

# 自然換羽鶏における換羽，産卵，肝臓中の酵素活性 および血清無機成分に及ぼすクエン酸の影響

富田裕一郎・林 国興・本坊敏郎

(昭和 51 年 8 月 30 日 受理)

## Effects of Citric Acid on Molting, Egg Production, Activities of Enzymes in Liver and Mineral Levels in Serum of Natural Molting Hens

Yuichiro TOMITA, Kunioki HAYASHI and Toshiro HONBO

(Laboratory of Animal Nutrition)

家禽の換羽の順序，時期および期間等と，産卵能力との間には関連があるとされ，多くの報告がある<sup>1~3)</sup>。また，換羽期および産卵期間中における生理的変動についても幾多の報告があり，脂質代謝<sup>4)</sup>，無機質代謝<sup>4~5)</sup>あるいはホルモンの関係から卵巣<sup>4)</sup>，下垂体<sup>4)</sup>，副腎<sup>6)</sup>，甲状腺<sup>6)</sup>等との関連もかなり明らかになってきた。

一方，醸造酢，乳酸，クエン酸等が家禽に対し，成長促進，産卵増大，また有機酸自身が生体内でアルカリ生成元素の carrier として利用され，体液等の調節等に役立つことも考えられ，これから耐病性の増加等に対して有効であるとして，一部養鶏家間で利用されていたが，これに対する研究は少なく，雛の成育に対して，辺津賀<sup>7)</sup>は，乳酸，酢酸，クエン酸の中では，クエン酸が最も有効であること，吉田<sup>8)</sup>らは，コハク酸，フマル酸，酒石酸，クエン酸が利用可能なこと，また，産卵鶏に対して，酢酸が有効であることを倉田<sup>9)</sup>が報告しているに過ぎない。

クエン酸は，生体内において，TCA 回路に関連する酸であり，かつまた脂質代謝，無機質代謝等とも関与することが知られているが，これを経口的に与えた時，いかなる影響を及ぼすかはさだかではなく，実験的証明はなされていない。そこで今回は，クエン酸の飲水給与が，換羽，産卵，無機質代謝の面から骨格にいかなる影響を及ぼすか，またその時の血清無機質，肝臓中の酵素つまり，グルタミン酸・オキザロ酢酸トランスアミナーゼ (GOT)，グルタミン酸・ピルビン酸トランスアミナーゼ (GPT)，グルタミン酸脱水素酵素 (GDH) の各活性が，どのように変動するかを明らかにするため，本実験を行なった。

### 1. 実験材料および方法

#### (i) 供試鶏および飼育方法

520 日齢，白色レグホーン種九州プラン系♀，81 羽を初産からの産卵率にもとづき，27 羽ずつ 3 区に分け，単飼ケージを用いて試験した。

期間中，1 日 1 羽当り 100 g の制限給餌とし，市販の飼料（水分 0.7%，粗脂肪 4.6%，粗蛋白質 14.8%，粗繊維 3.0%，粗灰分 8.0%，NFE 59.9%）を使用した。

クエン酸は，飲水に溶解し不断給水した。試験区では，クエン酸 0.15% (W/V) 給与の A 区，クエン酸 0.05% (W/V) 給与の B 区，水を与えた C 区の 3 区とした。

#### (ii) 産卵および卵重の測定

産卵は個体別に毎日記録し，卵重測定は，週一回，全卵について行なった。

#### (iii) 骨および各臓器重の測定

各区から，産卵鶏，休産鶏（換羽 2 週間前後）を 3 羽ずつ解体し，100°C，2 時間乾燥した骨（股骨＋脛腓骨）重量および肝臓，腎臓重量を測定した。

#### (iv) 酵素液の調整法<sup>12)</sup> および測定法

肝臓を取り出し，生理食塩水で洗浄し，ろ紙で水分を取り除いたあと，分析時まで，-20°C 以下で凍結保存した。

肝臓一定量を秤取し，10 倍量になるように脱イオン水を加え，Potter-Elvehjem 型ホモゲナイザーを用いて氷冷下でホモゲナイズし，10 倍稀釈液とした。GOT，GPT 活性の測定には，10 倍稀釈液をそのまま，GDH では，2,000×g で 30 分間，遠心分離した上澄みを粗酵素液とした。GOT および GPT 活性の測定は，Reitman-Frankel 法<sup>10)</sup>によった。尚，標準曲線はピルビン酸リチウムを用いて作成し，活性値は Karmen 単位で示した。GDH の活性は，粗酵素液を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH=7.4) で 20 倍に稀釈

