

〈資料〉

紫外可視分光光度計を用いた動物被毛、羽毛の簡易吸光度分析

岡崎 登志夫、福山 貴昭、石野 淳嗣、堀井 隆行、川添 敏弘

Simplified optical analysis of animal fur and feathers using ultraviolet visible spectrophotometer

Toshio Okazaki, Takaaki Fukuyama, Atsushi Ishino,
Takayuki Horii and Toshihiro Kawazoe

Summary We performed simplified optical analysis of the fur of dogs and cats and feathers of birds using an ultraviolet visible spectrophotometer. As a result, the light-shielding ability was not associated with the fur color, but showed a negative correlation with its thickness. For light-scattering analysis, simple processing was applied to cuvettes, and plant leaves were analyzed to obtain the optical data corresponding with chlorophyll pigment. This result suggested that this method was useful for estimating pigments contained in materials. Light-scattering analysis of human and dog hair and crow feathers showed absorption peaks at wavelengths corresponding to eumelanin and pheomelanin. Analysis of cat hair also showed an absorption peak at 380-400 nm, suggesting a pigment in addition to eumelanin and pheomelanin. On analyzing parrot feathers, an absorption peak corresponding to psittacofulvin was confirmed. In pigeons and crows, a low absorption peak corresponding to psittacofulvin was also observed.

Key words: Animal, Hair, Feather, Optical analysis, Melanin

I. 緒言

外界、特に太陽からの電磁波の強度は、地球上の地理的、季節的要因によって大きく変化し、動物のライフスタイルに様々な影響を及ぼすことはよく知られている。動物の体表面に照射された光は、一部は吸収され、一部は反射し、一部は透過する。太陽から地球に到達する電磁波のうち、400 nm以下の光、とりわけ紫外線は、

動物表皮の深部に達し、突然変異を引き起こし、皮膚がんの原因になる^{1,2)}。400 -700 nmの可視域の光は、動物の視覚器官によってさまざまな色として知覚され、摂食行動や繁殖行動などに影響を与える^{3,4)}。また、これらの光の昼夜の明暗サイクルは、松果体のメラトニン分泌に作用し、サーカディアンリズムの調節に貢献する⁵⁾。700 nm以上の赤外域の光は、熱変換効率が高く⁶⁾、動物には主に熱として作用する。これら太陽光

ヤマザキ学園大学動物看護学部動物看護学科
〒192-0364 東京都八王子市南大沢4-7-2

受領日 平成26年7月29日

受理日 平成27年1月4日

Yamazaki Gakuen University

4-7-2 Minami-osawa, Hachioji, Tokyo 192-0364, Japan

の影響から身を守るため、動物体表面の最外郭の皮膚組織は、表皮の色素細胞がメラニンを合成したり^{7,8)}、硬いケラチンタンパクからなる被毛や羽毛を発達させたりと^{9,10)}、さまざまに変化してきた。そのため、これら被毛、羽毛の色素に関する研究には、硬いケラチンを破壊して色素を抽出しなければならず、極めて繁雑であった¹⁾。

今回我々は、動物（イヌ、ネコ）の被毛及び鳥の羽毛の落射、透過照明による光学顕微鏡観察や分光光度計を用いた光遮蔽能分析のほか、分光光度計のキュベットに加工を加えて、被毛や羽毛の反射光から、これら固形材料に含まれる色素を、破碎抽出することなく、直接感度よく検出できる簡易吸光度分析法を考案し、これらの方法を用いて、被毛や羽毛の分光学的特性について、いくつかの興味ある知見を得ること

ができたので報告する。

Ⅱ. 材料と方法

1. 動物被毛及び鳥羽毛の採集

イヌ被毛については、健康な成犬（プードル：巻毛 8歳♀、3歳♂、年齢不詳♀、シーザー：直毛 8歳♂、ポメラニアン：直毛 年齢性別不詳、ピジョン・フリーゼ：巻毛 年齢性別不詳など）からグルーミングでカットされた黒、茶、白色被毛を、ネコ被毛については、雑種ネコ（13歳♂、16歳♀）から採取された黒茶、白色被毛を用いた。鳥羽毛については、抜羽毛として採集したインコ（緑色）、ハト（グレー・茶色混合色）、カラス（黒色）の羽毛を用いた。比較対象としては成人ヒト頭髪（黒色）を用いた。本研究は、「ヤマザキ学園大学研究倫理指

