

《総 説》

卵殻形成との関連におけるカルシウム結合蛋白質 (CaBP-D_{28K}) 遺伝子発現

後 藤 尚 也

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

キーワード: 卵殻, カルシウム結合蛋白質, 遺伝子発現, カルシウムイオン, 性ステロイドホルモン

はじめに

鶏卵は、我々の食生活の貴重な動物性蛋白源であり、蛋白食品群の中でも極めて栄養価が高い上にミネラル、ビタミン等の栄養素もバランスよく含まれた消化吸収のよい食品であり、日本の食生活の中で重要な地位を占めている。すなわち、平成12年度における年間1人当たりの鶏卵消費量は、17.0 kg であり、昭和40年度の約1.5倍となっている（農林水産省「食料需給表」）。このような消費拡大には、所得の向上に加え、養鶏産業の生産性の飛躍的な向上により鶏卵の小売価格が安定的に推移し、安価で良質の蛋白質食品としての評価が定着していることが大きく寄与している。日本は、世界有数の鶏卵消費国であり、年間約250万トンが生産され、鶏卵の年間粗生産額は、平成10年の場合で3,858億円にもものぼる（平成12年養鶏問題懇談会調べ）。

養鶏場において生産された鶏卵は、末端消費者に至る過程において種々の要因により破卵が発生し、平均5~6%、多い場合では、10%以上発生することも少なくなく産業上の損失は大きい。国内において破卵による損失の発生状況を調査した報告は見当たらないが、全米において破卵による損失を8,100万羽を対象に農場における生産段階から鶏卵が販売されるまでに生じる破卵の発生割合を調査し、破卵による損失をRoland (1988) は試算している。その報告では、農場での集卵可能な破卵と無殻卵の合計は1.6%であり、集卵できない鶏卵の割合は6.1%に達している。さらに、鶏卵処理場における破卵は1.16%、処理場で発生した破卵は4%、加えて破卵の正常卵への処理場における混入が5%、輸送や店頭における

不適切な取り扱いにより2%の破卵が発生し、生産から販売過程における破卵の合計は19.86%に達するとしている。破卵の程度の差により損失金額は異なるので、損失金額を1ダース当たり18.4~87.8円として、全米における2億4,000万羽のニワトリに適用した結果、年間の破卵による損失金額は621億2,700万円と試算されている。鶏種能力、飼育環境、飼料、環境等が日本と異なることが予想されるため、直接的な比較はできないが、同一比率で破卵が発生すると仮定した場合、日本におけるニワトリの飼養羽数は全米の半分程度であることから、破卵による損失は年間約300億円以上と見込まれる。これらの破卵による経済的損失を少なくするために数多くの研究が行われているが十分な解決策がないのが現状である。そこで、本稿では、卵殻質改善による産業上の経済的な収益向上を目的とし、卵殻形成に関連したカルシウム結合蛋白質 (CaBP; calcium binding protein) の関与について概説した。

1. 卵の形成と卵殻

卵生の鳥類は、哺乳類とは違った卵管の構造を持っており、卵形成の機能面から漏斗部 (infundibulum)、膨大部 (magnum)、狭部 (isthmus)、卵殻腺部 (shell gland)、膣部 (vagina) の5つの部位に分かれている。それぞれの機能は次の様である。まず排卵された卵は漏斗部に入る。漏斗部は受精が行われる部位で、次に膨大部において卵白が付着される。そして狭部において内外2層の卵殻膜が形成され、卵殻腺部で卵殻が形成されて、最後に膣部から卵が放卵される。これらの過程において、卵が漏斗部に入って膣部から放卵されるまでの時間は24~27時間であり、それぞれの部位の滞留時間は、漏斗部が約18分、膨大部が約3時間、狭部が約1時間15分、卵殻腺部が19~22時間と卵殻腺部が滞留時間のほとんどを占めている (Warren and Scott, 1935)。

卵殻は、95%以上が炭酸カルシウム (CaCO₃) からできており、血中のカルシウム (Ca) が卵殻腺部で炭酸Caとなって沈着することによってできる。炭酸Caの沈着

2004年4月28日受付, 2004年5月14日受理
〒321-3621 栃木県芳賀郡茂木町字天子 451 日本配合飼料株式会社中央研究所
Tel: 0285-63-1121
Fax: 0285-63-1120
E-mail: hisaya.goto@nippai.co.jp

は、卵が卵殻腺部に入ってから最初の3~5時間は緩やかに沈着し、その後活発になり、22時間後に終わりに近づく (Eastin and Spaziani, 1978)。

卵殻は、乳頭突起層 (mamillary layer)、卵殻の厚さの3/4を占めるスポンジ層 (palisade layer)、クチクラ層 (cuticle) の3層からなっている。卵殻の表面には、多数の小さい気孔があって、スポンジ層を通して乳頭突起層間の空間に通じている。この孔は呼吸孔で、卵の胚の呼吸に必要な酸素を供給し、内部に発生したCO₂を排出し、同時に水分の調整も行う。気孔の総数は、約6,000~8,000個で、卵殻の全体にわたって均一に分布しているのではなく、鋭端部は最も少なく、鈍端部では最も多くなっている。

産卵鶏の生体内における全Ca量は20~30g (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Ca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)。ニワトリでは1個の卵を産むのに約2g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髄骨 (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)。卵殻形成は、飼料から摂取したCaと骨髄骨から供給されるCaによって行われる (Driggers and Comar, 1949) が、卵殻形成のために消費されるCa源は大部分 (60~75%) が飼料であって、それ以外は一旦骨髄骨 (medullary bone) に貯蔵されてから血中に放出される。卵生のニワトリの全血中のCaは、20~30mgであり、卵1個を形成するのに約2gのCaが必要である。卵殻形成時には、Caは約100~150mg/hの割合で卵殻腺部から分泌され (Schraer and Schrear, 1971)、大量のCaが消費されるため十二指腸からのCa吸収と骨代謝によるCa供給が必要となる。さもなければ8~18分で血中のCaは消費されてしまうこととなる。