し、NADH の酸化割合を 340 m $\mu$  での吸光の変化により測定する Olson & Antinsen らの方法<sup>11)</sup> に基づいて測定した。各活性は、日立 101 型分光光度計にて 25°C 保温下で測定した。

(v) 血清無機質

① Na, K, Ca, Mg の測定<sup>13-14)</sup>

血清は各区の産卵鶏および休産鶏各 3 羽ずつ計 18 羽から採血し、3,000 $\times$ g で 10 分間遠心分離して得た。血清 0.1 ml に Sr 溶液 (1 g/1,000 ml) 10 ml を加えて希釈し、K および Ca を測定する場合は、所定量の Na を Sr 溶液に加え、これらを Beckman NF 型原子吸光機を用いて定量した。

② P の定量

無機リン酸にモリブデン酸アンモニウムを加えると、リンモリブデン酸塩になる。これを 1,2,4-アミノナフトールスルホン酸で還元すると青色を呈する。この原理に基づく、Fiske-Subbarow 法<sup>15)</sup> を用いた。比色は日立製 101 型分光光度計を使用した。

③ 塩化物(Cl<sup>-</sup>)の定量

Cl<sup>-</sup> に硝酸第二水銀 (Hg<sup>2+</sup>) を加えると、HgCl<sub>2</sub> を化性する。そこで、Hg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> の過剰をジフェニルカルバジンを指示薬として定量する硝酸第二水銀法<sup>16)</sup> を用いた。

結果および考察

1. 換羽休産日数

試験開始より換羽休産開始までの日数を、第 1 表、換羽休産日数を第 2 表に示した。

Table 1. The period from experimental start to non-laying by molting (Means $\pm$ S. D.)

Group	Days
A : 0.15%	54.8 $\pm$ 33.4
B : 0.05%	43.8 $\pm$ 29.5
C : Control	44.8 $\pm$ 29.8

換羽休産開始までの日数は 0.15% : A 区が他区に比べ、10 日ほど、遅いが、バラツキがやや大きいことから、クエン酸の影響よりも個体差に起因していると考えられる。

Table 2. The period of non-laying for molting (Means $\pm$ S. D.)

Group	Days
A : 0.15%	52.4 $\pm$ 20.1
B : 0.05%	59.8 $\pm$ 15.2
C : Control	46.7 $\pm$ 10.4

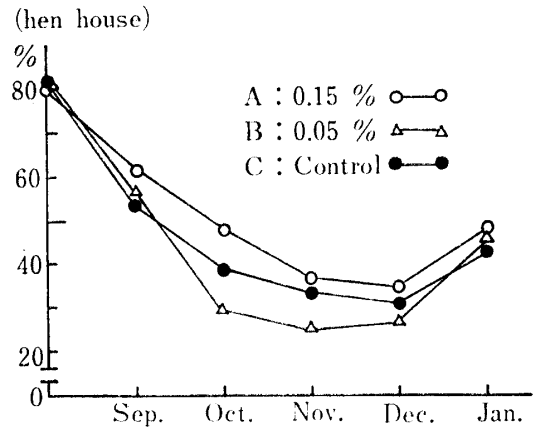


Fig. 1. The percentage of egg production

換羽休産日数は、クエン酸区がやや長い傾向を示し、特に、0.05% : B 区が大であった。一般に、早期に換羽を開始するものは、換羽の完了までに長期間を要し、遅く開始するものは、短いと云われているが、本実験では必ずしも一致せず、クエン酸給与の影響によるものと推察される。

