding protein, gene expression, calcium, egg shell quality, chicken

カルシウムの給与時期が卵殻形成と血漿カルシウム濃度及び 卵殻腺部における CaBP-D_{28K} mRNA 濃度に及ぼす影響

後藤尚也¹⁾・田上雅之¹⁾・有賀美保子²⁾・高間智浩²⁾
武石 勝¹⁾・山村奈美子²⁾・上吉道治²⁾

¹⁾ 日本配合飼料株式会社中央研究所, 栃木県芳賀郡茂木町字天子 451, 321-3621

²⁾ 岐阜大学農学部生物資源生産学科, 岐阜県岐阜市柳戸 1-1, 501-1193

本実験では, カルシウム (Ca) 給与時期が卵殻形成におよぼす影響を明らかにしようとした。使用したニワトリは, 45 週齢の白色レグホーン種産卵鶏で, 対照鶏には 3.1% Ca 含有の通常飼料を, 試験鶏には午前中は 1.0% Ca 含有の低 Ca 飼料, 午後は 4.82% Ca 含有の高 Ca 飼料を給与した。4 週間飼育し, 試験期間中における生存率, 産卵率, 卵重, 飼料摂取量, 飼料要求率及び Ca 摂取量を調査した。また, 試験終了時の排卵周期中において, 3 時間毎に, 血漿中 Ca イオンと無機リン濃度を測定すると共に, 卵殻腺部におけるカルシウム結合蛋白質 (CaBP-D_{28K}) mRNA を測定した。さらに, 試験開始時と試験終了時に, 任意に採取した 50 個の卵において, 卵殻強度と卵殻 Ca 量を測定した。その結果, 対照鶏と試験鶏の間で, Ca 給与時期の相違による, 生存率, 産卵成績, 飼料摂取量, 飼料要求率, Ca 摂取量には差は認められなかった。血漿中 Ca イオン濃度は午前中と午後の初期において試験鶏は対照鶏に比べて有意に低かった。血漿中無機リン濃度のピークの出現は試験鶏の方が早期に現れた。卵殻強度は対照鶏において試験開始時に比べて終了時に低下する傾向を示したが, 試験鶏では低下傾向は認められずむしろ増加傾向を示した。卵殻 Ca 含量は, 対照鶏では試験開始時に比べ, 終了時には有意に減少したのに対し, 試験鶏では有意な減少は認められず, 終了時においては試験鶏の方が有意に多かった。卵殻腺部における CaBP-D_{28K} mRNA は卵殻形成が盛んと見なされる排卵後 13~20 時間の時期に対照鶏に比べ試験鶏において有意に高い値を示した。これらの結果から, 本実験で用いた Ca 給与時期で, 卵殻腺部における CaBP-D_{28K} mRNA の増加を介し, 卵殻への Ca 沈着量が増加して, 卵殻質が向上する可能性が示唆された。

キーワード: カルシウム結合蛋白質, 遺伝子発現, カルシウム, 卵殻質, ニワトリ

緒 言

産卵鶏の生体内における全カルシウム (Ca) 量は 20~30 g (Taylor and Stringer, 1965) で, その内約 98% が骨に存在し (Common, 1938), 骨の支持成分としての役割を果たすと共に, 産卵しているニワトリでは体内カルシウムの約 10% に相当する Ca が卵殻と卵黄などに消

費されている。ニワトリにおいても, 骨が Ca の貯蔵庫としての役割を果たしていることは知られている (Duckworth and Hill, 1953) が, 先に述べたようにニワトリでは 1 個の卵を産むのに約 2 g と体内 Ca 量の 10% 近くの Ca を必要とするので, ニワトリを含めて鳥類では, 支持組織としての骨 (cortical bone: 皮骨) よりも 10~15 倍 Ca の代謝回転率が高い骨髓骨 (medullary bone) と呼ばれる特殊な骨がエストロゲンとアンドロジェンの共同作用によって大腿骨腔に産卵の開始前に形成され, 産卵などにおける Ca 需要の増加に対応する機構が発達している (Simkiss, 1975)。卵殻への Ca 沈着における Ca 利用は, 午前中に Ca を給与した場合は Ca の多くは骨を介して卵殻に沈着するが, 午後に給与した場合は Ca は骨を介さず直接卵殻に沈着することが多く

2001 年 8 月 8 日受付 2001 年 9 月 17 日受理

連絡者: 後藤尚也

〒321-3621 日本配合飼料株式会社中央研究所, 栃木県芳賀郡茂木町字天子 451

Tel 0285-63-1121

Fax 0285-63-1120

Email: hisaya.goto@nippai.co.jp

なる (Roland and Farmer, 1984) という。放射性 Ca を使用した実験では、卵殻形成に利用される Ca の内、骨からの Ca が占める割合が高くなるにつれて卵殻質は劣る (Roland and Farmer, 1984) ことが報告され、また、産卵鶏において 0.4% の低 Ca 飼料を給与し、午前 8 時または午後 4 時に 3 g の Ca を強制給与すると、卵殻形成時期でない午前 8 時に Ca を強制給与した場合には卵殻質が悪化すること (Lennards and Roland, 1981)、午前に低 Ca 飼料、午後に高 Ca 飼料を給与すると卵殻質が改善されること (Cason and Britton, 1981; Bootwalla *et al.*, 1982; Hellwig *et al.*, 1982)、さらに、1 鶏群 3 万羽の養鶏農場で行った後藤ら (未発表) の試験結果では、午前に 1.0% の低 Ca を午後に 6.1% の高カルシウム飼料を給与することにより、卵殻質が改善され破卵率が減少することなどが見出されている。これらの報告から、午後に Ca をより多く摂取させた方が卵殻質を向上させる可能性が示唆されている。