2. Caの給与時期と卵殻質

卵殻へのCaの沈着を増加させることは、卵殻を強化し、破卵による経済的損失を防止する上で重要であると考えられる。卵殻へのCaは、飼料から供給されることから飼料中のCaを効率的に利用させる方法を検討したChah (1971) は、エネルギー、蛋白質、Caを産卵鶏に選

択的に摂取できるように給与した場合、エネルギーと蛋白質摂取量は排卵後卵白の形成が行われる午前11時以降と午後6時から消灯までにかけて増加する2相性のピークがあること、およびCa摂取量は卵殻形成が行われる午後2時以降急激に増加することを見出し、卵殻形成にCaと蛋白質およびエネルギーの給与に適する時期があることを報告した。また、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、午後には給与した場合は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3g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)、午前には低Ca飼料、午後には高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) から、午後には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。さらに、生産農場において6万羽のニワトリを供試した実用面での検討結果においても、午前には低Ca飼料、午後には高Ca飼料を給与することにより1日内のCa摂取量を同一としても卵殻質が改善され破卵率が減少し、3万羽規模の鶏群で1日約1.7万円の収益性が向上することが示されている (後藤ら, 2002d)。

3. 血中Ca濃度

血中におけるCaは、蛋白質と結合した蛋白結合Ca、イオン化したCaイオンおよび無機物と化合物を形成したCa化合物として存在しているが、大部分は蛋白結合CaとCaイオンであり、これらで血中全Caの98%近くを占めている (Copp *et al.*, 1969)。卵殻にCaが蓄積することから、卵殻へのCa蓄積との関連で、血中における総Ca濃度 (Hodges, 1969; Luck and Scanes, 1979; Parson and Combs, 1981; Nys *et al.*, 1986a; Kolling *et al.*, 1992)、非透過性Ca濃度 (Paul and Snetsinger, 1969; Mueller *et al.*, 1973; Nys *et al.*, 1986b; 後藤ら, 2002c) およびCaイオン濃度 (Luck and Scanes, 1979; Parson and Combs, 1981; Nys *et al.*, 1986a; Singh *et al.*, 1986; 後藤ら, 2002a, c) の変動の様相が報告されている。

ニワトリにおいては卵殻形成のために十二指腸でのCa吸収や骨代謝によって血中のCa濃度を維持しているが、哺乳類においても血中Ca濃度が一定の範囲を超

えるとそれだけでテタニーやてんかんのような重要な障害が起こるので、常に血中の Ca 濃度を一定に保つ必要がある。その重要な役割を果たしているのが主に副甲状腺から分泌される副甲状腺ホルモン (parathyroid hormone ; PTH), 鳥類においては鰓後腺 (uitimobranchial gland), 哺乳類では甲状腺の C 細胞から分泌されるカルシトニン (calcitonin ; CT), 腎臓で最終的に活性化される活性化ビタミン D の $1\alpha, 25$ dehydroxyvitamin D₃ ($1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$) であり, それらのホルモンによる Ca 調節の概略は次のようである。

すなわち, 血中の Ca 濃度が低下すると, 副甲状腺から PTH が分泌され, 骨に作用して骨吸収を促進し, Ca やリンを溶出させる。一方で, PTH は腎臓においては遠位尿細管で Ca の再吸収を促進すると同時に不活性型の 25-hydroxyvitamin D₃ ($25(\text{OH})\text{D}_3$) を 1α -hydroxylase (1α -水酸化酵素) によって活性型の $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ に代謝し, これが腸管での Ca 吸収を促進する。この結果, 血中 Ca 濃度が上昇する。逆に, 血中の Ca 濃度が上昇すると, CT が分泌され, 破骨細胞に直接作用して, 骨吸収を抑制して, 血中 Ca を低下させる (Simkiss, 1975)。

4. Ca 結合蛋白質

Wasserman と Taylor (1963) がビタミン D₃ を給与したヒナにおいて, 腸管上澄液中に Ca と結合する物質があると報告し, その物質が蛋白質であると最初に報告したのは Wasserman と Taylor (1966) である。飼料からの Ca は主に小腸から吸収されるが, 小腸での Ca 吸収能は十二指腸, 空腸, 回腸の順で低くなり, この順位と同じ様な関係で, Ca 結合蛋白質 (CaBP ; calcium binding protein) 濃度が低くなる (Taylor and Wasserman, 1967) ことなどから, 小腸における Ca 吸収は CaBP を介していると考えられるようになった。さらに, Wasserman *et al.* (1968) によりニトリヒナの十二指腸粘膜から CaBP が分離, 精製され, その分子量が 28,000 であることが明らかにされた。また, 以前から腸管の Ca 吸収にビタミン D が不可欠であることが知られていたため CaBP の発現に対するビタミン D の関与が多く研究者により研究され, 十二指腸における CaBP の発現が $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ により制御されていることが明らかにされ (Taylor and Wasserman, 1970 ; Corradino, 1984 ; Corradino and Fullmer, 1991 ; Nys *et al.*, 1992 b), CaBP が CaBP-D_{28K} と呼ばれるようになった。

また, 卵殻形成部位である卵管の卵殻腺部においても, 腸管と同じ CaBP が存在し (Corradino *et al.*, 1968), しかもこの蛋白質量と CaBP-D_{28K} mRNA 濃度が卵殻形成との関連で変動する (Nys *et al.*, 1989 ; Striem

and Bar, 1991 ; Bar *et al.*, 1992 ; Ieda *et al.*, 1995) ことから, 卵殻腺部における卵殻への Ca 蓄積においても CaBP-D_{28K} が関与していると考えられている。しかし, 卵殻腺部における CaBP-D_{28K} の発現機構は必ずしも十分に明らかにされていない。

