

孵卵に伴うニホンウズラ卵の卵殻変化

酒井 秀嗣^{1,2} 佐藤 恵^{1,2} 若林 修一^{1,2} 塩谷 正勝³

Changes in eggshell weight and thickness of Japanese quail during incubation

Hidetsugu Sakai^{1,2}, Megumi Sato^{1,2}, Shuichi Wakabayashi^{1,2} and Masakatsu Shioya³

Abstract

Since avian eggshells are composed primarily of calcium carbonate, it is likely that these serve as the source of calcium during embryonic development. To determine whether calcium was being supplied to the developing embryo from the eggshell, the weight and thickness of eggshells and egg weight were measured for the duration of embryogenesis. The study showed that egg weight decreased in proportion to the number of incubation days. Regression analysis revealed that eggshell weight and thickness decreased significantly, although the standard deviation about the mean values of them varied considerably due to scattering. The mean decrease in eggshell weight was only 38mg, suggesting that the embryo use an alternate source of calcium during development.

Key words : calcium, eggshell, embryogenesis, incubation, Japanese quail

緒 言

鳥類の胚発生は卵殻に囲まれた空間内で進行し、発生に必要な物質は呼吸によって取り込まれる酸素を除いてすべて卵内でまかなわれる。我々は、メスのニホンウズラに外因性内分泌攪乱物質のひとつであるビスフェノール-A を長期間にわたって経口投与したところ、脚の異状によって立つことができない初生雛が生じた。

投与量が多い群の方がこの異常個体の出現率が高く、投与停止 1 週間以降に生まれた卵からは出生しなかったことから、ビスフェノール-A に特異的な現象と推察された¹⁾。この異常の直接的な原因は不明であるが、カルシウムの摂取不足もそのひとつとして考えている。

そこで、本研究ではほとんどが炭酸カルシウムによってできている卵殻が、胚へのカルシウムの供給源と考え、正常な胚発生における卵殻

¹ 日本大学歯学部生物学教室

² 日本大学歯学部総合歯学研究so機能形態部門
〒101-8310 東京都千代田区神田駿河台 1-8-13

³ 日本大学生物資源科学部動物資源科学教室
〒252-8510 神奈川県藤沢市亀井野 1866
(受理: 2006 年 9 月 30 日)

¹ Department of Biology, Nihon University School of Dentistry

² Division of Functional Morphology, Dental Research Center, Nihon University School of Dentistry
1-8-13 Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-8310, Japan

³ Department of Animal Resource Science, College of Bio-resource Science, Nihon University
1866 Kameino, Fujisawa City, Kanagawa 252-8510, Japan

重量および厚さの減少量を明らかにしようと試みた。この結果により、卵殻の計測によって発生時のカルシウム摂取の異常を検出できることを目指した。

材料と方法

動物

東海有機（豊橋市）から購入した6週齢のニホンウズラ (*Coturnix japonica*) を馴致飼育し、9週齢から研究に供する有精卵の採卵を開始した。これらの個体は光条件 16 L 8 D, 温度 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 湿度 $40 \pm 5\%$ の条件下, $14.2 \times 68 \times 32$ cm (幅×奥行×高さ) のケージを用いてつがいで飼育した。また、餌にはウズラ用配合飼料であるウズラマッシュ (埼玉実験動物供給所, 杉戸町) を用い、水とともに毎日交換した。

孵卵

産卵は毎日午前10頃に確認し、卵に日付とケージ番号を書いて卵重測定後に 14°C で保管した。卵は1週間分をまとめて孵卵器に入卵した。孵卵器は温度 37.6°C , 湿度 75% に設定され、転卵は自動で1日20回行った。この孵卵を4シリーズ行った。

卵重, 卵殻重量, 卵殻厚

卵重は採卵時、孵卵器への入卵時に測定し、孵卵中は毎日測定した。また、孵卵0日 (入卵時) から1日おきに卵を無作為抽出し、卵殻重量を AB 304-S 天秤 (Mettler Toledo, Switzerland), 卵殻の鈍端部頂部の厚さをクーラントブルーフマイクロメータ (ミットヨ, 川崎市) をそれぞれ用いて測定した。

