

〈原著〉

ニワトリとウズラ卵殻の プロトポルフィリンとビリベルジン分布

岡崎登志夫、宮井紗弥香

Distribution of protoporphyrin and biliverdin in chicken and quail eggshells

Toshio Okazaki and Sayaka Miyai

Summary Eggshell pigments consist of protoporphyrin (Pp) and biliverdin (Bv). Pp has phototoxic properties and Bv has antioxidative properties. In this study, we tried to clarify the distribution and the role of eggshell pigments. White, brown, and blue colored chicken eggshells and quail eggshells were dissolved in a hydrochloric acid-methanol mixture. The spectra of the resultant solutions matched those of Pp disodium salt and Bv preparations, and so the pigments in the eggshells were confirmed to be Pp and Bv. Using these preparations, the eggshell pigments were quantitatively analyzed. The white chicken eggshells contained small amount of pigments, the brown eggshells contained large amount of Pp, and the blue eggshells contained large amount of Bv. The quail eggshells contained large amounts of Pp and Bv. From these results, it was considered that the color of the chicken eggshells was dependent on the ratio of Pp and Bv concentrations. In the cuticle layer of the quail eggshells, Pp was found together with Bv, and they had formed dark brown lumps. The surfaces of the brown chicken eggshells and the quail eggshells were gradually dissolved, before being irradiated with ultraviolet A. Then, their red fluorescence spectra were compared to analyze the amounts of photooxidized Pp (P-Pp) and unphotooxidized Pp (Pp) present in the eggshells. The brown chicken eggshells contained more P-Pp than Pp. However, the quail eggshells contained more Pp than P-Pp. Photooxidation of Pp might be inhibited by Bv, because Bv has antioxidative activity and Pp is together with Bv in the cuticle layer of quail eggshells.

Key words: Chicken, Quail, Eggshell, Protoporphyrin, Biliverdin, Photooxidation

ヤマザキ学園大学
〒192-0364 東京都八王子市南大沢4-7-2

Yamazaki Gakuen University
Minami-osawa 4-7-2, Hachiouji, Tokyo 192-0364,
Japan
受付日：2017年2月21日
採択日：2017年3月27日

I. 緒言

鳥卵殻表面のクチクラ層は細菌侵入を防ぐ働きがある¹⁾。また、卵殻色素は外敵の目から逃れるために発達したとされ^{2),3)}、褐色色素源はプロトポルフィリン (Pp)、青色色素源はビリベルジン (Bv) で⁴⁾⁻⁶⁾、子宮部で卵殻に供給されることが知られている⁷⁾。PpとBvは、ヒトなど哺乳動物においては、ヘモグロビンの生合成や分解過程における重要な中間代謝産物である⁸⁾。すなわち、Ppは、ミトコンドリア内でグリシンとサクシニルCoAを出発物質として、 δ -ALA (δ -aminolevulinic acid) などの中間代謝物を経て産生され、Bvは、ヘムオキシゲナーゼ-1 (HO1) による鉄結合Pp (ferriprotoporphyrin IX) の分解によって産生され、抗酸化作用があることが知られている⁹⁾。近年、固形がんはPpが集積しやすいことが明らかにされた^{10),11)}。Ppは光毒性を有し、近紫外光 (UVA) 照射によって活性酸素を産生し、赤色蛍光を発することが知られている^{12),13)}。また、光酸化を受けたフォトプロトポルフィリン (P-Pp) は、Ppに比べて一層鮮やかな赤色蛍光を発し、がん細胞を発見するツールとして注目されている^{14),15)}。このようにPpとBvに関連した新たな知見が蓄積されつつある現在、鳥卵殻におけるPpとBvの分布や光酸化度から、それらの色素の果たす役割の一端を明らかにすることを目的として実験を行なった。

我々は、白色、褐色、青色のニワトリ卵及びウズラ卵の卵殻色素を抽出し、吸光度分析を行ない、卵殻表面と内部のPpとBv分布について解析した。また、近年がん研究で明らかにされたPpIXに関する知見を参考に、UVA照射による赤色蛍光の反射スペクトルの違いから、各卵の外側と内側のPpの光酸化度について比較検討を行なった。