先に述べた様に, 今日では腸管からの Ca 吸収と卵殻腺部における Ca 沈着に CaBP-D_{28K} が関与していることが明らかにされているが, 今日では腸管や卵殻腺部以外にも, 腎臓 (Clemens *et al.*, 1989), 骨 (Christakos and Norman, 1978), 脾臓 (King and Norman, 1986), 小脳 (Taylor and Brindak, 1974), 精巣 (Inpanbutr and Taylor, 1992), 卵黄囊 (Ono and Tuan, 1991) などにおいても CaBP-D_{28K} の存在が報告されている。

一方, 哺乳類においても十二指腸 (Kallfelz *et al.*, 1967), 腎臓 (Pansini and Christakos, 1984), 子宮 (Delorme *et al.*, 1983) などに CaBP が存在していることが明らかにされている。しかし, その分子量は 9 kDa であり, 鳥類で見られる 28 kDa の CaBP とは違う遺伝子上に存在している (Hunziker, 1986)。また腎臓においては 9 kDa の CaBP 以外に 28 kDa の CaBP が存在していることが知られているが, この哺乳類に存在している 28 kDa の CaBP と鳥類に存在している 28 kDa の CaBP とは構造的に異なっている (Clemens *et al.*, 1988)。

分子量 28 kDa の CaBP の構造には, 約 40 のアミノ酸の 6 つの繰り返しが見られる (Hunziker, 1986)。これは E-F ハンドと呼ばれる Ca 結合部位であり, この 6 つの E-F ハンドのうち 2 個は Ca との結合に必須なアミノ酸部分に変異があるため Ca と結合できず, 残りの 4 個が Ca と結合する (Hunziker, 1986)。この E-F ハンド構造はカルモデュリンやトロポニン C のような Ca に対する高い親和性を持っているタンパク質に存在しており, $[\alpha$ -ヘリックス-ループ-ヘリックス] と呼ばれるペプチド構造をとっており, CaBP の Ca に対する結合能は約 10^{-6} M と高い。しかし, CaBP の Ca に結合する能力以外の生理的役割は未だほとんど知られていない。

5. 腸管における発現

今日では, ビタミン D レセプターが腸管細胞の細胞核に存在していることも明らかにされており (Brumbaugh and Haussler, 1975), その制御機構は, $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ が CaBP-D_{28K} の遺伝子の制御部位のビタミン D 反応エレメントに結合することで CaBP-D_{28K} 遺伝子の転写制御をしている (Lowe *et al.*, 1992) という報告からも, $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ が CaBP-D_{28K} 遺伝子に直接作用して CaBP-D_{28K} の遺伝子発現を促していることは疑う余地もない。

十二指腸における Ca 吸収は Ca が腸管腔から血中へ

移行する現象であり、3つのステップに分けて考えることができる。すなわち ① 刷子縁膜 (brush border membrane; BB) を通しての Ca の取り込み ② 刷子縁膜から漿膜側への細胞質内の Ca の移動 ③ 漿膜 (basolateral membrane; BL) を横切り細胞外への Ca の排出である。この十二指腸における Ca の吸収段階の中での CaBP の生理的役割に関して、CaBP が細胞質中に存在していること (Morrissey *et al.*, 1978) から、CaBP は上記の ② の役割を果たしていると考えられている。これに関連して、Stein (1992) らは、細胞膜における Ca 透過性が増し、その結果細胞内に入り込んだ Ca イオンの過剰による弊害を防ぐため CaBP が合成され、過剰な Ca を細胞外に排出させているのではと推察し、CaBP は細胞内 Ca 濃度の緩衝剤として働くのではないかと推察している。また、ビタミン D が欠乏しているニワトリやラットへの $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 投与によって起こる十二指腸での CaBP と CaBP mRNA 濃度の増加は Ca 吸収の増加の少し後に起こることから、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 投与初期における Ca 吸収への CaBP の関与を否定している報告 (Spencer, 1976; Harmeyer and DeLuca, 1969) もある。

一方、①や③の機構においてもまだ明らかになっていないが、刷子縁膜においては Ca の濃度勾配を通して Ca が受動的に取り込まれ、漿膜においては漿膜内に存在している Ca ポンプ ($\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATPase) によるエネルギーに依存した取り込みが行われ、しかもこの取り込みは $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ が関与しているという (Bikle *et al.*, 1983; Chandler *et al.*, 1984)。

十二指腸における CaBP は腸管から栄養素の吸収が行われるようになる孵化 1 日目にすでに認められる (Moriuchi and DeLuca, 1974) が、産卵の開始に先立ち、十二指腸における CaBP 濃度と CaBP-D_{28K} mRNA 濃度が増加すること (Bar and Hurwitz, 1973; Striem and Bar, 1991)、また、血中中性ステロイドホルモンと $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 濃度も増加すること (Castillo *et al.*, 1979)、さらに、未成熟鶏に性ステロイドホルモンを投与すると腎臓中の 1α -hydroxylase 活性が刺激されること (Tanaka *et al.*, 1976, 1978)、および産卵に先立った十二指腸における CaBP の合成は、その時期に増加するエストロゲンとテストステロン (testosterone: T) によって血中の $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 濃度が増加し、それによって十二指腸の CaBP 合成が刺激されるとの報告 (Nys *et al.*, 1992 b) などは、性ステロイドホルモンが性成熟過程における十二指腸での CaBP 合成に関与していることを示している。