一方、ニワトリの卵殻腺部には、腸管において Ca の吸収に関与するものと同じ Ca 結合タンパク質 (CaBP-D_{28K}) が存在し (Corradino, 1968)、しかもこの CaBP-D_{28K} 量が卵殻形成中に増加する (Bar and Hurwitz, 1973; Nys *et al.*, 1989; Bar *et al.*, 1990; Striem and Bar, 1991; Bar *et al.*, 1992; Nys *et al.*, 1992; Ieda *et al.*, 1995) ことから、CaBP-D_{28K} は卵殻形成と密接に関係していることが示唆されている。また、ニワトリの排卵周期中において、卵殻腺部の CaBP-D_{28K} mRNA 濃度は、血漿中の Ca イオン濃度と全く逆の様相を示すことから、血漿中の Ca イオンが CaBP-D_{28K} mRNA 発現に関与する可能性が示唆されている (後藤ら, 1998)。しかし、Ca の給与時期が排卵周期中における血漿カルシウムと無機リン濃度の変動および卵殻腺部における CaBP-D_{28K} mRNA レベルの変動におよぼす影響についての報告は未だ見当たらない。

そこで、本実験では、1 日の Ca 摂取量が 3.10% Ca を含有する通常飼料を給与した場合と同等になるように、午前に Ca 含量 1.00% の低 Ca 飼料、午後に Ca 含量 4.82% の高 Ca 飼料を給与することで、種々の卵殻質と共に排卵周期中における血中 Ca 濃度と無機リン濃度および卵殻腺部における CaBP-D_{28K} mRNA レベルの変動に与える影響を検討することにより、Ca 給与時期が卵殻形成に及ぼす効果を明らかにしようとした。

材料及び方法

供試鶏と試料採取

本実験に使用したニワトリは、クラッチ 7 以上の白色レグホーン種産卵鶏 (54 週齢のデカルブ TX35) であ

る。ニワトリは、日本配合飼料株式会社中央研究所の無窓鶏舎において、午前 5 時点灯とする 14 時間照明 10 時間暗黒の明暗周期下で、単飼ケージ内で飼育した。対照鶏と試験鶏はそれぞれ 160 羽ずつで、計 320 羽のニワトリを使用した。飼料については、対照鶏には Ca 含量 3.10% の飼料 (通常飼料) を自由に摂取させ、試験鶏には午後 7:00 (消灯直前) に低 Ca (1.00%) 含量飼料に、正午に高 Ca (4.82%) 含量飼料にそれぞれ切り替え、自由摂取させた。なお、試験鶏における飼料切り替え時期は、予備実験の結果から、試験鶏に低 Ca 含量飼料を 45%、高 Ca 含量飼料を 55% の割合で摂取させると対照鶏における 1 日の Ca 摂取量と同じになるという算定結果に従って設定した。飲水については、対照鶏と試験鶏共に自由摂取させた。尚、試験に用いた飼料の配合率と成分を表 1 に示した。

試験期間は 4 週間とし、この期間中における生存率、産卵率、卵重、飼料摂取量、飼料要求率と共に、Ca 摂取量を算定した。また、試験開始時と試験終了時において、午前 8:00 と午前 9:00 に個体毎に産卵を記録することにより午前 8:00~9:00 の間に産卵したことを確認し、その翌日に産卵したニワトリから無作為に 50 個の卵を採取して卵殻強度、卵殻重量、卵殻厚と卵殻中の Ca と Mg 含量の測定を行った。

4 週間飼育後、排卵周期中 (3 時間毎) の 9 時期に、1 時期に対照鶏と試験鶏それぞれ 8 羽ずつにおいて、翼下静脈よりヘパリン溶液で湿らせておいた注射筒を用い血液を採取した。試料を採取した排卵周期中の 9 時期は、クラッチ第 1 排卵以外の排卵が放卵後 30~60 分以内に起こる (Warren and Scott, 1935; Phillips and Warren, 1937) ことから、午前 8:00~9:00 の間に放卵が確認されたニワトリの 1~2 時間後から 3 時間毎に 23~24 時間後までの時期とした。

採取した血液は、後藤ら (2001) の方法と同様に血漿中の Ca イオンを測定した後、残りの血漿を非透過性 Ca の測定時まで -20℃ で保存した。血液採取後、断頭屠殺し開腹後、直ちに、卵殻腺部を摘出し、それぞれの粘膜組織を採取した。粘膜組織は採取後、液体窒素で急速凍結した後、CaBP-D_{28K} mRNA 測定まで -80℃ で保存した。

飼料摂取量、Ca 摂取量および卵殻強度の測定

飼料摂取量は、10 羽を 1 群として、1 週間に 1 度残餌量を測定し、給与量から残餌量を減じた値を給与日数と羽数で除することにより 1 日 1 羽当たりとして求めた。なお、試験鶏における残餌量は高 Ca 含量飼料と低 Ca 含量飼料とで別々に測定した。Ca 摂取量は飼料摂取量に飼料 Ca 含量 (%) を乗じて算定した。