II. 材料と方法

(a) 材料

ニワトリ (*Gallus gallus domesticus*) の白色 (レグホン種)、褐色 (ボリスブラウン種)、青色 (アローカナ種) 卵とウズラ (*Coturnix japonica*) 卵を用いて検討を行なった。卵殻色素の分析に先

立って、各卵の全重量及び卵殻重量を測定した。

(b) 卵殻クチクラ層のタンパク質定量

白色、褐色、青色のニワトリ卵1個を50 mLの2N NaOH水溶液に24時間浸漬し、卵殻クチクラ層のタンパク質を溶出し、この溶出液を2N HClで中和した後、タンパク質濃度をビウレット法で求め、卵1個あたりの卵殻クチクラ層のタンパク質量を算出した。ウズラの場合は、卵1個を25 mLの2N NaOH溶液で溶出し、2N HCl溶液で中和後、溶出液のタンパク質濃度をビウレット法で測定した。

(c) 卵殻色素の吸収スペクトル分析及びプロトポルフィリンとビリベルジンの定量

プロトポルフィリン・2Na塩 (東京化成, 東京, 日本) とビリベルジン (SIGMA, St Louis, USA) 標品の一定量を塩酸・メタノール (3:4) 混合液に溶解し、株式会社島津製作所のUVmini-1240紫外可視分光光度計を用いて、280-800 nm間の吸収スペクトル分析を行った。次に、各卵1個を塩酸・メタノール (3:4) 混合液35 mLに浸漬し、卵殻を溶解させ、卵殻色素を抽出した。この抽出液を3000 rpmで10分間遠心し、上清について、吸収スペクトル分析を行い、卵殻色素の同定及び定量を行った。

(d) 近紫外線照射時の卵殻からの赤色蛍光スペクトル分析

Ppとその光酸化物質・P-Ppは、UVA照射によって、それぞれ630 nmと680 nmの吸収極大波長の赤色蛍光スペクトルを発することが知られている¹⁶⁾。Ppを多く含むニワトリ褐色卵とウズラ卵の卵殻を塩酸・メタノール (3:4) 混合液で位置をずらしながら少しずつ溶解させて削りとり、クチクラ層 (outermost layer) から少しずつ深度の異なる卵殻部を露出させた。暗箱の中で、それぞれ深度の異なる露出卵殻部にUVA (368 nm) を照射し、浜松フォトンクス社のミニ分光器C11009MA (浜松, 静岡, 日本) で蛍光のスペクトル分析を行った。卵殻からの蛍光スペクトル強度は相対反射比率 (A/D Count Ratio) で示した。

Ⅲ. 結果

A. ニワトリ、ウズラの卵総重量、卵殻重量及びクチクラ層のタンパク質量の比較

今回、実験に用いたニワトリの卵総重量は、白色卵がもっとも重く、平均 66 ± 2.4 g、次いで褐色卵が平均 61 ± 5.5 g、青色卵が平均 54 ± 1.8 gであった。卵殻重量はそれぞれ平均 5.7 ± 0.41 、 4.9 ± 0.37 、 5.0 ± 0.38 gで、卵総重量の8～10%が卵殻重量であった。ウズラ卵総重量は平均 11 ± 1.0 g、卵殻重量は平均 0.97 ± 0.06 gで、ニワトリとほぼ同じく卵総重量の約10%が卵殻重量であった。ニワトリのクチクラ層のタンパク質量も卵総重量と同様白色卵がもっとも多く、次いで褐色卵、青色卵の順であった。ウズラの卵総重量が小さかったが、卵1個あたりのクチクラ層のタンパク質量は、ニワトリ卵のタンパク質量とほぼ同じレベルであった (Fig. 1)。