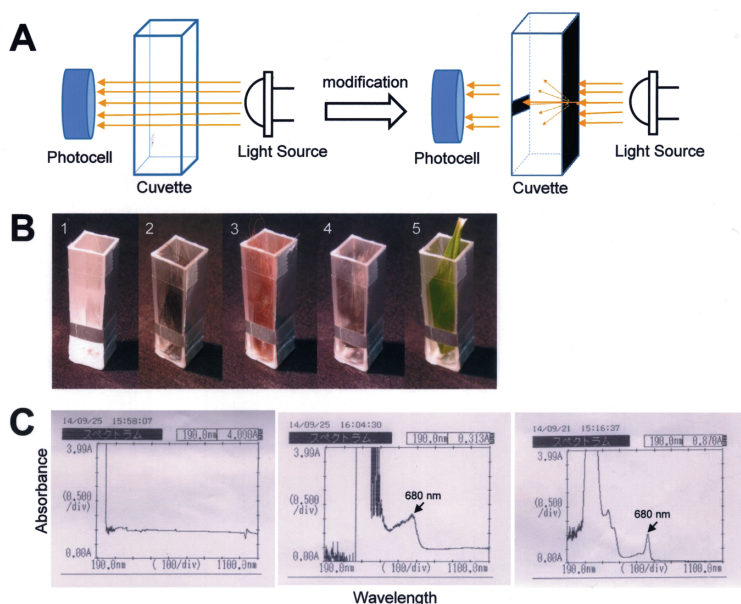


Fig. 1 Methods of simplified optical analysis using an ultraviolet visible spectrophotometer.

A. Right, visible light-shading analysis of dog fur: Fur was put into a cuvette, and absorbance between 190 and 1,100 nm was analyzed. Left, simplified optical analysis of fur and feathers: Analytical cuvettes were processed to detect the scattered light from the materials as follows: Aluminum foil was applied to the cuvette surface on the light-source side, a hole (1 mm) was made in its center, and aluminum foil (5 mm in width) was attached to the cuvette surface on the opposite side.

B. Each of materials was directly put into the analytical cuvette. 1, empty; 2, black hair (human); 3, brown hair (dog); 4, brown feather (bird); 5, a green leaf.

C. Comparative optical analysis of plant leaves using the ultraviolet visible spectrophotometer: Right, using a conventional standard cuvette; Middle, using a cuvette with aluminum foil; Left, alcohol extract of leaves.

針、I動物を対象とした研究倫理指針（動物実験指針）」に従い実施した。

2. 被毛、羽毛に関する吸光度分析

a. 被毛、羽毛の光遮蔽効果

被毛、羽毛に関する吸光度分析には、株式会社島津製作所のUVmini-1240紫外可視分光光度計を用いた。光路長 10 mmのスタンダードキュベット (12.5×12.5×45 mm) に被毛、羽毛を直接入れ、乾式で190 nm-1100 nmの吸光度分析を行った (Fig. 1A左)。吸光度測定後、用いた被毛の乾燥重量を化学天秤で測定した。得られた400 nm-1100 nm可視・赤外光域の吸光度の値を被毛の乾燥重量の値で除し、被毛1 gあたりの可視・赤外光遮蔽率とした。

b. 被毛、羽毛反射光の簡易吸光度分析

被毛、羽毛の簡易吸光度分析法として、被毛や羽毛を乾式でそのまま用いて、被毛や羽毛からの反射光の吸光度分析をするために、ネフェロメトリ用反射光検出部を模して、スタンダードキュベットに加工を施した。すなわち、キュベット入光面にアルミ箔を貼り、その中央部に直径1 mmの光通過穴を開けた。キュベットの出光面には、光通過穴の対面の位置に幅5 mmのアルミ箔を貼り、光通過穴から入った光が、直接受光部に達しないように加工した (Fig. 1A右)。この加工キュベットに被毛や羽毛や植物試料を直接投入し (Fig. 1B)、被毛や