統計

データの検定には SPSS (Chicago) の統計パッケージ (Ver. 8.05) を用いた。

結果

卵重

4週間で259卵が得られた。産卵から孵卵器

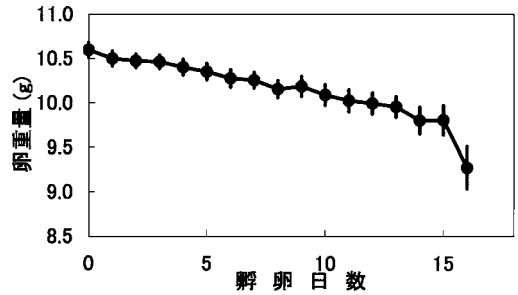


図1 孵卵に伴う卵重の変化, 平均値±標準誤差で表記

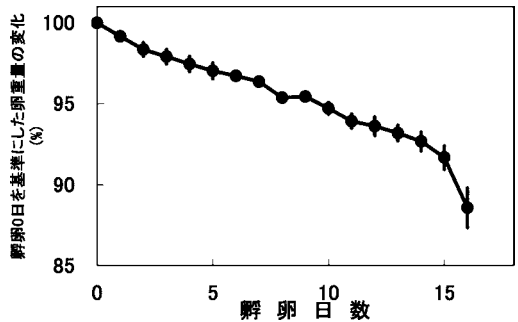


図2 孵卵0日を基準にした卵重量の変化, 平均値±標準誤差で表記

への入卵まで 14°C で保存し、保存期間は最大で7日であった。この間に卵重は平均で 0.03 g, 最大で 0.3 g の減少が認められた。入卵日の平均重量は 10.6 ± 0.1 g (平均値±標準誤差) から孵卵の進行に従って孵卵16日目の 9.3 ± 0.24 g まで減少が続いた (図1)。この結果、孵卵期間中に平均で 1.3 g の減少が認められた。また、孵卵15日目まではほぼ一定の減少であったが、15日から16日までに大きく減少したことも明らかになった。更に、この測定値をばらつきを減らして表せるよう、それぞれの卵の入卵日の重量を指標として表現した (図2)。この結果、平均値に対する標準誤差の割合は小さくなったが、孵卵後半ではそれなりのばらつきの大きさが認められた。これは、孵卵の進行に従って卵ごとの重量変化に違いがあることを示しているが、孵化まで孵卵した卵について入卵時の卵重