B. ニワトリ、ウズラの卵殻色素分析

プロトポルフィリン・2Na塩とBv標品を塩酸・メタノール混合溶液に溶解し、紫外・可視分光

光度計で280-800 nmの分光分析を実施した (Fig. 2A)。その結果、プロトポルフィリン・2Na塩では412 nmに主ピークが、557 nmと601 nmに副ピークが認められ、Bv標品では376 nmに主ピークが、670 nmにブロードな副ピークが認められた。次に、ニワトリ、ウズラ卵殻の塩酸・メタノール溶解液上清の分光分析を行ったところ、いずれの卵殻でもプロトポルフィリン・2Na塩の主ピークと一致する412 nmに主ピークが認められた (Fig. 2B, C)。ニワトリ卵殻の主ピークは褐色卵で最も高く、次いで青色卵、白色卵の順であった。412 nmの主ピークが高い褐色卵や青色卵やウズラ卵では557 nmと601 nmに副ピークも認められ、プロトポルフィリン・2Na塩標品の吸収スペクトルと完全に一致した。また、青色卵やウズラ卵では376 nmと670 nmにピークが認められ、Bv標品の吸収スペクトルと一致した。

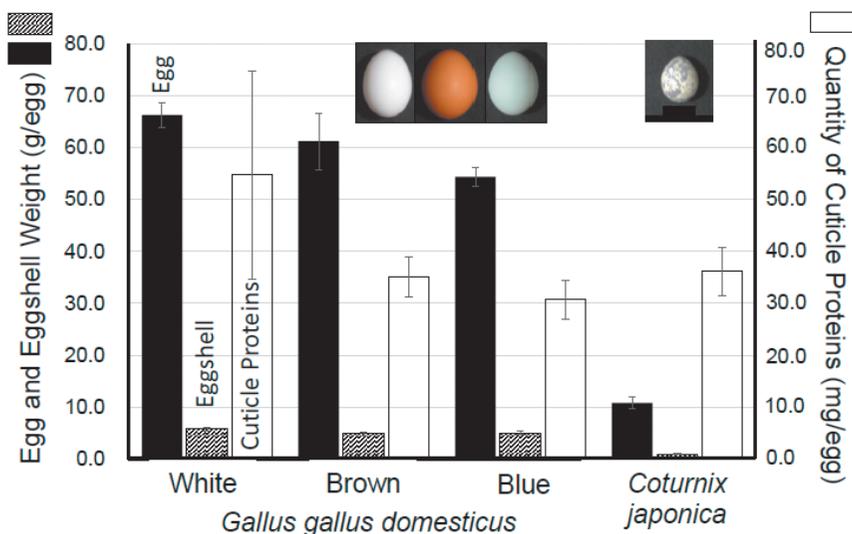


Fig. 1 Comparison of whole egg, eggshell and cuticle protein weight per one egg of chicken (*Gallus gallus domesticus*) and quail (*Coturnix japonica*).