6. 卵殻腺部における発現

6-1. ビタミン D

卵殻腺部において十二指腸と同様に CaBP が存在していることを最初に報告したのは Corradino ら (1968) である。その後、卵殻腺部の CaBP が産卵の最初の卵殻形成中に増加すること (Nys *et al.*, 1989; Striem and Bar, 1991; Bar and Hurwitz, 1973)、軟卵鶏や休産鶏の卵殻腺部の CaBP 濃度は正常な産卵鶏より少ないこと (Nys *et al.*, 1992 b, 1989; Bar *et al.*, 1990)、排卵周期中の卵殻腺部における CaBP-D_{28K} mRNA レベルが卵殻形成の行われている時期に増加すること (Ieda *et al.*, 1995; Nys *et al.*, 1992 b, 1989; 後藤ら, 2002a, c) などは、卵殻腺部における CaBP-D_{28K} は卵殻形成に関与していることを示している。

すでに述べたように、十二指腸における CaBP の発現は $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ により制御されていることは明らかであるが、卵殻腺部における CaBP の発現調節機構においては様々な見解がある。

すなわち、産卵鶏にビタミン D を含まない飼料を与えると、産卵の停止まで累進的により薄い殻の卵を産み、同時に卵殻腺部の CaBP 濃度も減少したが、標準の飼料に戻すことで卵殻と CaBP 濃度はもとに戻ったこと (Corradino *et al.*, 1968)、卵殻腺部に $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ に対するレセプターが存在し (Coty, 1980)、性成熟に伴って増加すること (Yoshimura *et al.*, 1997)、排卵周期中における血中 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 濃度が軟卵を産んでいるニワトリでは変動が認められないが正常な卵を産んでいるニワトリでは卵殻形成時にかけて増加すること (Nys *et al.*, 1986 a)、さらに、排卵周期中において卵殻腺部の CaBP-D_{28K} mRNA 濃度とビタミン D レセプター mRNA 濃度がともに卵殻形成時にかけて増加し、次の排卵時にかけて減少したこと (Ieda *et al.*, 1995) などは、十二指腸と同様に卵殻腺部においても $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ によって CaBP 合成が制御されていることを支持している。

一方、産卵の休止中は、卵殻腺部の CaBP 濃度と CaBP-D_{28K} mRNA 濃度は減少するのに対して、血中における $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 濃度と卵殻腺部におけるビタミン D レセプター濃度には変化が認められないこと (Bar *et al.*, 1990)、産卵鶏に $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ を給与すると給与量の増加に伴い十二指腸の CaBP 量は増加するのに対し、卵殻腺部においては変化が認められないこと (Bar *et al.*, 1990)、卵殻形成中において卵殻腺部の CaBP-D_{28K} mRNA は増加するのに対し、血中と卵殻腺部の $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 濃度には変化が認められず、また卵殻の薄い卵と厚い卵を形成するニワトリにおいても卵殻腺部の CaBP 濃度は厚い卵殻を形成しているニワトリの方が高いのにも関わらず、血中と卵殻腺部の $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 濃

度には違いが見られないこと (Bar *et al.*, 1984), 軟卵鶏に $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ を投与しても卵殻腺部の CaBP 濃度は変化しないこと (Nys and Laage, 1984), 卵殻沈着の過程における CaBP-D_{28K} mRNA 濃度の増加が血中の $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ レベルの増加より早く起こる (Castillo *et al.*, 1979) こと, さらにニワトリの卵殻腺部にビタミン D レセプターが存在しているが, そのレベルは十二指腸の 1/6~1/7 であることなどが報告されている。これらの報告から, 卵殻腺部における CaBP-D_{28K} の発現は, $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ が関与するとしてもその関与は少なく, 十二指腸の場合とは異なった機構で制御がなされているのではないかと推察されている。

6-2. 性ステロイドホルモン

すでに腸管において, 性成熟過程における CaBP 合成に性ステロイドホルモンが関与していると述べたが, 卵殻腺部の CaBP 合成についても, 性成熟過程においては, 性ステロイドホルモンが関与するとの報告は多く見られる。

すなわち, 卵殻腺部の CaBP 濃度は性成熟に伴う子宮の成長と共に増加し, 最初の卵殻形成でさらに増加することが見出され (Nys *et al.*, 1989; Bar and Hurwitz, 1973; Striem and Bar, 1991), また, Nys ら (1992a) はビタミン D 欠乏によるくる病ヒナとビタミン D を十分に与えたヒナにエストラジオール-17 β (estradiol-17 β : E2) を投与すると, 何れのヒナにおいても卵殻腺部の CaBP-D_{28K} mRNA 濃度が増加したことから, ヒナの卵殻腺部の CaBP 合成に, E2 が主体的に関与しているのではないかと報告している。さらに, *in vitro* の実験において, Corradino と Alaimo (1995) は, 2週間 E2 を投与して子宮を早熟させたビタミン D 不足のヒナの卵殻腺部の粘膜細胞において, $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 単独添加により CaBP レベルは増加したが, E2 単独添加では CaBP レベルに対する影響は認められず, E2 と $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の両方を同時に添加すると CaBP レベルは増加したこと, また, プロゲステロン (progesterone: P4) 単独では CaBP レベルに影響を与えないが, 同時に $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ を投与すると, $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ による CaBP 濃度の増加を妨げたことから, $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ は卵殻腺部における CaBP 合成を直接刺激し, その $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の作用を E2 と P4 が調節するような作用で E2 と P4 が CaBP 合成に関与していると報告している。その他にも未成熟鶏においては E2 が卵殻腺部の CaBP の合成を刺激しているという報告は多くなされている (Nys *et al.*, 1989; Navickis *et al.*, 1979; Corradino, 1993; Corradino *et al.*, 1993)。