孵卵に伴うニホンウズラ卵の卵殻変化

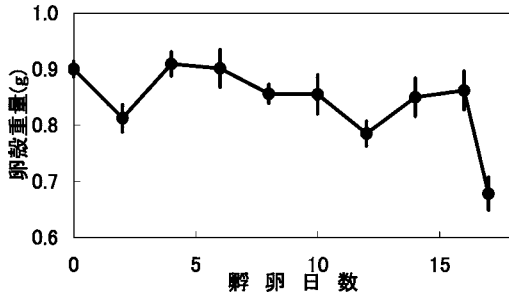


図3 孵卵に伴う卵殻重量の変化, 17日目は孵化直後, 平均値±標準誤差で表記

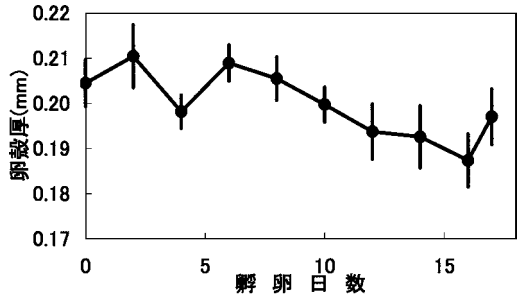


図5 孵卵に伴う卵殻の厚さの変化, 17日目は孵化直後, 平均値±標準誤差で表記

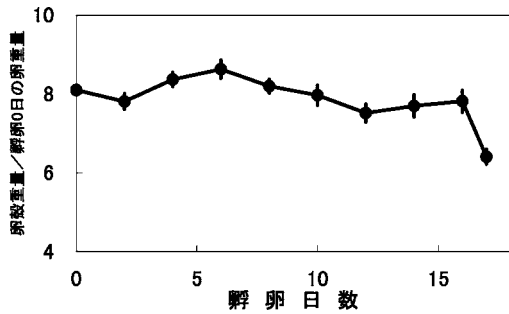


図4 孵卵0日の卵重量に対する卵殻重量の比の変化, 17日目は孵化直後, 平均値±標準誤差で表記

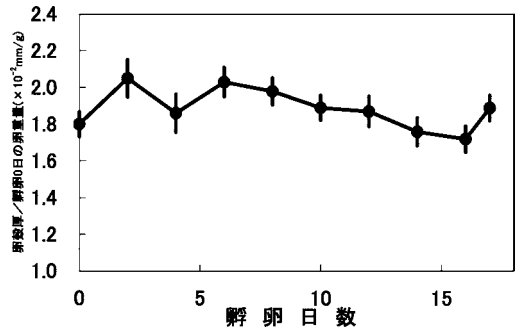


図6 孵卵0日の卵重量に対する卵殻の厚さの比の変化, 17日目は孵化直後, 平均値±標準誤差で表記

と減少量とを相関分析してみると, 卵の重さと減少量とは無関係であることがわかった ($p=0.28$)。

卵殻重量および卵殻厚

卵殻重量と卵殻厚および入卵日の卵重量について相互の相関を検定してみると, 卵殻重量と入卵日の卵重量との間には相関係数 0.551 の強度に有意な相関 ($p<0.001$) が認められたが, 卵殻の厚さと入卵日の卵重量との間には相関は存在しなかった ($p=0.13$)。しかしながら, 卵殻重量と卵殻の厚さとの間には 0.303 とそれ程大きくはないが強度に優位な ($p<0.001$) 相関があり, 両者の積は入卵日の卵重とも強度に有意な相関 ($p<0.001$) があり, 相関係数は 0.34 であった。

卵殻重量は, 入卵日の 0.900 ± 0.014 g から孵

卵 16 日目の 0.862 ± 0.034 g, 更に 17 日目の孵化後の 0.679 ± 0.029 g まで減少し, その変動は回帰分析では非常に高度に有意 ($p<0.001$) であった。しかし, 測定値を眺めると孵卵 6 日目までは大きな減少は認められず, 6 日目以降に減少傾向が顕著に現れてきた。また, 卵重量は一貫して減少したのに対し, 平均値の逆転も見られた(図 3)。一方, 鈍端部頂点の卵殻の厚さは, 入卵日の 0.205 ± 0.005 mm から, 16 日目の 0.187 ± 0.006 mm まで減少した。孵化後の 17 日目の値は 0.197 ± 0.006 mm とやや大きくなったが, 全体の回帰分析の結果は, 強度に優位な減少を示した ($p<0.01$)。測定値は 17 日目でやや大きくなったほか, 4 日目の値は 2 日目および 6 日目の値に比べて非常に小さな値であった(図 5)。これらの変動をより明確にする

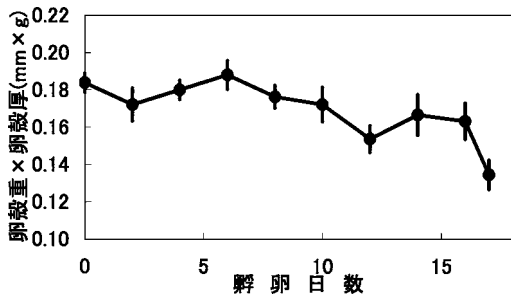


図7 孵卵に伴う卵殻重量と卵殻の厚さの積の変化, 17日目は孵化直後, 平均値±標準誤差で表記

ために, それぞれの測定値を入卵時の卵重量で除した値に変換してみたが, 卵殻重量 (図4) も厚さ (図6) も変動に顕著な違いは認められなかった。一方, 卵殻重量と厚さの積をとった場合, その変動はそれぞれの測定値単独よりも変化が明確になった。回帰分析によって得られた回帰直線は, $y = -2.18 \times 10^{-3}x + 1.88$ で回帰は強度に有意 ($p < 0.001$) であった。

考 察

本研究では, ニホンウズラの胚発生に伴って卵殻から胚にカルシウムが供給された場合に, その供給量の指標になるような値を卵殻重量や厚さに求めよう試みた。卵殻は1.5%の水分を含むが, 孵卵器中の湿度は75%に保たれているため, 水分が卵殻の重量変化に大きく影響することは考えにくい。また, 卵殻の97%が無機化合物で, さらにその98%が炭酸カルシウムであることから, 卵殻の重量や厚さに変化が見られれば, カルシウムの供給がその変化の主因であると言える。実際, ニワトリでは卵殻のカルシウムが尿膜循環を経て吸収されることが報告されている^{2,3)}。