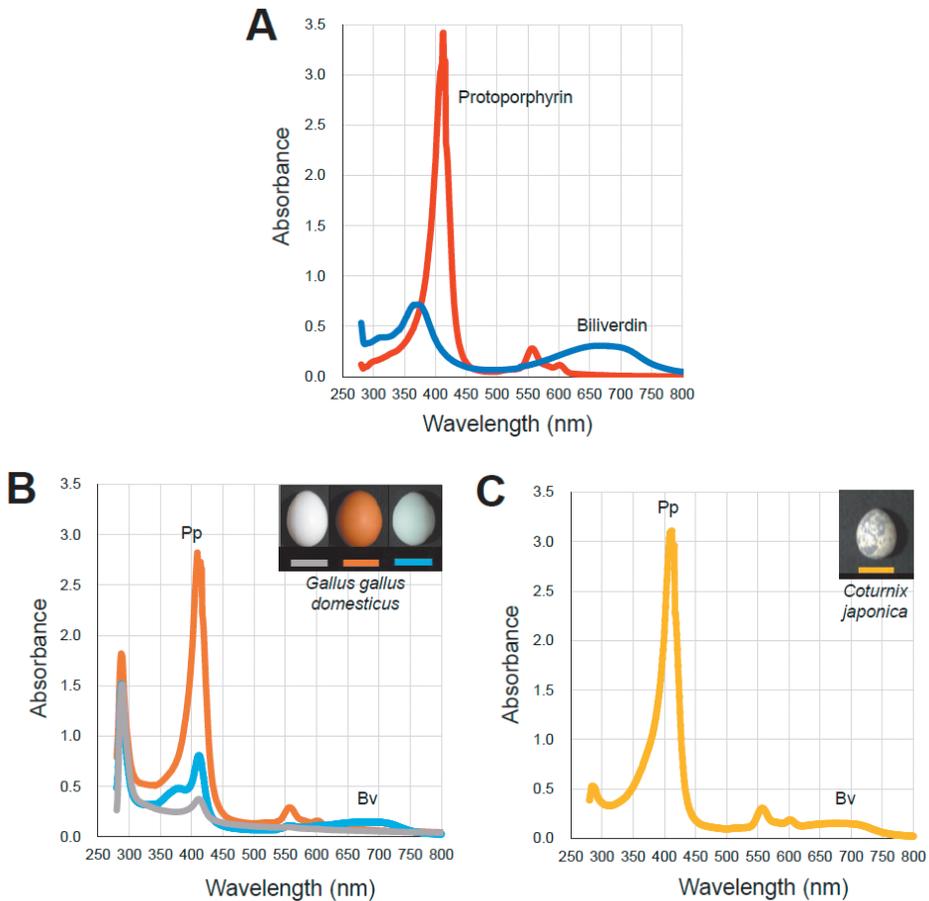


Fig. 2 Spectrophotometric analysis of eggshell pigments.

A: spectra of protoporphyrin (red line) and biliverdin (blue line) preparations; B: spectra of chicken eggshell pigments (gray line: white eggshell; brown line: brown eggshell; blue line: blue eggshell); C: spectrum of quail eggshell pigments.

C. ニワトリ、ウズラ卵殻のプロトポルフィリン (Pp) 量とビリベルジン (Bv) 量の比較
 ニワトリ、ウズラ卵1個あたりの卵殻のPp量とBv量を比較すると、ニワトリ白色卵殻ではPpは $14.6 \pm 5.23 \mu\text{g/egg}$ 、Bvは $2.33 \pm 1.01 \mu\text{g/egg}$ で両方とも極めて少なかった。褐色卵殻ではPpは $288 \pm 96.9 \mu\text{g/egg}$ 、Bvは $2.63 \pm 1.01 \mu\text{g/egg}$ でPpが著しく多く、青色卵殻ではPpは $28.2 \pm 11.5 \mu\text{g/egg}$ 、Bvは $192 \pm 7.89 \mu\text{g/egg}$ で、Bvが多かった。ウズラ卵殻ではPpは $193 \pm 36.3 \mu\text{g/egg}$ 、Bvは $122 \pm 28.6 \mu\text{g/egg}$ で両方が多かった (Fig. 3A)。ニワトリ褐色、青色卵殻の外側と内側のBv/Pp比率について比較したところ、ニワトリ褐色卵殻やニワトリ青色卵殻では、外

側と内側で大きな差はなかったが、ウズラ卵殻ではクチクラ層を含む外側のBv/Pp比は、外側が低く内側が高かった (Fig. 3B)。また、ニワトリ青色卵殻とウズラ卵殻について、2N水酸化ナトリウムで、卵表面のクチクラ層を可溶化して取り除き、分光分析を行ない、さらに塩酸・メタノールで、卵殻の外側と内側とに分けて可溶化し、分光分析を行ったところ、ニワトリ青色卵殻では、BvとPp分布が、各層でほとんど変わらなかったが (Fig. 3C)、ウズラではクチクラ層を取り除くと、BvとPpが急激に減少した (Fig. 3D)。