表 1. 3.1%, 1.0% および 4.82% のカルシウムを含む飼料の原料組成（上段）と成分計算値（下段）

Table 1. Composition (upper panel) and calculated ingredient (lower panel) of diets containig 3.1% calcium (Ca), 1.0% Ca and 4.82% Ca

組 成 Compositions	割 合 (%) Percentage (%)		
	3.1% カルシウム飼料 3.1% Ca diet	1.0% カルシウム飼料 1.0% Ca diet	4.82% カルシウム飼料 4.82% Ca diet
とうもろこし Corn	62.8	57.7	57.8
ふすま Wheat bran	4.63	15.0	...
脱脂米糠 Defatted rice bran	...	4.34	2.42
大豆粕 Soybean meal	18.0	14.7	15.9
グルテンミール Gulten meal	0.5	0.5	3.3
魚粉 Fish meal	0.5	0.5	0.5
肉骨粉 Meat born meal	5.7	4.7	5.6
動物質性油脂 Animal fat	1.0	1.0	3.0
炭酸カルシウム Calcium carbonate	6.43	1.13	11.04
食塩 Salt	0.25	0.25	0.25
DL-メチオニン DL-methionine	0.06	0.05	0.04
塩化コリン Choline chloride	...	...	0.02
パプリカ Paprika	0.07	0.07	0.07
ビタミンミネラル混合 Vitamine mineral mix	0.06	0.06	0.06
計 Total	100	100	100
粗蛋白質 Crude protein (%)	17.1	17.1	17.1
粗脂肪 Crude fat (%)	4.38	4.49	6.09
粗繊維 Crude fiber (%)	2.76	3.82	2.35
粗灰分 Crude ash (%)	10.5	5.73	15.05
カルシウム Calcium (%)	3.1	1.0	4.83
リン Phosphorus (%)	0.6	0.75	0.6
代謝エネルギー Metabolic energy (kcal/kg)	2,830	2,830	2,830
リジン Lysine (%)	0.85	0.82	0.80
メチオニン Methionine (%)	0.32	0.31	0.33
シスチン Cystine (%)	0.26	0.26	0.25

卵殻強度は加圧破壊法によって測定した。すなわち、卵殻強度は、市販の卵殻強度計（富士平工業株式会社製）を用い、卵の鋭端部を下に、鈍端部を上にして下部から加圧し、卵殻の亀裂が生じたときの圧力を測定することによって求めた。

血漿カルシウムイオン濃度の測定

血漿 Ca イオン濃度は、血漿を得た後、60 分以内に Ca イオン測定器（Ca イオンアナライザー、CA⁺⁺ 150；（株）常光）で血漿状態のままで測定した。尚、測定の際、流動パラフィンの妨害を避けるため、パスツールピペットで血漿のみを保存チューブに移し換え測定を行った。

血漿無機リン濃度の測定

血漿無機リン濃度は、無機リン測定キット（ピーテス

トワコー；和光純薬工業株式会社）を使用して比色定量法（Taussky and Shorr, 1953）により測定した。すなわち、血漿、標準液、試薬盲検として蒸留水のそれぞれ 0.2 ml に対して、除蛋白液 5.0 ml 加え、室温にて 5 分間静置した。その後、遠心分離（2,500 rpm, 5 分）し、上澄みを採取し、この上澄みに発色試薬 0.5 ml 加え、室温で 10 分間静置し、分光光度計（（株）日立製作所製 U-2000 型ダブルビーム）で波長 750 nm で測定した。

卵殻カルシウムとマグネシウム含量の測定

乳鉢で磨砕した卵殻 1 g をるつぼに入れ、600℃ で 2 時間炭化したものに 6N 塩酸を 10 ml 加え、約 10 分間放置後、蒸留水を加え、6 倍に希釈した。得られた溶液は、1N 塩酸で 500 倍に希釈し、原子吸光分光光度計で卵殻

中 Ca 含量を測定した。マグネシウムの場合も同様に、炭化させた卵殻に 1N 塩酸を 20 ml 加え、約 10 分間放置した。得られた溶液は、蒸留水で 50 倍に希釈し、原子吸光分光光度計で測定した。尚、測定値は卵の卵殻 1 個当りに換算して表した。

卵殻腺部の CaBP-D_{28k} mRNA の測定

CaBP-D_{28k} mRNA 量の測定は、後藤ら (2001) の方法に準拠して、Solution hybridization 法で行なった。

尚、Sense RNA と Antisense RNA の作成は、Komm 博士が作成し、島田博士と家田博士から提供された 560 bp の CaBP-D_{28k} プローブを用いて行った。

統計処理

データの統計処理は分散分析により F 値を検定した後、ダンカンの多重範囲検定法で危険率が 5% 以下になった場合に有意な差があるものとし、2 つの平均値の差の検定は、Student's t-test で行った。

表 2. カルシウム給与時期が生存率、産卵成績及びカルシウム摂取量におよぼす影響

Table 2. Influence of time of calcium intake on viability, egg laying performance and calcium intake