羽毛からの反射光について簡易吸光度分析を行った。

3. 被毛、羽毛の落射及び透過照明による顕微鏡観察

被毛、羽毛の落射及び透過照明による観察を行った。イヌ被毛については、×200倍または×400倍の光学顕微鏡を用いた。被毛の落射照明に際しては、光学顕微鏡の透過照明をオフにし、顕微鏡のステージ上部から27 Wの蛍光灯で照明し、観察した。羽毛の落射照明による肉眼観察には27 Wの蛍光灯照明を用い、透過照明にはイムノビューアーを用いた。

Ⅲ. 結果

1. 被毛、羽毛反射光の簡易吸光度分析に関する予備実験

被毛や羽毛を用いた乾式の反射光吸光度分析 (簡易吸光度分析) が可能かどうかを確認するために、植物の葉を用いて、次のような簡単な予備実験を行った。まず通常のキュベットに細長い植物の葉をそのまま入れ、吸光度を測定したところ、250-1100 nm間で吸光度の値はほとんど変化せず、250 nm以下の吸光度の値は急に高くなった (Fig. 1C左)。次に「材料と方法」2bのように加工したキュベットに、同じ細長い植物の葉を入れ、吸光度を測定したところ、380-

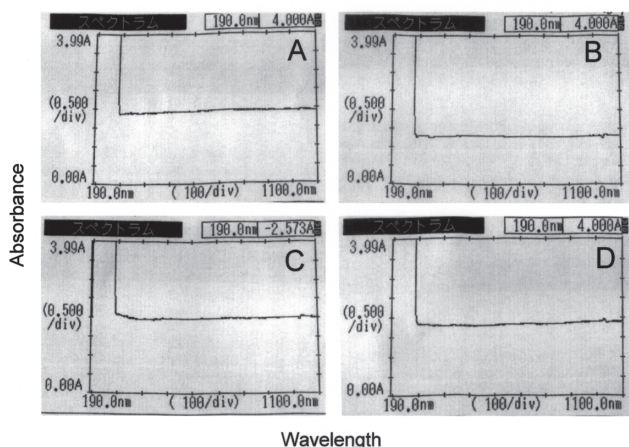


Fig. 2 Visible light-shading analysis of dog fur.
A: dog (black hair); B: dog (brown hair); C: dog (white hair); D: cat (white hair).

500 nmの間と680 nmに吸収極大が認められた (Fig. 1C中央)。この植物の葉にエタノールを加えて乳鉢ですり潰し、3000 rpmで5分間遠心し、上清の粗抽出液を採取し、それを光路長10 mmのスタンダードキュベットに入れ、吸光度分析を行ったところ、加工キュベットを用いたときの吸収極大680 nmと同様、680 nmに吸収極大が認められた (Fig. 1C右)。一般に植物には380-470 nmと620-680 nm域に吸収極大を持つクロロフィルが存在することが知られており^{12,13)}、当該方法で得られた吸収極大は、クロロフィル色素を反映したものと考えられた。また、380-500 nmの吸収極大が680 nmの吸収極大に比べて著しく高かったが、陸上の高等植物には、450 nm付近に吸収極大を持つカロチノイド系色素が多く含まれていることが知られており¹²⁾、これが反映したものと考えられた。以上の結果から、当該加工キュベットを用いた反射光簡易吸光度分析は、被毛、羽毛の色素源の推定にも有効と判断された。

2. 被毛の光遮蔽効果

スタンダードキュベットに被毛を入れ、190 nm-1100 nmの吸光度分析を行ったところ、比色分析装置による濁度測定などで経験する結果と同様¹⁴⁾、広範囲の波長でほぼ一定の吸光度の値を示したが、300 nm以下の紫外部では高い吸光度の値を示した (Fig. 2)。可視・赤外光域の吸光度の平均値を、測定に使用した被毛の乾燥重量で除