一方, すでに卵を産んでいる産卵鶏においても, 性ス

テロイドホルモンが卵形成に関与することから, 卵殻腺部における CaBP 発現に性ステロイドホルモンが関与するか否かが検討されている。

Ieda ら (1995) は, 性ステロイドホルモンの合成を阻害することが知られている Aminoglutethimide を産卵鶏に投与することにより, 卵殻腺部の CaBP-D_{28K} mRNA 濃度と卵重量に対する卵殻重量の割合が有意に減少したことから, 性ステロイドホルモンが, 卵殻腺部における CaBP-D_{28K} 遺伝子発現を刺激して, 卵殻への Ca 沈着を促すと推察している。これに対して, 排卵周期中における卵殻腺部の CaBP-D_{28K} mRNA 濃度の増加 (Nys *et al.*, 1989; Striem and Bar, 1991; Bar *et al.*, 1992; Ieda *et al.*, 1995) が血中性ステロイドホルモン濃度の増加を伴っていないこと (Jonhson, 1990), 正常の卵を産んでいる産卵鶏に比べ, 軟卵鶏の卵殻腺部の CaBP と CaBP-D_{28K} mRNA 濃度は減少するが, 排卵周期中の血中性ステロイドホルモン濃度の変動の様相は産卵鶏のそれと変わらないこと (Nys *et al.*, 1986b) などから, 性ステロイドホルモンが CaBP-D_{28K} 発現に促進的には関わらないとの推察もなされている。さらに, Bar ら (1996) は産卵鶏にプロゲステロン (P4), テストステロン (T) またはエストラジオール (E2) をそれぞれ投与し, それらが卵殻腺部における CaBP-D_{28K} mRNA 濃度に及ぼす影響を検討しているが, その結果において CaBP-D_{28K} mRNA 濃度は, T と E2 の投与によっては殆ど影響が認められないが, P4 投与により減少し, しかも P4 の投与により卵の卵管内滞留時間が長くなったにも関わらず, 卵殻への Ca 沈着が減少したことから, 産卵鶏の卵殻腺部における CaBP-D_{28K} mRNA の発現に E2 と T はほとんど影響を与えないが, P4 が抑制的な作用で関与していると報告している。

後藤ら (2002b) は, 産卵鶏に毎日, 妊馬血清性腺刺激ホルモン (PMSG) を投与し内因性の性ステロイドホルモンを増加させたところ, 卵殻腺部における CaBP-D_{28K} mRNA 濃度は, PMG 投与 5 日後に減少したこと, さらに, 排卵 10 時間後に E2, T または P4 を投与した結果, 卵殻腺部の CaBP-D_{28K} mRNA 濃度と卵殻腺部に存在する卵の卵殻中 Ca 含量は, E2 と T の投与では影響が認められず, P4 を投与した場合においてのみ減少したことから, 性ステロイドホルモンが産卵鶏の卵殻腺部における CaBP-D_{28K} 遺伝子発現を刺激する可能性は少なく, 寧ろ, P4 により抑制され, 結果として卵殻への Ca 沈着が抑制されることを推察している。

6-3. Ca イオン

卵殻腺部における CaBP-D_{28K} と CaBP-D_{28K} mRNA の発現は, 卵殻形成と共に増加し (Nys *et al.*, 1989;

Striem and Bar, 1991; Bar *et al.*, 1992; Ieda *et al.*, 1995), 人為的に放卵を誘起することにより減少すること (Nys *et al.*, 1992a; Bar *et al.*, 1992; Ieda *et al.*, 1995) から, 卵が卵殻腺部に存在することが CaBP-D_{28K} の遺伝子発現の刺激となっていると考えられている。しかし, 卵の存在だけでは必ずしも CaBP-D_{28K} の遺伝子発現の刺激を説明できないとの報告がある。

すなわち, Eastin と Spaziani (1978) は, 産卵鶏の排卵周期中において, 卵殻腺部において卵殻形成が行われている卵を排除した場合, 卵殻腺部に卵が存在せず, 卵殻形成が行われていない場合において, 卵殻腺部に人工密蠟卵を挿入して卵殻腺部を膨張させたときと人工密蠟卵を挿入しないときにおいて, 卵殻腺部における Ca 分泌状況を比較したところ, どちらの場合においても Ca 分泌は人工密蠟卵により卵殻腺部を膨張させた方が多かったが, クラッチの間の休産日の無排卵日に人工密蠟卵を挿入した場合は, 卵殻腺部を膨張させ刺激したにもかかわらず Ca 分泌に影響が認められなかったことから, 卵殻腺部における Ca 分泌は, 排卵現象と密接に関連し, 卵殻腺部の膨張すなわち卵殻腺部における卵の存在のみでは刺激されないが 1 つの欠かせない因子であるとした。また, Corradino (1993) は *in vitro* の方法で, ニワトリのヒナに 2 週間 E2 を投与し早熟させた卵殻腺部の粘膜細胞に, 小胞体に蓄えられている Ca²⁺ が放出され, 細胞内 Ca²⁺ 濃度を増加させる thapsigargin (THAPS) を添加したところ, 1 α , 25(OH)₂D₃ の不存在下で卵殻腺部の CaBP 濃度が増加したことから Ca²⁺ 自身が CaBP 合成に関与していると推察している。

さらに, 産卵鶏の卵殻形成過程における血中 Ca イオン濃度と卵殻腺部における CaBP-D_{28K} mRNA 濃度の変動との間で, Ca イオン濃度の増加時には CaBP-D_{28K} mRNA 濃度が減少し, 逆に Ca イオン濃度の減少時には CaBP-D_{28K} mRNA 濃度が増加するような様相で, 両濃度の間ではほぼ逆の変動の様相が認められている (後藤ら, 1998, 2002a, c)。