	対照鶏 Control hen	試験鶏 Treatment hen
生存率 (%) Viability (%)	99.6	99.6
産卵率 (%) Egg productin ratio (%)	87.8 ± 0.16 [#]	86.8 ± 1.13
卵重量 (g) Egg weight (g/hen/day)	65.0 ± 0.33	65.9 ± 0.34
日卵量 (g) Egg mass (g/hen/day)	57.1 ± 0.34	57.2 ± 0.97
飼料摂取量 (g/羽/日) Feed intake (g/hen/day)	119.4 ± 1.56	118.1 ± 2.49
飼料要求率 Feed conversion	2.09 ± 0.03	2.07 ± 0.07
カルシウム摂取量 (g/羽/日) Calcium intake (g/hen/day)	3.70 ± 0.05	3.55 ± 0.04

対照鶏には 3.1% カルシウム含有飼料を自由に摂取させ、試験鶏には午前 5 時から午後 0 時までは 1.0% カルシウム含有飼料を、午後 0 時から午後 7 時までは 4.82% カルシウム飼料を給与した。

Control hens were fed 3.1% calcium diet *ad libitum*, while treatment hens were fed 1.0% calcium diet from 5 am to 0 pm and 4.82% calcium diet from 0 pm to 7 am daily.

[#]: 平均値 ± 標準誤差。

[#]: Mean ± SE.

表 3. カルシウム給与時期が卵殻質におよぼす影響

Table 3. Influence of time of calcium intake on egg quality

	処理前 Before treatment		処理後 After treatment	
	対照鶏 Control hen	試験鶏 Treatment hen	対照鶏 Control hen	試験鶏 Treatment hen
卵殻強度 (kg/cm ²) Egg shell intensity (kg/cm ²)	2.95 ± 0.076 ^{#a##}	3.00 ± 0.08 ^a	2.84 ± 0.072 ^a	3.06 ± 0.100 ^a
卵殻重量 (g) Egg shell weight (g)	5.60 ± 0.065 ^{ab}	5.73 ± 0.069 ^{bc}	5.42 ± 0.065 ^a	5.57 ± 0.082 ^{ab}
卵殻厚 (mm) Egg shell thickness (mm)	0.35 ± 0.003 ^{ab}	0.36 ± 0.004 ^{bc}	0.35 ± 0.003 ^a	0.36 ± 0.005 ^{ab}

対照鶏には 3.1% カルシウム含有飼料を自由に摂取させ、試験鶏には午前 5 時から午後 0 時までは 1.0% カルシウム含有飼料を、午後 0 時から午後 7 時までは 4.82% カルシウム飼料を給与した。

Control hens were fed 3.1% calcium diet *ad libitum*, while treatment hens were fed 1.0% calcium diet from 5 am to 0 pm and 4.82% calcium diet from 0 pm to 7 am daily.

[#]: 平均値 ± 標準誤差。

[#]: Mean ± SE.

^{##}: 同じライン上の異符号間で 5% 水準の危険率で有意差あり。

^{##}: Means with superscripts in the same line are significantly different (P < 0.05).

表 4. カルシウム給与時期が卵殻におけるカルシウム含量とマグネシウム含量におよぼす影響

Table 4. Influence of time of calcium intake on contents of calcium and magnesium in egg shell

	処理前 Before treatment		処理後 After treatment	
	対照鶏 Control hen	試験鶏 Treatment hen	対照鶏 Control hen	試験鶏 Treatment hen
カルシウム含量 (mg) Calcium content (mg)	2,169±29.20 ^{*c##}	2,119±29.67 ^{bc}	2,004±22.20 ^a	2,085±30.69 ^b
カルシウム割合 (%) Percent of calcium	38.7±0.28 ^b	37.0±0.38 ^a	37.0±0.25 ^a	37.5±0.24 ^a
マグネシウム含量 (mg) Magnesium content (mg)	17.8±0.32 ^a	18.7±0.38 ^a	21.0±0.43 ^b	23.1±0.47 ^c
マグネシウム割合 (%) Percent of magnesium	0.317±0.004 ^a	0.327±0.005 ^a	0.388±0.006 ^b	0.416±0.007 ^c

対照鶏には3.1%カルシウム含有飼料を自由に摂取させ、試験鶏には午前5時から午後0時までは1.0%カルシウム含有飼料を、午後0時から午後7時までは4.82%カルシウム飼料を給与した。

Control hens were fed 3.1% calcium diet *ad libitum*, while treatment hens were fed 1.0% calcium diet from 5 am to 0 pm and 4.82% calcium diet from 0 pm to 7 am daily.

*: 平均値±標準誤差.

Mean±SE.

##: 同じライン上の異符号間で5%水準の危険率で有意差あり.

Means with superscripts in the same line are significantly different ($P < 0.05$).

結 果

生存率、産卵率、卵重、飼料摂取量、飼料要求率およびCa摂取量は、いずれについても対照鶏と試験鶏との間で有意な差は認められなかった ($P > 0.05$) (表2)。

試験開始時と試験終了時において、無作為に採取したそれぞれ50個の卵について種々の卵殻質を測定したところ、卵殻重量と卵殻厚は、対照鶏と試験鶏との間に有意な差は認められなかった ($p > 0.05$)。しかし、卵殻強度においては、対照鶏では試験終了時には試験開始時に比べて低下する傾向がみられたが、試験鶏では低下する傾向はみられず、試験終了時では対照鶏より試験鶏の方が高い傾向を示した (表3)。さらに、卵1個当たりの卵殻中におけるCa含量は、対照鶏では試験開始時に比べ試験終了時に有意な減少が認められたが ($P < 0.05$)、試験鶏では有意な減少は認められず、結果として試験終了時においては対照鶏に比べて試験鶏の方が有意に高い値であった ($P < 0.05$) (表4)。また、卵1個当たりのマグネシウム含量は、対照鶏と試験鶏のいずれの場合においても、試験開始時に比べ試験終了時に有意に増加し、しかも試験終了時では試験鶏の方が対照鶏に比べ有意に多かった ($P < 0.05$) (表4)。