し、可視・赤外光遮蔽率を算出したところ、被毛の色に関係なく、太さと可視・赤外光遮蔽率との間に負の相関関係が認められた (Fig. 3)。

3. 被毛反射光の簡易吸光度分析

「材料と方法」2bのように加工したキュベットに、Fig. 4上写真 (A-G) のヒト、イヌ及びネコ被毛を入れ、反射光簡易吸光度分析を実施した。イヌの黒、茶、白色の被毛の反射光簡易吸光度分析の結果、黒色及び茶色の被毛では、480-500 nm近傍に吸収極大を示し、薄茶またはこげ茶色の被毛では、長波長側の吸光度が高くなった。白色被毛では、このような吸収極大はほとんど認められなかった。ネコの黒茶の被毛では赤外域の1100 nmから500 nm付近まで吸光

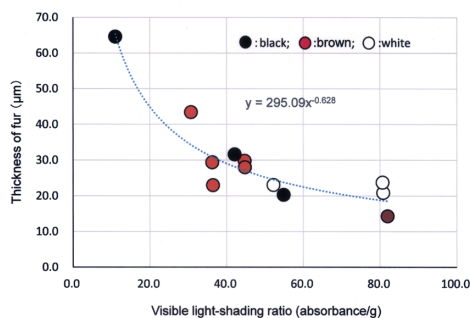


Fig. 3 Relationship between the visible light-shading ratio and thickness of animal hair.

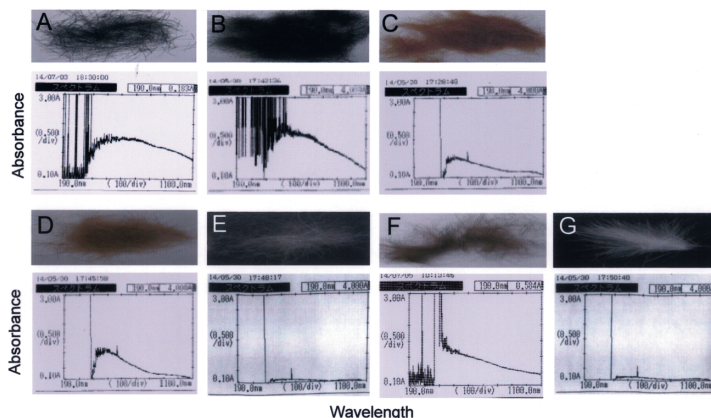


Fig. 4 Simplified optical analysis of pigments in animal hair.

A: human (black hair); B: dog (black hair); C: dog (brown hair); D: dog (light brown hair); E: dog (white hair); F: cat (black and brown hair); G: cat (white hair)

度は次第に高くなり、380-400 nm間で著しい上昇が見られた (Fig. 4)。

4. 被毛の光学顕微鏡観察

イヌ及びネコ被毛の光学顕微鏡観察を、透過照明で実施したところ、髄質部に黒色被毛では黒色の、茶色被毛では茶色の色素分布が確認された。白色被毛では、髄質部が黒く観察された。落射照明では、黒色被毛及び茶色被毛では透過照明同様、髄質部に黒色または茶色の色素が確認されたが、白色被毛では白かった。ネコの細い白色被毛の光学顕微鏡観察を、透過照明で実施したところ、イヌに比べて表面の毛表皮構造が複雑で、皮質と髄質部の区別ができにくく、落射照明では被毛表皮からの反射が強かった (Fig. 5)。

5. 鳥羽毛の落射、透過照明による肉眼観察と反射光簡易吸光度分析

インコ、ハト、カラスの羽毛についても落射及び透過照明で観察したところ、インコ羽毛は、落射照明では濃い緑色であったが、透過照明ではわずかに黄色の混じった黒または灰色であった。ハト羽毛の落射照明ではこげ茶色にうすい灰色の混じった色で、透過照明では茶色であった。カラス羽毛の落射照明では濃い黒色であったが、透過照明では茶色または紫がかった黒色であった (Fig. 6上)。被毛と同様、鳥羽毛も方法2bのように加工したキューベットに入れて、反射光簡易吸光度分析を行ったところ、インコ羽毛とハト羽毛については、赤外域の1100 nmから