2. 産卵率および卵重

実験期間中のヘンハウス産卵率を図 1 に、各月別平均卵重を第 3 表に示した。

図 1 から、実験の初期にクエン酸区が高い傾向を示した。A 区はその後も他の 2 区より高い率を持続したが、B 区は、10 月から 12 月にかけて C 区よりも低率を示し、全期間を通じての平均産卵率は、C 区 39.6% に対し、A 区 44.8%、B 区 36.2% であった。なお、9 月から翌年 1 月までの 1 羽当りの全産卵個数は、C 区 58.4 個に対し、A 区 66.9 個、B 区 49.7 個で、A 区が極めて高かった。また、換羽後 1 月までの産卵率は、A 区 69.7%、B 区 66.9%、C 区 60.7% と、いずれもクエン酸区が高い傾向を示した。このことは、クエン酸は産卵に対し、何らかの形で関与し、換羽後

Table 3. Average egg weights (g) (Means $\pm$ S. D.)

Group	Sep.	Oct.	Nov.	Dec.	Average
A : 0.15%	58.9 $\pm$ 0.8	59.6 $\pm$ 1.7	61.5 $\pm$ 1.7	61.5 $\pm$ 0.6	60.3 $\pm$ 4.2
B : 0.05%	58.9 $\pm$ 0.8	59.1 $\pm$ 1.8	63.4 $\pm$ 2.7	61.0 $\pm$ 1.9	60.5 $\pm$ 4.0
C : Control	58.6 $\pm$ 1.1	58.4 $\pm$ 2.0	61.5 $\pm$ 1.7	62.3 $\pm$ 1.1	60.1 $\pm$ 4.1

Table 4. Percentage of weight of bone, liver and kidney to body weight.

	0.15%			0.05%			Control		
	Bone	liver	kidney	Bone	liver	kidney	Bone	liver	kidney
Layer	1.11	2.89	0.87	1.12	2.54	0.58	1.20	2.39	0.59
Non-Layer	1.15	2.13	0.65	1.11	1.84	0.70	1.16	2.07	0.65

の産卵回復が大きいことより,特に濃度を考慮することにより生産向上が期待できるかも知れない。

卵重に関しては,全期間を通じての平均がA区 60.3 ± 4.2, B区 60.5 ± 4.2, C区 60.1 ± 4.1g と各処理間に,全く差は認められなかった。

3. 骨(股骨および脛腓骨)および臓器(肝臓および腎臓)重量

骨,肝臓および腎臓重量の体重に対する割合を第4表に示した。

大島ら<sup>5)</sup>は自然換羽による休産鶏の骨の乾物量の変動について,休産鶏の骨の乾物量は,産卵鶏に比べ有意な変動があると報告している。本実験では,休産鶏はC区において減少したものの,A区では,逆に高い傾向を示した。C区の休産鶏の骨重量減少は,骨中Caの血中Ca成分への移動によるものと推察される。しかし,クエン酸区は,全体的にかなり,低い値を示し,産卵鶏と休産鶏の差よりも,クエン酸処理による差が顕著であった。この事は,クエン酸が,骨中Caを中心とした無機質代謝に大きな役割を果たすものと推察される。

同じく,大島ら<sup>5)</sup>は,自然換羽による休産時の各臓器重量の変動について,肝臓,とさか,輸卵管等において,有意に減少すると報告している。本実験におい