試験開始4週間後に、対照鶏と試験鶏において3時間間隔で、排卵周期中における血漿中Caイオン濃度と無機リン濃度および卵殻腺部におけるCaBP-D_{28K} mRNA

濃度を測定したところ、図1に示されるように、Caイオン濃度は、対照鶏において、排卵1～2時間後から排卵7～8時間後までは、1.20～1.26 mMと排卵周期中では比較的高い濃度で維持され、その後排卵7～8時間後から排卵10～11時間後にかけて0.98 mMまで約20%有意に減少した ($P < 0.05$) 後、排卵13～14時間後にかけて1.09 mMまで有意に増加し ($P < 0.05$)、約1.0 mMで次の排卵時まで維持された。これに対し、試験鶏においては、Caイオン濃度の排卵周期中の変動の様相は対照鶏の場合と同様な様相であったが、高Ca含有飼料に切り替わって1時間後と4時間後である排卵4～5時間後と排卵7～8時間後において、対照鶏のそれらの時期と比べて、有意に低かった ($P < 0.05$)。

血漿中無機リン濃度の変動の様相は対照鶏と試験鶏との間で大きな違いは見出されなかったが、対照鶏では排卵16～17時間後にピークが見出されたのに対して、試験鶏では排卵13～14時間後に認められた。

卵殻腺部におけるCaBP-D_{28K} mRNA濃度は、排卵周期中における変動の様相は対照鶏と試験鶏の間で大きな相違は見出されなかったが、卵殻形成期と見なされる排卵13～20時間において対照鶏に比べて試験鶏の方が有意に高い値を示した ($P < 0.05$)。

考 察

破卵による経済損失を防ぐため、卵殻質の向上を目指

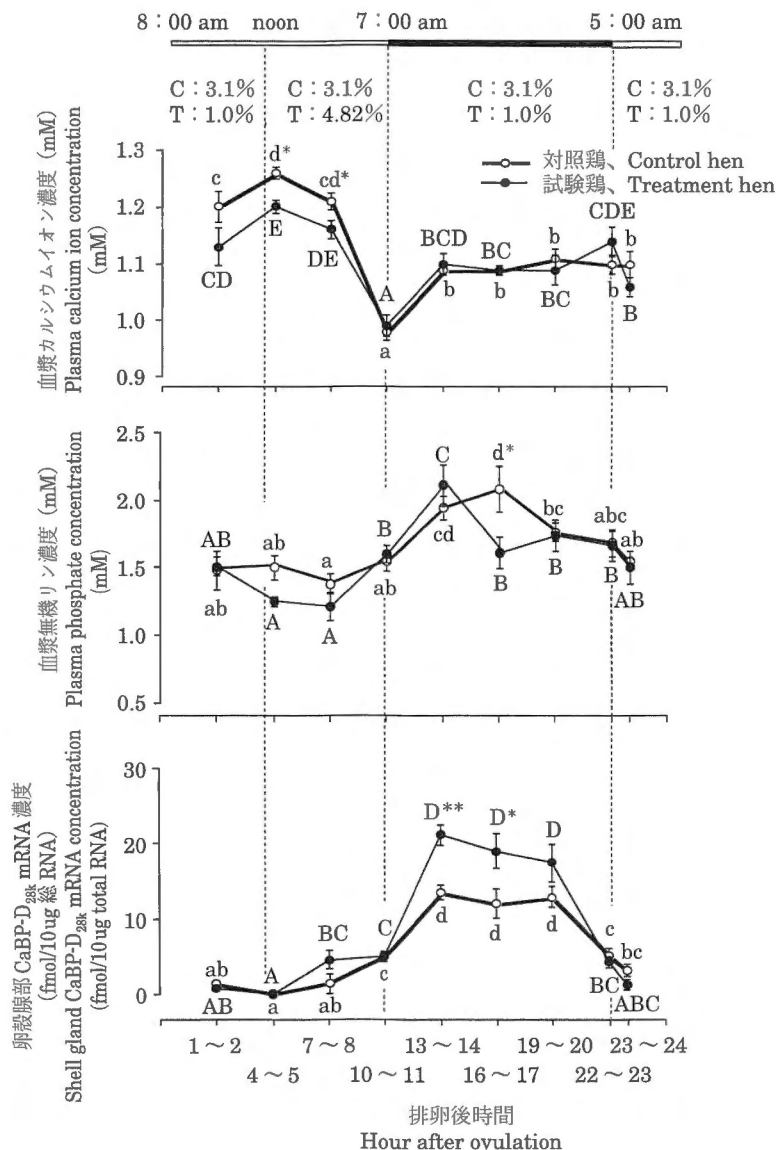


図 1. カルシウム給与時期が産卵周期中における血漿カルシウムイオンと無機リン濃度および卵殻腺部における CaBP-D_{28k} mRNA 濃度におよぼす影響

Fig. 1. Influence of time of calcium intake on plasma concentrations of calcium and phosphate, and shell gland concentration of CaBP-D_{28k} mRNA during the ovulatory cycle

対照鶏には 3.1% カルシウム含有飼料を自由に摂取させ、試験鶏には午前 5 時から午後 0 時までは 1.0% カルシウム含有飼料を、午後 0 時から午後 7 時までは 4.82% カルシウム飼料を給与した。Control hens were fed 3.1% calcium diet *ad libitum*, while treatment hens were fed 1.0% calcium diet from 5 am to 0 pm and 4.82% calcium diet from 0 pm to 7 am daily.