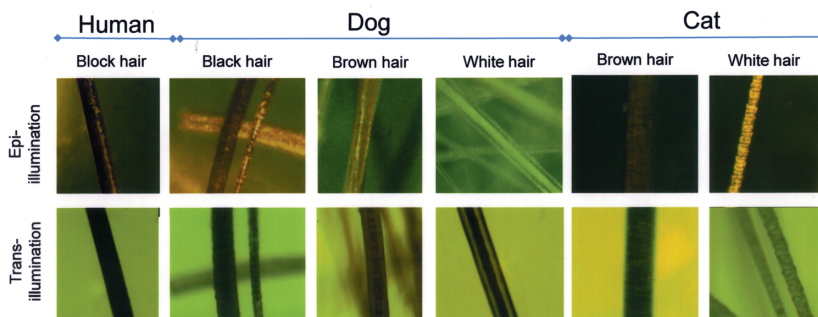


Fig. 5 Observation of hair by optical microscopy with epi- or transillumination. Upper: vertical illumination; Lower: transmission illumination.

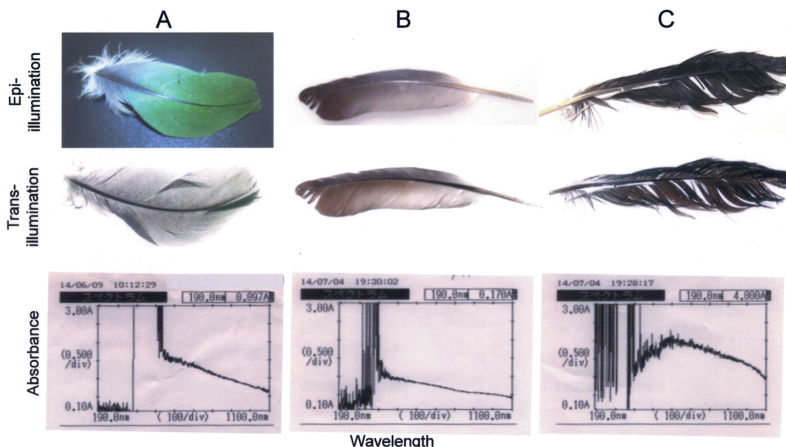


Fig. 6 Color observation and simplified optical analysis of bird feather. A: parrot; B: pigeon; C: crow, Upper: epillumination; Middle: transillumination; Lower: simplified optical analysis.

可視域にわたって次第に吸光度が増し、600-700 nm近傍に僅かにショルダーが見られ、インコ羽毛では380-520 nm付近、ハト羽毛では380-400 nm付近で吸光度が急上昇し、この波長域に吸収極大があることが示唆された。カラス羽毛では、500-600 nm近傍に吸収極大が認められた (Fig. 6下)。

IV. 考察

動物は表皮によって波長や熱量の異なる紫外、可視、赤外光などさまざまな光をブロックし、外界の環境の激変から身を守っている。表皮に照射された光は、「反射光」「吸収光」「透過光」のいずれかに分割されるが、「反射光」「吸収光」は、その物体を透過することなく、いわゆる遮蔽される。まず、ヒト、イヌ、ネコの被毛の光の遮蔽の様子を、紫外可視分光光度計を用いて、吸光度分析したところ、200-300 nmの紫外光は容易に遮蔽された (Fig. 2)。このときの可視領域の吸光度の平均値から、被毛1gあたりの遮蔽率を算出したところ、動物種によって著しい違いが認められた。しかし、可視・赤外光の遮蔽率は、被毛の色とは余り関係がなく、太さと負の相関関係が認められたことから、同じ乾重量の被毛では、細い被毛ほどキューベット内の被毛密度が高くなり、遮蔽率が高まるものと考えられた (Fig. 3)。次に、被毛によって遮蔽される光成分の簡単な吸光度分析のために、スタンダードキューベットに「材料と方法」の2bのような加工を加えた。この加工キューベットを用いた吸光度分析の妥当性をさぐる予備実験のために、加工キューベットに植物の葉をそのまま投入し、葉からの反射光の吸光度分析を行ったところ、葉の粗抽出液と同様、クロロフィル色素に相当する吸収極大が得られ (Fig. 1C中央)、動物被毛や羽毛に含まれる色素の簡易分析にも使用可能であると考えられた。そこで当該方法を用いて、動物被毛や羽毛の反射光簡易吸光度分析を行ったところ、ヒトやイヌの黒色や茶色の被毛では、500 nm付近に吸収極大が認められた (Fig. 4)。ヒトやイヌの被毛には500 nm付近に吸収極大があるメラニン色素が含まれていることが知られている¹⁵⁾。メラニンには黒いユーメラニン (eumelanin) と茶色のフェオメラニン (pheomelanin) の2種類があり、フェオメラニ