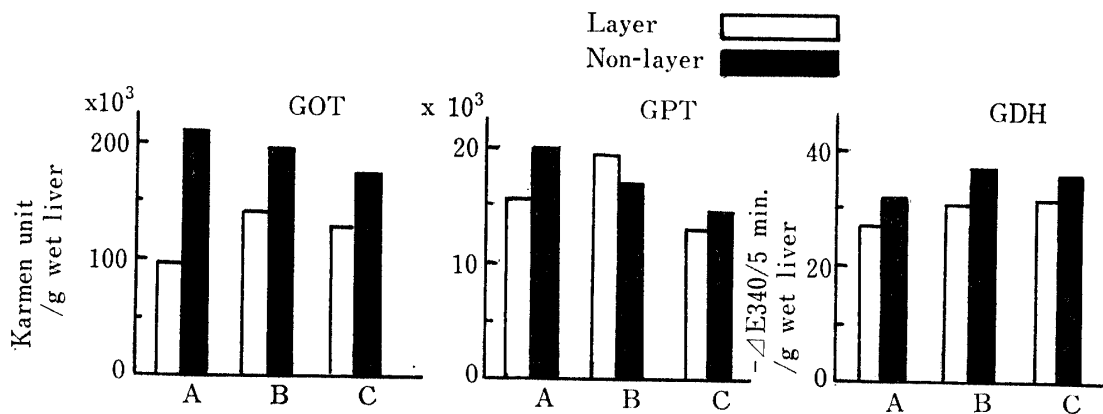
ても,肝臓は同じような傾向を示し,とくにクエン酸区が72~74%に減少した。腎臓については,休産による変動はほとんど認められない。また,クエン酸処理により,肝臓,腎臓ともに有意な変動は認められなかったが,対照区に比べ,やや高い傾向を示した。このように,産卵鶏にとって,肝臓機能がアミノ酸代謝を中心に非常に重要であることが考えられ,また,クエン酸が,各臓器機能を促進する働きがあるのではないかと推察される。

4. 肝臓中 GOT, GPT および GDH

産卵鶏,換羽による休産鶏各区3羽の平均活性値を図2に示した。

GOT, GPTの両トランスアミナーゼは,グルタミン酸からTCA回路に,関与するα-ケトグルタル酸を生じ,アミノ酸代謝と有機酸を結び合わす酵素である。また,GDHもグルタミン酸とα-ケトグルタル酸の可逆的交換により,両代謝反応を結び合わせる酵素である。

GOT活性は,各区とも休産鶏の活性値が高く,特に,A区においては,産卵鶏に対し休産鶏に対し休産鶏では2倍以上の高い活性値が認められた。GPT活性は,産卵鶏と休産鶏間には,GOTほど,大きな差は認められなかったが,クエン酸区は,対照区に比べ



(A : 0.15%, B : 0.05%, C : Control)

Fig. 2. The activities of enzymes in liver

Table 5. Some mineral levels in serum

Group	Mineral	Mineral					
		Cl (mEq/l)	P (mEq/l)	Ca (mg/dl)	Na (mg/dl)	Mg (mg/dl)	K (mg/dl)
A : 0.15%	Layer	118.7	3.58	26.9	524	4.44	33.9
	Non-layer	122.3	2.98	12.0	459	4.04	27.6
B : 0.05%	Layer	118.7	3.20	32.3	442	5.46	34.4
	Non-layer	121.8	2.58	9.82	447	4.19	29.5
C : Control	Layer	116.5	3.02	3.21	464	4.70	26.9
	Non-layer	119.3	4.98	3.14	466	4.80	44.4