: 平均値 ± 標準誤差。

: Mean ± SE.

: 同じライン上の異符号間で 5% 水準の危険率で有意差あり。

: Means with superscripts in the same line are significantly different ($P < 0.05$).

★ : 対照鶏に対して 5% 水準で有意差あり (t-検定)。 $P < 0.05$ versus control hen.

★★ : 対照鶏に対して 1% 水準で有意差あり (t-検定)。 $P < 0.01$ versus control hen.

して様々な試みが検討されているが、卵殻形成がまだ行われていない午前には低 Ca 含量飼料を、卵殻形成が行われている午後には高 Ca 含量飼料を給与することで、卵殻質が向上することが報告（後藤ら、未発表）されている。そこで、本実験では、Ca 給与時期が卵殻強度、血中 Ca 濃度、血中無機リン濃度、卵殻における Ca 含量及び卵殻腺部における CaBP-D_{28K} mRNA レベルに与える影響を検討することで、Ca 給与時期が卵殻形成におよぼす効果を明らかにしようとした。

本実験では、低 Ca 飼料を午前 5:00～正午の時期に、高 Ca 飼料を正午～午後 7:00 に給与することにし、対照鶏には Ca 含量 3.10% の通常飼料を自由に給与し、それぞれ水と共に自由摂取させ、4 週間飼育した。

その結果、血漿 Ca イオン濃度は、低 Ca 飼料が与えられている午前と高 Ca 飼料に切り替えた初期の時期において、試験鶏の方が対照鶏に比較して約 10% 低い Ca イオン濃度を示した。これらのことから、低 Ca 飼料の給与は、血中の Ca イオン濃度を減少させることが推察される。また、血漿無機リン濃度については、対照鶏と試験鶏の間で変動の様相に有意な相違は認められなかったが、対照鶏に比べて試験鶏ではピーク濃度の出現時期が早期に現れた。ニワトリにおいては、血漿中の無機リン濃度が卵殻形成時に増加することが報告されており（Mongin and Sauveur, 1979; Frost *et al.*, 1991; Ruschkowski and Hart, 1992; Ruschkowski *et al.*, 1993）、その理由として、卵殻形成により消費された Ca を補うため、骨中の Ca が血中に移行するため、リンも同時に移行するものと考えられている（Mongin and Sauveur, 1979）。これらのことから、試験鶏において、午前に低 Ca 飼料を給与することで血漿中 Ca イオン濃度が低下したため、骨からの Ca 溶出つまり骨吸収が早期に行われたが、血漿無機リン濃度の変動は対照鶏とほぼ同じ様相であったことから、骨からの Ca 溶出の割合は対照鶏と大きな差異はないと推察される。また、卵殻形成が盛んに行われている時期には高 Ca 飼料が与えられているにも関わらず、血漿 Ca イオン濃度が対照鶏に比べて高い値を示さなかったことは、試験鶏において高 Ca 飼料として給与した Ca が卵殻形成に有効に利用されていることを示唆している。

一方、卵殻中の Ca と Mg 含量は、対照鶏では試験開始時に比べて、試験終了時には有意に減少しているのに対し、試験鶏では有意な減少は認められず、試験終了時においては試験鶏の方が有意に多かった。従って、卵殻形成時における高 Ca 飼料の給与は、卵殻中の Ca 含量を増加させることを示している。また、Mg は、Ca と同様に卵殻腺部を介して卵殻に移行し（Solomon, 1971;

Waddell *et al.*, 1991）、卵殻形成に伴い、Ca と同様に卵殻への沈着が増加することが知られている（Brooks and Hale, 1955; Itoh and Hatano, 1964; Waddell *et al.*, 1989）。従って、本試験結果において、試験鶏で認められた卵殻中の Mg 含量の増加は、卵殻中 Ca 含量の増加に連動したものであろう。

そこで、卵殻形成が行われている卵殻腺部の CaBP-D_{28K} mRNA レベルにも、Ca 給与時期が何らかの影響を与えているのではないかと推察し、CaBP-D_{28K} mRNA 濃度を Solution hybridization 法を用いて測定した結果、対照鶏に比べて、試験鶏では、排卵後 13～20 時間で有意に高い値を示した。この時期は、排卵された卵は卵殻腺部に到達しており、卵殻に Ca が沈着し、卵殻形成を行っている時期でもある。つまり、午前に Ca 含量 1.00% の低 Ca 飼料、午後に Ca 含量 4.82% の高 Ca 飼料を給与することで、卵殻形成時期において CaBP-D_{28K} mRNA レベルが有意に高い値を示すことが認められた。Ieda ら（1999）は、低 Ca 飼料（0.5% カルシウム含有飼料）を給与することにより血中の総 Ca 濃度が減少し、卵殻質が低下するが卵殻腺部の CaBP-D_{28K} mRNA は有意な変動がなかったことから、低 Ca 飼料の給与は、卵殻腺部の CaBP-D_{28K} mRNA には影響を及ぼさないことを報告している。本試験結果においても、低 Ca 含有飼料を給与した午前においては、CaBP-D_{28K} mRNA 濃度の差はなく、Ieda ら（1999）の報告を裏付ける結果であった。これに対して、高 Ca 飼料を給与した午後では、対照鶏に比べて試験鶏の方が有意に卵殻腺部の CaBP-D_{28K} mRNA が増加したことから、高 Ca 飼料は、卵殻腺部の CaBP-D_{28K} mRNA を増加させることが示唆された。