ンのほうがユーメラニンに比べて、紫外線照射等による劣化によって、吸収極大 (500 nm) の長波長側が低下しやすい¹⁶⁾。茶色被毛のメラニンの吸収極大の長波長側の吸光度が、黒色被毛より低くなっているのは、このことに起因しているものと考えられ、今回我々が実験に供したイヌ被毛は、すでに紫外線等の曝露の影響を受けて劣化しているものと考えられた。ヒトやイヌの黒色や茶色の被毛の落射、透過照明観察によって、毛皮質や髄質部にメラニン色素の存在が認められたが、イヌの白色被毛の落射照明では髄質部が白色に見え、透過照明では黒色に見えたことから、毛髄質でほとんどの光を反射しているものと考えられた (Fig. 5)。今回、反射光簡易吸光度分析によって、被毛のユーメラニンやフェオメラニンによる光の吸収が確認されたものの、光遮蔽率に、被毛の色による差はほとんど認められなかったことから、光の遮蔽には被毛の「吸収」より「反射」が大きく寄与していることが推察され、光反射にかかわる被毛の表面構造や髄質部の空洞壁の構造の特徴などを解明する必要があると考えられた。

黒茶のネコ被毛では、500 nm付近に吸収極大を持つユーメラニンの吸収スペクトルのほかに、イヌの茶色の色素 (フェオメラニン) とは異なる、380-400 nm付近に吸収極大を持つ茶色色素が含まれている可能性が示唆された (Fig. 4F)。ネコ被毛の色や模様にかかわる遺伝子が特定され、発現のメカニズムが明らかにされつつあるが¹⁷⁾、ネコのメラニン系色素の特性や発現のメカニズムについて、さらに、研究を進める必要があると考えられた。また、ネコ白色被毛の表面はイヌ被毛の表面に比べて複雑な構造をしており、イヌ被毛より光を多く反射すると考えられた (Fig. 5)。

鳥羽毛の色については、その鮮やかさゆえ、特にインコの羽毛の色素や構造色による発色のメカニズムについて詳しく研究された^{18,19)}。その結果、2つの色素 (メラニンとシッタコフルビン、psittacofulvin) と海綿状構造や気泡の配置で、さまざまな鮮やかな色彩をなすことが明らかにされている。緑色インコ羽毛にも、380 nmに吸収極大を持つシッタコフルビン色素の存在が報告されているが、今回落射照明で濃い緑色に見えたインコ羽毛も、透過照明ではわずかに

黄色の混じった黒または灰色で、反射光簡易吸光度分析でも、380-520 nm間に吸収極大が認められ (Fig. 6)、主な色素としてシッタコフルビンを含むものと考えられた。また、ハト羽毛でも380-400 nmに吸収極大があり、シッタコフルビン色素を含むのではないかと考えられた。黒色カラス羽毛の色素は、ほとんどが500-600 nmに吸収極大があるメラニン色素であるが、インコやハト同様、380-400 nmに吸収極大があり、ごく微量のシッタコフルビン色素を含むのではないかと考えられた。

V. 結語

紫外可視分光光度計を用いて、イヌやネコ被毛や鳥羽毛の光遮蔽や吸収波長に関する分析を行った。特に被毛や羽毛の乾式での吸光度分析のために、キュベットに簡単な加工を施し、反射光簡易吸光度分析法を考案し、実施した。これらの分析の結果、イヌやネコ被毛の光遮蔽能は、被毛密度が高いほど高くなることが明らかとなった。また、ヒト、イヌ被毛やカラス羽毛にはユーメラニンやフェオメラニンと一致する吸収極大が認められ、ネコ被毛には、380-400 nm付近にイヌのフェオメラニンとは異なる吸収極大が認められた。インコ羽毛には380-400 nm付近にシッタコフルビンと一致する吸収極大が認められ、ハトやカラス羽毛にも微量のシッタコフルビンが含まれる可能性が示唆された。