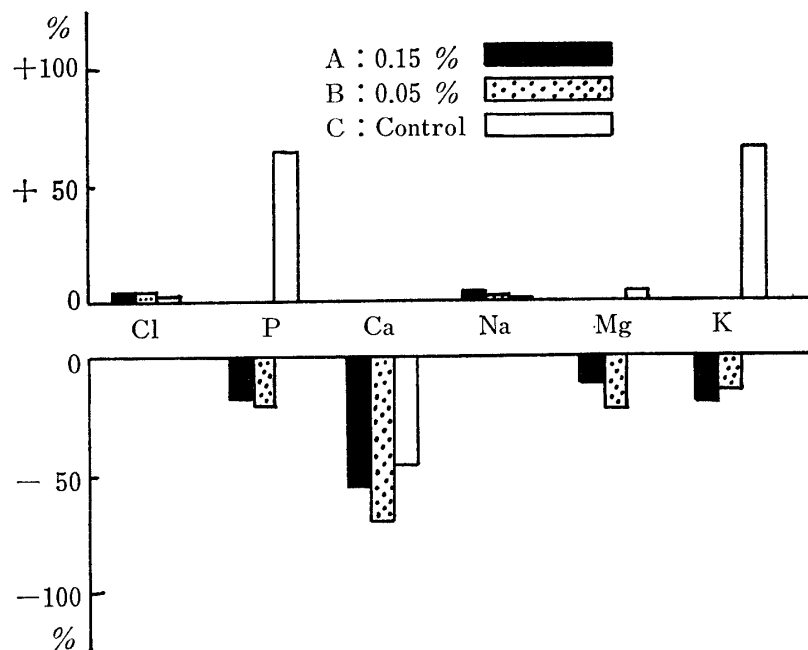


Fig. 3. Ratio of mineral levels in serum of non-layer compared with layer

高い値を示した。GDH は、GOT とほぼ同様の傾向を示した。しかし、産卵鶏、休産鶏ともに、A区はC区に比べ、約5 ( $-\Delta E_{340}$ ) ほど低い値を示した。これらの酵素活性は、換羽休産の時期によってかなりの差があると考えられるが、換羽休産後2週前後で高くなることは、この時点で、換羽後の羽毛形成、卵蛋白質合成等を中心としたアミノ酸代謝をより活発化し、なかでもクエン酸区が、GOT, GPT活性において、高いことから、換羽休産後の産卵回復へ、クエン酸が、何らかの形で関与していることを示唆するものと考えられる。

#### 5. 血清無機質

血清中の Cl, P, K, Ca, Na, Mg 量を第5表に、各区における産卵鶏と休産鶏間におけるこれら無機成分の増減率を図3に示した。

血中無機質成分の変動は、いろいろな要因が影響することが認められているが、クエン酸の経口投与による変動は、報告されていない。産卵期から換羽休産期にかけて著しい無機質代謝の変化があると考えられ

る。とくに Ca, P に関しては、大島の報告<sup>6,17)</sup>がある。しかし、その他の無機質については報告が少ない。

Cl 量は、産卵鶏に対し休産鶏が、やや高い傾向を示し、また、C区に比べ、AおよびB区がやや高い値を示した。

P量は、C区において、産卵鶏に対し、休産鶏が約1.7倍の高い値を示した。これは、大島らの報告と全く逆の傾向を示したが、この原因は大島らも指摘したように、P量が個体によってかなり差があること、また、休産、産卵の時期によって差があることによるものと推察される。また、クエン酸区においては休産鶏が、約80%に減少した。このことは、クエン酸が、血清磷量に大きく影響していると考えられる。

Ca量については、大島らの報告と同様な傾向を示し、換羽休産時に、約30~50%の減少が認められ、とくに、クエン酸区においては顕著であった。

Mg量は、C区の産卵鶏、休産鶏間に差は認められないが、クエン酸区は換羽休産によって80~90%に

減少した。

K量は、Pと全く同様な傾向を示した。このように、クエン酸給与が、血清中のP, Ca, Mg, K量にかなりの影響を与えた。クエン酸は、炭酸、燐酸等とともに骨の主な成分であるCaと結合し、Ca動員に関与すると言われているが、Caのみならず、他の生体内無機質代謝にも関連のあることが推察された。また、換羽休産によって、Cl, P, Ca, Mg, K量など、ほとんどの無機質が影響を受けていると考えられる。

### 要 約

本研究は、自然換羽鶏における産卵,換羽,骨および臓器重量,肝臓中のGOT,GPTおよびGDH活性,血清無機質におよぼすクエン酸(経口投与)の影響を検討するために行なった。

結果は次の通りである。

1. 自然換羽によってひきおこされた休産開始は、B区(0.05%)およびC区(対照区)が、A区(0.15%)より、10日程早かった。C区の休産期間は、A区とB区より短かった。
2. 5ヶ月間にわたるヘンハウス産卵率の平均は、A区44.8%、B区36.2%、C区39.6%で、A区が最も高かった。
3. 体重に対する骨重量の割合は、C区の産卵鶏が最も高く、A区が最も低かった。また、B区とC区の産卵鶏は休産鶏より高い割合が認められた。一方、体重に対する肝臓重量の割合は、A区の産卵鶏が最も高く、C区は最も低かった。また、各区における産卵鶏の割合が休産鶏より高かった。
4. 休産鶏における肝臓中のGOT,GPTおよびGDH活性は、B区のGPT活性を除いて産卵鶏より高かった。
5. 休産鶏の血清無機質量を産卵鶏と比較した場合、Ca量は約1/2に減少し、Cl量はわずかに増加した。C区の休産鶏血清におけるMg,P,K量は産卵鶏より大きかったが、逆に、A区、B区において小