先にも述べた通り, 午前到低 Ca, 午後到高 Ca 含有飼料を給与することにより 1 日内の Ca 摂取量を変えことなく卵殻質が改善されることが示唆されているが, この Ca 給与法による卵殻質の向上が血中 Ca イオン濃度と卵殻腺部における CaBP-D_{28K} mRNA 濃度にかなる影響がもたらされた結果によるかを後藤ら (2002a) は検討している。その結果, 通常飼料を給与した場合に比べ, 血中 Ca イオン濃度は低 Ca 含有飼料を給与した午前は低くなるが, その後高 Ca 飼料に切り替えると卵殻腺部の CaBP-D_{28K} mRNA 濃度は高くなることを見出され, Ca 給与時期の違いにより卵殻腺部における

CaBP-D_{28K} mRNA 濃度が増加することを報告している。

これらのことから, カルシウム恒常性に関与する副甲状腺ホルモンとカルシトニンの場合と同様に, Ca イオンが卵殻腺部における CaBP-D_{28K} の発現を調整しているのかも知れない。しかし, これらの推察にはさらなる研究が必要とされる。

おわりに

鶏卵業界においては, 卵価は, 長引く景気低迷による消費の減少と無秩序な増羽と乱売, さらに, 鳥インフルエンザの発生により, 未曾有の低卵価となっている。鶏肉を含めた低相場傾向は今後も続くことが予想され, 「安全」, 「安心」, 「安価」への取り組みがより重要となっている。

卵殻質の向上は, 破卵率を減少させ収益性を向上させると共に, 「安全」, 「安心」, 「安価」な鶏卵を生産するために必要不可欠な命題である。今後も, 卵殻質改善を中心とした鶏卵の商品化率向上に繋がる研究を実施していきたいと考えている。

謝 辞

本稿を結ぶにあたり, 終始変わらぬご指導を賜りました上吉道治先生, 小野珠乙先生に深厚なる謝意を表します。また, 終始実験に協力戴いた弊社・中央研究所所員に感謝致します。

本稿は, 平成 15 年度日本家禽学会奨励賞受賞課題「卵殻質向上と卵殻腺部におけるカルシウム結合蛋白質 (CaBP-D_{28K}) 遺伝子発現に関する研究」の内容の一部をまとめたものです。学会奨励賞選考委員会および本稿をまとめる機会を与えて下さった編集委員の諸先生方に深謝致します。

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 Endocrinology.* 4 : 93-99. 1990.
- Bar A, Rosenberg J and Hurwitz S. The lack of relationships between vitamin D₃ metabolites and calcium-binding protein in the eggshell gland of laying birds. *Comparative Biochemistry and Physiology.* 78B : 75-79. 1984.
- Bar A, Vax E, Hunziker W, Halevy O and Striem S. The role of gonadal hormones in gene expression