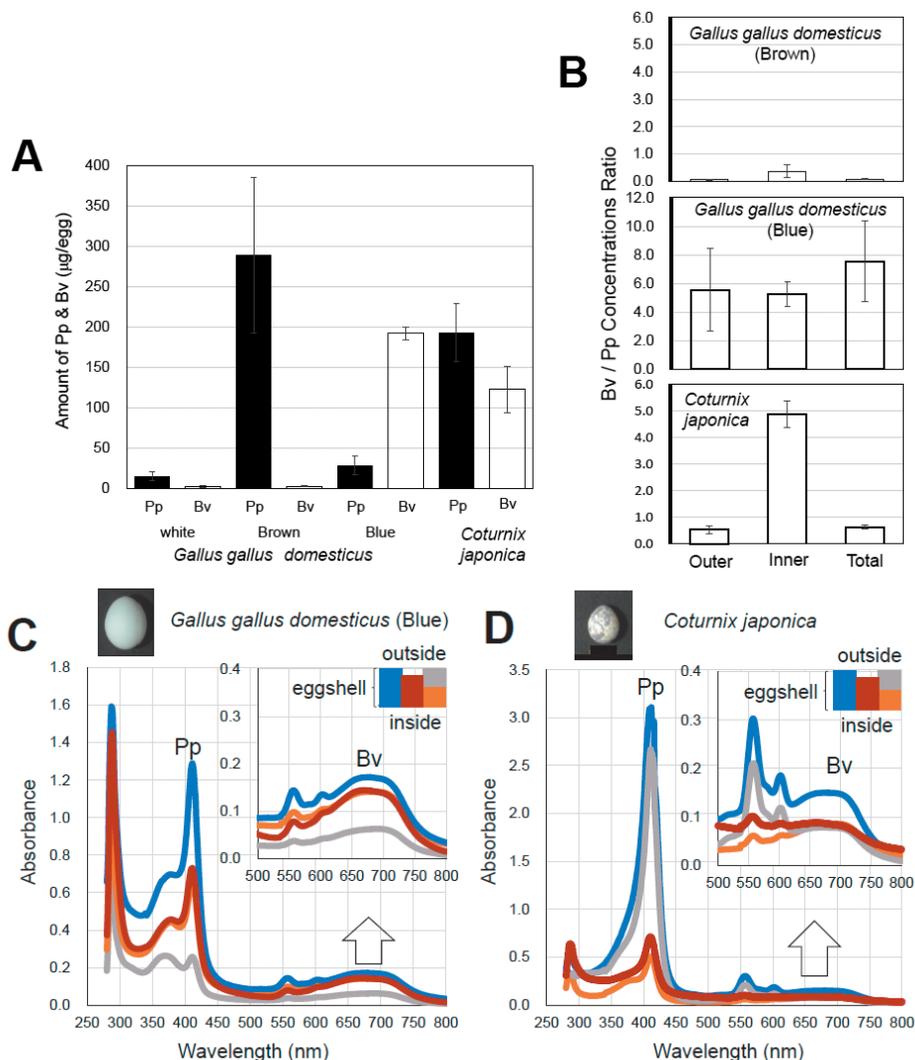


Fig. 3 Quantitative spectral analysis of chicken and quail eggshell pigments.

A: comparison of the quantities of Pp and Bv in the chicken and quail eggshells; B: comparison of the Bv/Pp ratio between the outer and inner parts of the eggshells (top: brown chicken egg; middle: blue chicken egg; bottom: quail egg); C and D: spectral analysis of the pigments in the part of the blue chicken and quail eggshells (blue line: whole eggshell; brown line: eggshell without cuticle layer; gray line: outer layer of the eggshell; orange line: inner layer of the eggshell). Blue, brown, gray and orange boxes in the upper right corner indicate the extraction parts within the eggshell, and the extraction's spectrum was shown with the same color, respectively.

D. ニワトリ、ウズラ卵殻の赤色蛍光の反射分光分析

各卵の卵殻表面にUVAを照射すると赤色蛍光を反射した (Fig. 4A)。赤色蛍光反射の強いニワトリ褐色卵とウズラ卵の卵殻表面を、塩酸・メタノール (3:4) 混合液で少しずつ位置をずらしながら溶かす操作を数回行った。その結果

得られた深度の異なる卵殻表面 (Fig. 4B, C a-d) に、UVAを照射したときの、赤色蛍光の反射分光分析を行った。ニワトリ、ウズラ卵の最外殻における赤色蛍光反射度 (A/D Count) は低かったが、塩酸・メタノールで表面を溶解すると高くなった。ニワトリ褐色卵の最外殻では極大波長635 nmのPpの高さに比べて極大波