孵卵器に入卵した際の卵重量は6.5gから13.2gまで広い範囲に分布していたが, 測定値のほとんどが9g台から12g台にあって, 極端に小さな卵はごく僅かであった。このため測定

値のばらつきは比較的小さく, 徐々にあるが孵卵の進行に従って重量が変化の様子が明確になった (図1)。この結果を入卵時の重量を基準に指数で表すと, ばらつきは更に小さくなった。しかし, 卵の重量とその変化量との間には相関がないため, 孵卵にともなう卵重量の減少の大きさを予測することは困難である。

一方, 卵殻重量と卵殻の厚さはいずれも孵卵中に減少したが, その減少は卵重のように一定ではなかった。例えば, 卵殻重量は4日目には2日目よりも大きな値になり, 以後12日目までは減少したが, 14および16日目に再び大きな値が得られた。また, 卵殻の厚さでも0日目よりも2日目の方が, また, 4日目よりも6日目の値の方が高いという結果になった。さらに, 孵化後の17日目の値も前日より大きい値を得た。孵卵16日目から孵化した17日目までの間の変動は, 卵殻重量と厚さで異なっていた。実際には厚さのデータのように値が大きくなることはあり得ないが, この1日間にそれまでに比べて変化の大きさが異なった可能性がある。ニワトリでは孵化時に尿膜血管が萎縮乾燥するために胚体外からのカルシウムの供給が停止する⁴⁾ことが知られている。また, 孵卵16日目以降に血漿カルシウム濃度が次第に増加し, 18日目から孵化直前までは高い値が持続するが, その後は急速に減少すること⁵⁾も報告されている。これらの報告と我々の結果とは何らかの関係があるのでないかと推測される。

卵の重量は各々の卵について, 卵殻の計測のために孵卵を中止するまで連続して測定し, それらの結果を積み上げた結果である。それぞれの卵は, 孵卵とともに重量が減少していくため, 全部の卵の測定値を合わせてもその傾向は変わらない。一方, 卵殻の重量や厚さはそれぞれの孵卵日数で無作為抽出した卵の測定値のため, 誤差や不規則な変化が認められることになった。そこで, 誤差を小さくして変動の本質を明

白にする目的で、入卵日の卵重で除した値を用いて変動を見てみた(図4, 6)。これは、卵殻の厚さはともかくとして、重量は卵の表面積に比例すると考えたからであるが、変動に大きな違いは現れなかった。さらに、卵殻の重量と厚さの積を変数に採ってみると、減少傾向は明確になり、信頼区間の狭い回帰直線が得られた。本研究では、正常な胚発生が行われた場合に卵殻から供給されたカルシウム量を推定する指標を得ようと考えた。卵殻の重量と厚さの積をパラメーターとして、カルシウム代謝に異常があった胚を区別できるかは、継続研究の結果を待ちたい。

更に入卵日と孵化後との間で卵殻重量の平均値の差は約220 mgしかない。骨格形成だけでなく、血液中および細胞中のカルシウム量を勘案すると、胚のカルシウムは卵殻からの供給だけで賅われているのかを精査する必要があるように思われる。本研究の結果は、卵殻以外にもカルシウムの供給源がある可能性を示唆している。

謝 辞

本研究は、平成17年度日本大学歯学部佐藤奨学金の助成を受けた。日本大学生物資源科学部の黄未央さんの支援に感謝する。

文 献

- 1) 酒井秀嗣, 佐藤恵, 村田浩一, 塩谷正勝, 杉森文夫 (2004) ビスフェノールAが次世代の性比に及ぼす影響について, 日大・歯・紀要 32, 43-48
- 2) Johnston PM, Comar CL (1955) Distribution and contribution of calcium from the albumen, yolk and shell to the developing chick embryo. *Am J Physiol*, 183, 365-370
- 3) Simkiss K (1961) Calcium metabolism and avian reproduction. *Biol Rev*, 36: 321-367
- 4) Lillie, FR (1952) *Development of the Chick*. 3rd ed 289-291. Henry Holt and Co, New York
- 5) Taylor TG, Shires A, Baimbridge KG (1975) Changes in the concentration of calcium, magnesium and inorganic phosphate in the plasma of chick (*Gallus gallus* L.) embryos during incubation. *Comp Biochem Physiol*, 52 A, 515-517