- of calbindin in the laying hen. *General and Comparative Endocrinology*. 103 : 115-122. 1996.
- 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.
- Bikle DD, Munson S and Zolock DT. Calcium flux across chick duodenal brush border membrane vesicles : regulation by 1,25-dihydroxyvitamin D. *Endocrinology*. 113 : 2072-2080. 1983.
- 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 : 1421-1421. 1982.
- Brumbaugh PF and Haussler MR. Specific binding of 1 α ,25-dihydroxycholecalciferol to nuclear components of chick intestine. *Journal of Biological Chemistry*. 250 : 1588-1594. 1975.
- Cason JA and Britton WM. Egg shell quality following short-term feed deprivation. *Poultry Science*. 60 : 1636-1636. 1981.
- Castillo L, Tanaka Y, Wineland MJ, Jowsey JO and DeLuca MF. Production of 1,25-dihydroxyvitaminD₃ and formation of medullary bone in the egg laying hen. *Endocrinology*. 104 : 1598-1601. 1979.
- Chah CC. A study on the hen's nutrient intake as it related to egg formation. M.Sc.thesis. Universtiy of Guelph. 1971. 1971.
- Chandler JS, Meyer SA and Wasserman RH. Effects of 1,25-dihydroxycholecalciferol on the chick intestinal basolateral calcium pump. *Federation Proc*. 43 : 985. 1984.
- Christakos S and Norman AW. Vitamin D₃-induced calcium binding protein in bone tissue. *Science*. 202 : 70-71. 1978.
- Clemens TL, Mcglade SA, Garrett KP, Horiuchi N and Hendy GN. Extracellular calcium modulates vitamin D dependent calbindin D_{28K} gene expression in chick kidney cells. *Endocrinology*. 124 : 1582-1584. 1989.
- Clemens TL, McGlade SA, Garrett KP, Horiuchi N and Hendy GN. Tissue-specific regulation of avian vitamin-D dependent calcium binding protein 28-kDa mRNA by 1,25-Dihydroxyvitamin D₃. *Journal of Biological Chemistry*. 263 : 13112-13116. 1988.
- Common RH. Observations on the metabolism of poullets III. *Journal of Agricultural Science*. 28 : 347-347. 1938.
- Copp DH. Review : Endocrine control of calcium homeostasis. *Journal of Endocrinology*. 43 : 137-161. 1969.
- Corradino RA and Alaimo J. *In vitro* regulation of calbindin D_{28K} mRNA by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and estradiol in precociously-matured egg shell gland from vitaminD₃-depleted chicks. *Hormone & Metabolic Research*. 27 : 39-40. 1995.
- Corradino RA and Fullmer CS. Positive transcriptional regulation of intestinal calbindin-D_{28K} gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and glucocorticoids. *Endocrinology*. 128 : 944-950. 1991.
- Corradino RA. Calbindin D_{28K} regulation in precociously matured chick egg shell gland *in vitro*. *General and Comparative Endocrinology*. 91 : 158-166. 1993.
- Corradino RA. Induction of calcium-binding protein in embryonic chick duodenum *in vitro* : Direct assessment of biopotency of vitamin D-steroids. In "VitaminD : Basic and Clinical Aspects" (Kumar R, Ed.), pp. 325-341. 1984.
- Corradino RA, Smith CA, Krook LP and Fullmer CS. Tissue-specific regulation of shell gland calbindin D_{28K} biosynthesis by estradiol in precociously matured, vitaminD-depleted chicks. *Endocrinology*. 132 : 193-198. 1993.
- Corradino RA, Wasseraman 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.
- Coty WA. A specific, high affinity binding protein for 1 α ,25-dihydroxyvitamin D in the chick oviduct shell gland. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 93 : 285-292. 1980.
- Delorme AC, Danan JL, Acker MG, Ripoche MA and Mathieu H. In rat uterus 17 β estradiol stimulates a calcium-binding protein similar to the duodenal vitaminD-dependent calcium-binding protein. *Endocrinology*. 113 : 1340-1347. 1983.
- Driggers J and Comar C. The secretion of radioactive calcium (Ca⁴⁵) in the hen's egg. *Poultry Science*. 28 : 420-424. 1949.
- Duckworth J and Hill R. Storage of elements in the skelton. *Nutrition Abstract Reverse*. 23 : 1-1. 1953.
- Eastin WC and Spaziani E. On the control of calcium secretion in the avian shell gland. *Biology of Reproduction*. 19 : 493-504. 1978.
- 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・有賀美保子・高間智浩・武石勝・山村奈美子・上吉道治. 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. *日本家禽学会誌*, 39 : J1-J10. 2002 a.
- 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, 39 : J11-J24. 2002 b.
- 後藤尚也・田上雅之・水野雅司・亀岡絵都子・武石勝・山村奈美子・土井 守・上吉道治. 卵殻形成における血漿カルシウム濃度と卵殻腺部のカルシウム結合蛋白質 (CaBP-D_{28K}) mRNA の発現. 日本家禽学会誌, 39 : J25-J40. 2002 c.
- 後藤尚也・江利川智己・高田勝広・田上雅之. 産卵鶏におけるカルシウムの給与時期が生産農場の卵殻質や破卵率に及ぼす影響. 日本家禽学会誌, 39 : J46-J55. 2002 d.
- Harmeyer J and DeLuca HF. Calcium-binding protein and calcium absorption after vitamin D administration. Archives of Biochemistry and Biophysics. 33 : 247-254. 1969.
- Hellwig HM, Slagter PJ and Johnson ZB. Potential value of "morning" and "afternoon" feeds for laying hens. Poultry Science. 61 : 1381-1381. 1982.
- Hodges RD. The structure of the fowl's ultimobranchial gland. Annals of Biological Animal Biochemistry and Biophysics. 10 : 255-275. 1969.
- Hunziker W. The 28-kDa vitamin D-dependent calcium-binding protein has a six-domain structure. Proceedings of the National Academy Sciences USA. 83 : 7578-7582. 1986.
- 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.
- Inpanbutr N, Taylor AN. Expression of calbindin-D28K in developing and growing chick testes. Histochemistry. 97 : 335-339. 1992.
- Johnson AL. Steroidogenesis and actions of steroids in the hen ovary. Critical Reviews in Poultry Biology. 2 : 319-346. 1990.
- Kallfelz FA, Taylor AN and Wasserman RH. Vitamin D-induced calcium binding factor in rat intestinal mucosa. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. 125 : 54-58. 1967.
- King MW and Norman AW. Analysis of the mRNA coding for chick vitamin D-Induced calbindin and its regulation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. Archives of Biochemistry and Biophysics. 248 : 613-619. 1986.
- Kolling K, Hofmeier A and Merckenschlager M. The ionized calcium in the blood of domestic chickens : dependence on the laying cycle. Zentralblatt Veterinarmed. A39 : 115-120. 1992.
- Lennards RM and Roland Sr. The influence of time of dietary calcium intake on shell quality. Poultry Science. 60 : 2106-2113. 1981.
- Lowe KE, Maiyar AC and Norman AW. Vitamin-D-mediated gene expression. Critical reviews in eukaryotic gene expression. 2 : 65-109. 1992.
- Luck MR and Scanes CG. Plasma levels of ionized calcium in the laying hen (*Gallus domesticus*). Comparative Biochemistry and Physiology. Part A : 177-181. 1979.
- Moriuchi S and DeLuca EF. Metabolism of vitamin D₃ in the chick embryo. Archives of Biochemistry and Biophysics. 164 : 165-171. 1974.
- Morrissey RL, Zoelock DT, Bucci TJ and Bikle DD. Immunoperoxidase localization of vitamin D dependent calcium binding protein. Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 26 : 628-634. 1978.
- Mueller WJ, Hall KI, Maurer PA, Joshua JR and Joshua IG. Plasma calcium and inorganic phosphate response to laying hens to parathyroid hormone. Endocrinology. 92 : 853-856. 1973.
- Navickis RJ, Katzenellenbogen BS and Nalbandov AV. Effects of the sex steroid hormones and vitamin D₃ on calcium-binding proteins in the chick shell gland. Biology of Reproduction. 21 : 1153-1162. 1979.
- Nys Y and De Laage X. Effects of suppression of eggshell calcification and of 1, 25(OH)₂D₃ on Mg²⁺, Ca²⁺ and Mg²⁺HCO₃⁻ ATPase, alkaline phosphatase, carbonic anhydrase and CaBP levels-I. The laying hen uterus. Comparative Biochemistry and Physiology. A 78 : 833-838. 1984.
- Nys Y, Baker K and Lawson DEM. Estrogen and calcium flux dependent factor modulate the calbindin gene expression in the uterus of laying hens. General and Comparative Endocrinology. 87 : 87-94. 1992 a.
- Nys Y, Baker K, Bouillon R, Van Baelen H and Lawson DEM. Regulation of calbindin D28K and its mRNA in the intestine of the domestic hen. General and Comparative Endocrinology. 86 : 460-468. 1992 b.
- Nys Y, Mayer-Afshar S, Bouillon R, Van Baelen H and Lawson DEM. Increase in calbindin D_{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, N'Guyen TM, Williams J and Etches RJ. Blood levels of ionized calcium, inorganic phosphorus, 1,25-dihydroxycholecalciferol and gonadal hormones in hens laying hard-shelled or shell-less eggs. Journal of Endocrinology, 111 : 151-157. 1986 a.
- Nys Y, Parkes CO and Thomasset M. Effects of suppression and resumption of shell formation and parathyroid hormone on uterine calcium-binding