以上のように、午前に Ca 含有 1.00% の低 Ca 飼料を、午後に Ca 含有 4.82% の高 Ca 飼料を給与することで、生存率、産卵率、卵重、飼料摂取量、飼料要求率に影響を与えず、卵殻強度の増加傾向、卵殻中の Ca 含量の有意な増加、さらに卵殻形成時期における卵殻腺部の CaBP-D_{28K} mRNA レベルの有意な増加がみられることから、午後に高 Ca 飼料を給与することにより卵殻腺部における CaBP-D_{28K} mRNA の増加を介して、卵殻への Ca 沈着量が増加し、卵殻質が向上する可能性が示唆された。

謝 辞

実験遂行にあたり懇意なる御指導を賜り、CaBP-D_{28K} cDNA をご提供頂いた名古屋大学農学部教授島田清司博士および家田照子博士に深く感謝の意を表します。また、終始実験に協力戴いた日本配合飼料株式会社中央研

究所・飼料畜産開発センター所員一同に感謝いたします。

引用文献

- Bar A and Hurwitz S. Uterine calcium-binding protein in laying fowl. *Comparative Biochemistry and Physiology*, A 45 : 576-586. 1973.
- Bar A, Striem S, Mayel-Afshar S and Lawson DEM. Differential regulation of calbindin-D_{28K} mRNA in the intestine and eggshell gland of the laying hen. *Journal of Molecular Endocrinology*, 4 : 93-99. 1990.
- Bar A, Striem S, Vax E, Talpaz H and Hurwitz S. Regulation of calbindin mRNA and calbindin turnover in intestine and shell gland of the chicken. *American Journal of Physiology*, 262 : R800-R805. 1992.
- Bootwalla SM, Harms RH and Wilson HR. Effect of feeding time and supplementation with calcium/phosphorus pellets on the performance of broiler breeders. *Poultry Science*, 61 : 1421. 1982.
- Brooks J and Hale HP. Strength of the shell of the hen's egg. *Nature (London)*, 175 : 848-849. 1955.
- Cason JA and Britton WM. Egg shell quality following short-term feed deprivation. *Poultry Science*, 60 : 1636. 1981.
- Common RH. Observations on the metabolism of poullets III. *Journal of Agricultural Science*, 28 : 347-347. 1938.
- Corradino RA, Wasserman RH, Publos MH and Chang SI. Vitamin D₃ induction of calcium binding protein in the uterus of the laying hen. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125 : 375-380. 1968.
- Duckworth J and Hill R. Storage of elements in the skeleton. *Nutrition Abstract Reverse*, 23 : 1-1. 1953.
- Frost TJ, Roland DAS and Marple DN. The effects of various dietary phosphorus levels on the circadian patterns of plasma 1,25-dihydroxycholecalciferol, total calcium, ionized calcium, and phosphorus in laying hens. *Poultry Science*, 70 : 1564-1570. 1991.
- 後藤尚也・高橋大三・田上雅之・亀岡絵都子・山村奈美子・武石 勝・上吉道治. 十二指腸と卵管子宮部におけるカルシウム結合蛋白質 (CaBP-D_{28K}) mRNA 発現および血中カルシウム濃度のニワトリ排卵周期中の変動. *東海畜産学会報*, 9. 1-5. 1998.
- 後藤尚也・田上雅之・伊那佐江子・荒川仲代・山村奈美子・武石 勝・上吉道治. ニワトリの卵殻腺部における CaBP-D_{28K} の遺伝子発現に及ぼす性ステロイドホルモンの影響. *日本家禽学会誌*, 2001. (印刷中)
- Hellwig HM, Slagter PJ, Johnson ZB. Potential value of "mornig" and "afternoon" feeds for laying hens. *Poultry Science*, 61 : 1381. 1982.
- Ieda T, Saito N, Ono T and Shimada K. Effects of presence of an egg and calcium deposition in the shell gland on levels messenger ribonucleic acid of CaBP-D_{28K} and of vitamin D₃ receptor in the shell gland of the laying hen. *General and Comparative Endocrinology* 99 : 145-151. 1995.
- Ieda T, Saito N and Shimada K. Effect of low calcium diet on messenger ribonucleic acid levels of calbindin-D_{28K} of intestine and shell gland in laying hens in relation to egg shell quality. *Japanese Poultry Science*, 36 : 295-303. 1999.
- Itoh H and Hatano T. Variation of magnesium and phosphorus deposition rates during egg shell formation. *Poultry Science*, 43 : 77-80. 1964.
- Lennnards RM and Roland Sr. The influence of time of dietary calcium intake on shell quality. *Poultry Science*, 60 : 2106-2113. 1981.
- Mongin P and Sauveur B. Plasma inorganic phosphorus concentration during egg-shell formation. *British Poultry Science*, 20 : 401-412. 1979.
- Nys Y, Mayel-Afshar, Bouillon R, Van Baelen H and Lawson DEM. Increases in calbindinD_{28K} mRNA in the uterus of the domestic fowl induced by sexual maturity and shell formation. *General and Comparative Endocrinology*, 76 : 322-329. 1989.
- Nys Y, Baker K, Bouillon R, Van Baelen H, and Lawson DEM. Regulation of calbindin D_{28K} and its mRNA in the intestine of the domestic hen. *General and Comparative Endocrinology*, 86 : 460-468. 1992.
- Phillips RE and Warren DC. Observations concerning the mechanics of ovulation in the fowl. *Journal of Experimental Zoology*, 76 : 117-136. 1937.
- Roland DA and Farmer M. Egg shell Quality. *World's Poultry Science Journal*, 40 : 255-260. 1984.
- Ruschkowski SR and Hart LE. Ionic and endocrine characteristics of reproductive failure in calcium-deficient and vitamin D-deficient laying hens. *Poultry Science*, 71 : 1772-1732. 1992.
- Ruschkowski SR, Robinson FE, Cheng KM and Hart LE. Comparison of two multiple blood sampling regimens using an inwelling vascular access device for investigations of the hen's ovulatory cycle and calcium metabolism. *Poultry Science*, 72 : 172-184. 1993.
- Simkiss, K. Calcium and avian reproduction. *Symposia of Zoological Society of London*, No. 35 : 305-337. 1975.
- Solomon SE. Fluctuations in total calcium and magnesium in the plasma and uterine fluid of the domestic fowl. *British Poultry Science*, 12 : 165-167. 1971.
- Striem S and Bar A. Modulation of quail intestinal and egg shell gland calbindin(Mr 28000) gene expression by vitamin D₃, 1,25-dihydroxyvitamin D₃