さかった。

終りに臨み、クエン酸を御恵与いただいた昭和化工株式会社鹿児島研究所々長川原一氏、供試鶏を御世話下さった鹿児島県養鶏試験場東上床久司技師および原子吸光分光分析機による血清無機質定量に御指導下さった青果保蔵学教室橋永文男助教授に深く感謝する。

本報告の大意は昭和49年度西日本畜産学会大会(大分市)において発表した。

### 文 献

- 1) 大西靖彦, 武富万治郎: 農技研報告, G, 9, 9 (1954)
- 2) Marble, D. R.: *Cornell Univ. Agr. Exp. Sta. Bull.*, 503, 1 (1930)
- 3) Rice, J. E., C. Nixon and C. A. Rogers: *Cornell Univ. Agr. Exp. Sta. Bull.*, 258, 1 (1908)
- 4) 佐々木清綱編: 畜産大辞典, p. 324, 養賢堂 (1966)
- 5) 大島正尚: 畜試研報, 6, 41 (1964)
- 6) Tanabe, Y.: *Endocrinology*, 61, 661 (1957)
- 7) 辺津賀興: 宮崎大農研究時報, 9, (2), 281 (1963)
- 8) Yoshida, M., Morimoto, H. and Oda, R.: *Agr. Biol. Chem.*, 34, 1301 (1970)
- 9) 倉田新一郎, 友安夫, 大角彰, 井上哲夫: 日畜会報(臨時増刊, 学会号), 42, 122 (1971)
- 10) Frankel, S. Reitman: *Am. J. Clin. Path.*, 28, 56 (1957)
- 11) Olson, J. A. and C. B. Anfinsen: *J. Biol. Chem.*, 197, 67 (1952)
- 12) 赤堀二郎編: 臨床酵素学, p. 415, 朝倉書店 (1964)
- 13) 武内次夫, 鈴木正己編: 原子吸光分光分析, p. 99, 南江堂 (1968)
- 14) 藤田哲夫, 重松恒信: 分析化学, 19, 893 (1970)
- 15) Fiske, C. H. and Subbarow, Y.: *J. Biol. Chem.*, 66, 375 (1925)
- 16) David, F. Boltz (Editor): "Colorimetric Determination of Nonmetals", p. 171 Interscience Pub. Inc., New York (1958)
- 17) 大島正尚: 畜試研報, 7, 35 (1964)

### Summary

The present investigation was conducted to identify the effects of citric acid (per os) on the egg production, the weight of bone and organ, the activity of enzyme in liver and the mineral levels in serum of the natural molting hens. Eighty-one layers of White Leghorn were divided into 3 groups; to A, B and C group was given 0.15%, 0.05% and 0% citric acid aq. solution for drinking water, respectively. The results obtained were as follows.

1. The non-laying by molting of B and C group was followed about 10 days faster than in case of A group, and non-laying period of C group was shorter than those in the others.

2. The average of percentages of egg production (hen house), during 5 months, of A, B and C group was 44.8, 36.2 and 39.6 %, respectively.

3. The percentage of bone to body weight was noted to be in the following order from the highest: C, B and those of the layer of B and C group were higher than in case of the non-layer. On the other hand, the percentage of liver to body weight was the highest in the layer of A group and was the lowest in C group, and the value of layer was higher than that of the non-layer in 3 groups.

4. The activities of GOT, GPT and GDH in the liver of non-layer were higher than those in the layer excepting that the GPT activity in non-layer of B group was higher than the layer of the same group.

5. When the mineral levels in serum of the non-layer compared with those of the layer, calcium decreased to about a half fold and chlorine increased slightly. Magnesium, phosphorous and potassium levels in serum of the non-layer of C group were larger than those of the layer, but in A and B groups a reverse result in case of C group was found.