- protein, carbonic anhydrase activity and intestinal calcium absorption in hens. *General and Comparative Endocrinology*. 64 : 293-299. 1986 b.
- Ono T and Tuan RS. Vitamin D and chick embryonic yolk calcium mobilization : identification and regulation of expression of vitamin D-dependent Ca²⁺-binding protein, calbindin-D_{28K}, in the yolk sac. *Developmental Biology*. 144 : 167-176. 1991.
- Pansini AR and Christakos S. Vitamin D-dependent calcium-binding protein in rat kidney. Purification and physicochemical and immunological characterization. *Journal of Biological Chemistry*. 259 : 9735-9741. 1984.
- Parson AH and Combs GF Jr. Blood ionized calcium cycles in the chicken. *Poultry Science*. 60 : 1520-1524. 1981.
- Paul HS and Snetsinger DC. Dietary calcium and phosphorus and variations in plasma Alkaline phosphatase activity in relationship to physical characteristics of eggshell. *Poultry Science*. 48 : 241-250. 1969.
- Roland DA. Egg shell problems : Estimates of incidence and economic impact. *Poultry Science*. 67 : 1801-1803. 1988.
- Roland DA and Farmer M. Egg shell Quality. *World's Poultry Science Journal*. 40 : 255-260. 1984.
- Schraer H and Schraer R. Calcium transfer across the avian shell gland. In "Cellular Mechanisms for Calcium Transfer and Homeostasis"(Nichols G and Wasserman RH, Eds.). New York : Academic Press, P : 351. 1971.
- Simkiss K. Calcium and avian reproduction. *Symposia of Zoological Society of London*, No. 35 : 305-337. 1975.
- Singh R, Joyner CJ, Peddie MJ and Taylor TG. Changes in the concentrations of parathyroid hormone and ionic calcium in the plasma of laying hens during the egg cycle in relation to dietary deficiencies of calcium and vitamin D. *General and Comparative Endocrinology*. 61 : 20-28. 1986.
- Spencer R, Charman M, Wilson P and Lawson E. Vitamin D-stimulated intestinal calcium absorption may not involve calcium-binding protein directly. *Nature*. 263 : 161-163. 1976.
- Stein WD. Facilitated diffusion of calcium across the rat intestinal epithelial cell. *Journal of Nutrition*. 122 : 644-650. 1992.
- Striem S and Bar A. Modulation of quail intestinal and egg shell gland calbindin(Mr 28,000) gene expression by vitamin D₃, 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ and egg laying. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 75 : 169-177. 1991.
- Striem S and Bar, A. Modulation of quail intestinal and egg shell gland calbindin (Mr 28,000) gene expression by vitamin D₃, 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ and egg laying. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 73 : 325-331. 1991.
- Tanaka Y, Castillo L and DeLuca HF. Control of renal vitamin D hydroxylases in birds by sex hormones. *Proceedings of the National Academy Sciences USA*. 73 : 2701-2705. 1976.
- Tanaka Y, Castillo L, Wineland M and DeLuca HF. Synergistic effect of progesterone, testosterone and estradiol in the stimulation of chick renal 25-hydroxyvitamin D₃-1-hydroxylase. *Endocrinology*. 103 : 2035-2039. 1978.
- Taylor AN and Brindak ME. Chick brain calcium binding protein : Comparative with intestinal vitamin D-induced calcium binding protein. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 161 : 100-108. 1974.
- Taylor AN and Wasserman RH. Immunofluorescent localization of vitamin D-dependent calcium-binding protein. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 18 : 107-115. 1970.
- Taylor AN and Wasserman RH. Vitamin-D₃-induced calcium-binding protein : partial purification, electrophoretic visualization, and tissue distribution. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 119 : 536-540. 1967.
- 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. 1965.
- Warren DC and Scott HM. The time factor in egg formation. *Poultry Science*. 14 : 195-207. 1935.
- Wasserman RH and Taylor AN. Vitamin D₃ inhibition of radiocalcium binding by chick intestinal homogenates. *Nature*. 197 : 30-32. 1963.
- Wasserman RH and Taylor AN. Vitamin D-induced calcium-binding protein in chick intestinal mucosa. *Science*. 152 : 791-793. 1966.
- Wasserman RH, Corradino RA and Taylor AN. Vitamin D-dependent calcium-binding protein. Purification and some properties. *Journal of Biological Chemistry*. 243 : 3978-3986. 1968.
- Yoshimura Y, Ohira H and Tamura T. Immunocytochemical localization of vitamin D receptors in the shell gland of immature, laying, and molting hens. *General and Comparative Endocrinology*. 108 : 282-289. 1997.