文献

- 小林静子: 紫外線B波照射による皮膚障害とその予防・治療 - γ -Tocopherol誘導体塗布の効果 - . YAKUGAKU ZASSHI, 126: 677-693, 2006.
- 小川文秀, 佐藤伸一: 酸化ストレスと皮膚 - 光老化から全身強皮症まで. 日本臨床免疫学会会誌, 29: 349-358, 2006.
- Castelhano-Carlos MJ, Baumans V: The impact of light, noise, cage cleaning and in-house transport on welfare and stress of laboratory rats. Lab Animal, 43: 311-327, 2009.
- Pirchl M, Kemmler G, Humpel C: Female Sprague dawley rats show impaired spatial memory in the 8-arm radial maze under dim blue and red light. Int J Zool, 2010: Article ID 507524, 2010.
- Wright HR, Lack LC, Kennaway DJ: Differential effects of light wavelength in phase advancing the melatonin rhythm. J Pineal Res, 36: 140-144, 2004.
- Cho S, Shin MH, Kim YK, Seo Jo-E, Lee YM, Park Chi-H, Chung JH: Effect on infrared radiation and heat on human skin aging in vivo. J Invest Derm Symp P, 14: 15-19, 2009.
- 高田 実: メラノーム研究の最近の進歩. 信州医誌, 55: 3-9, 2007.
- 山ノ下理, 坪井秀夫, Hossain Khaled, 大神信孝: UVによる皮膚がん進行に対する色素沈着過剰皮膚の防御効果. 日本衛生学雑誌, 62: 515, 2007.
- Samata T, Matsuda M: Studies on the amino acid compositions of the equine body hair and the hoof. Jpn J Vet Sci, 50: 333-340, 1987.
- Lingham-Soliar T, Murugan N: A new helical cross-fiber structure of β -keratin feathers and its biomechanical implications. PLOS ONE, 8(6): e65849. doi: 10.1371, 2013.
- D'Alba L, Kieffer L, Shawkey MD: Relative contributions of pigments and biophotonic nanostructures to natural color production: a case study in budgerigar (*Melopsittacus undulatus*) feathers. J Exp Biol, 215: 1272-1277, 2013.
- Inada K: Spectral absorption property of pigment in living leaves and its contribution to photosynthesis. Jpan Jour Crop Sci, 49: 286-294, 1980.
- 池上 勇: 4. タンパク質複合体の単離 g. 光化学系Iコアクロロフィルaの分別抽出法. 低温科学, 67: 309-313, 2009.
- 小川善資: <資料: 分析機器・試薬アナリスト認定講座 (その7) > 比色分析装置の基礎. 生物試料分析, 36: 273-280, 2013.
- Slominski A, Wortsman J, Plonka PM, Schallreuter KU, Paus R, Tobin DJ: Hair follicle pigmentation. J Invest Dermatol, 124: 13-21, 2005.
- Ou-Yang H, Stamatas G, Kollias N: Spectral responses of melanin to ultraviolet a irradiation. J Invest Dermatol, 122: 492-496, 2004.
- Schmidt-Küntzel, Eizirik E, O'Brien SJ, Menotti-Raymond M: *Tyrosinase* and *Tyrosinase related protein 1* alleles specify domestic cat coat color phenotypes of the *albino* and *brown* loci. J Hered, 96: 289-301, 2005.
- Masello JF, Lubjuhn T, Quillfeldt P: Is the structural and psittacofulvin-based coloration of wild burrowing parrots *Cyanoliseus patagonus* condition development? J Avian Biol, 39: 653-662, 2008.
- Tinbergen J, Wilts BD, Stavenga DG: Spectral tuning of Amazon parrot feather coloration by psittacofulvin pigments and spongy structure. J Exp Biol, 216: 4358-4364, 2013.