- and egg laying. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 73 : 169-177. 1991.
- Taylor TG and Stringer DA. Eggshell formation and skeletal metabolism. In "Avian Physiology". (Sturkie PD ed). 2nd edition, pp. 485-514. 1965. Cornell University Press, New York.
- Taussky HH and Shorr E. A microcolorimetric method for the determination of Inorganic phosphorus. *Journal of Biological Chemistry* 202 : 675-685. 1953.
- Waddell AL, Board RG, Scott VD and Tullet SG. Role of magnesium in egg shell formation in the domestic hen. *British Poultry Science*, 32 : 853-864. 1991.
- Waddell AL, Board RG, Scott VD and Tullet SG. Influence of dietary magnesium content on laying performance and egg shell magnesium content in the domestic hen. *British Poultry Science*, 30 : 865-876. 1989.
- Warren DC and Scott HM. Ovulation in the domestic fowl. *Poultry Science*, 14 : 195-207. 1935.

Influence of Time of Calcium Intake on Plasma Concentrations of Calcium and Shell Gland Concentration of CaBP-D_{28K}mRNA

Hisaya Goto¹⁾, Masayuki Tagami¹⁾, Mihoko Aruga²⁾,
Tomohiro Takama²⁾, Masaru Takeishi¹⁾,
Namiko Yamamura²⁾ and Michiharu Kamiyoshi²⁾

¹⁾ Laboratory of Nippon Formula Feed Mfg. Co., Ltd. Tohigi 321-3621

²⁾ The United Graduate School of Agricultural Science, Gifu University, Gifu 501-1193

The purpose of the study was to clarify effects of the time of calcium (Ca) supplementation on eggshell formation. Chickens used in the experiment were White Leghorns egg-laying hens aged 45 weeks. Control hens were given a normal-Ca feed containing 3.1% Ca, while test hens were given a low-Ca feed containing 1.0% Ca in the morning and a high-Ca feed containing 4.82% Ca in the afternoon. The hens were housed for 4 weeks. The survival rate, the laying rate, the egg weight, the feed consumption, the feed conversion and the Ca consumption were measured during the study period. The plasma Ca ion and inorganic phosphorus concentrations, and the CaBP-D_{28K} mRNA concentrations in the shell gland were analyzed every 3 hours during the ovulatory cycle at the study completion. Hardness and Ca content of the shell were measured in 50 eggs optionally collected at the study initiation and completion. The time difference of Ca supplementation did not affect the survival rate, the laying rate, the egg weight, the feed consumption, the feed conversion and the Ca consumption. The plasma Ca ion concentrations in the morning and early afternoon were significantly lower in the test hens compared with the control hens. A peak of the plasma inorganic phosphorus concentrations appeared earlier in the test hens than the control. The hardness of the shell in the control hens tended to decrease between the study initiation and completion, but that in the test hens did not. The Ca content of the shell in the control hens significantly decreased between the study initiation and completion, but that in the test hens did not. The Ca content of the eggshell at the study completion was significantly more in the test hens than the control. The CaBP-D_{28K} mRNA concentrations in the shell gland 13 to 20 hours after ovulation were significantly higher in the test hens than the control. These results that demonstrated the Ca supplementation regimen increased Ca deposition in shell due to raising CaBP-D_{28K} mRNA levels in the shell gland, and would subsequently improve egg shell quality.

(Japanese Poultry Science, 39 : J1-J10, 2002)

Key word: calciuim-binding protein, gene expression, calcium, egg shell quality, chicken