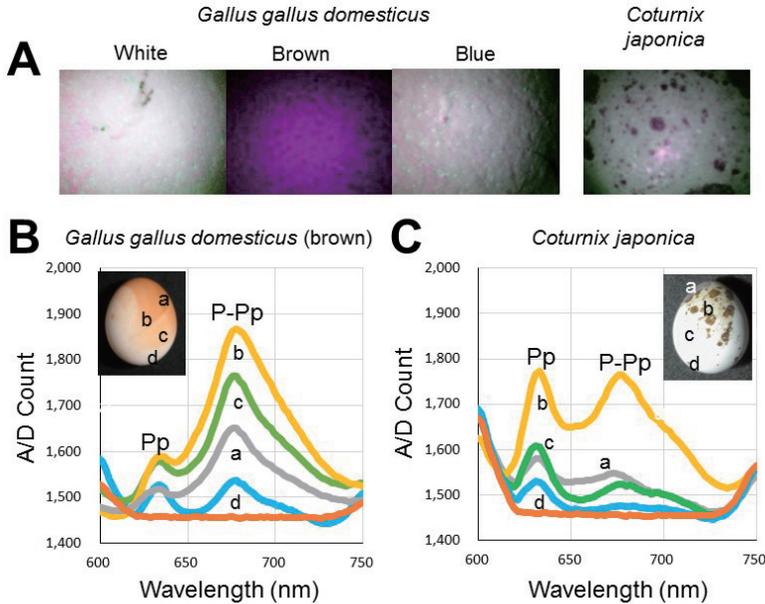


Fig. 4 Spectrophotometric analysis based on the red fluorescence reflected from the eggshell surface.

A: The chicken and quail eggshells were irradiated with UVA, and photos were taken using a CCD camera. B and C: Spectral analysis of the brown chicken eggshells and quail eggshells. The eggshell surfaces were gradually dissolved with HCl-MetOH solution (a: none of outermost layer dissolved; b, c: middle layer; d: inner layer). Spectra a-d were obtained at locations a-d on the eggshell surface under UVA irradiation. The orange lines indicate the reference data from the silica gel plate.

長670 nmのP-Ppの高さが高く、卵殻深度が深くなるに連れて、P-Ppの割合が低下した (Fig. 4B)。ウズラ卵殻ではPpの高さに比べてP-Ppの高さは低く、卵殻深度が深くなるに連れて、その傾向は一層顕著になった (Fig. 4C)。

IV. 考察

鳥の卵殻色素がPpとBvであることは古くから知られていた⁴⁾。しかし、その卵殻色素については、主に外敵に対するカモフラージュという機能的意義が注目され^{2),3)}、その生化学的意義や卵殻色素の生合成機構に関する知見は未だ充分ではない。ヒトのPpについては、近年、がん細胞に集積しやすいことが明らかになり、がんの早期発見や治療法開発の観点から、 δ -ALAからPpへの代謝やPpの光酸化やUVA照射による自家蛍光などさまざまな研究が進められ、Ppに関するフォトダイナミック検査 (PDD) やフォトダイナミック療法 (PDT) に関連する知見が著しく拡大した¹⁰⁾⁻¹⁵⁾。今回これらの知見

を参照しながら、鳥卵殻色素の分光分析を行なった。ニワトリの白色卵殻にはごく少量のPpとBvが、褐色卵殻には白色卵殻に比べて多量のPpが、青色卵殻には多量のBvが分布し、黒色斑点模様ウズラの卵殻には、PpとBvの両方が多く分布し (Fig. 3)、鳥卵殻の色はPpとBvの含有比率に依存して変化するものと考えられた。各色の卵殻の外側と内側の色素分布を比較してみると、ニワトリでは明らかな差は認められなかったが、ウズラでは、外側のクチクラ層にPpとBvが多く分布していた。光酸化によって、極大波長635 nmのPpが、極大波長670 nmのP-Ppに変化することが知られている¹⁶⁾。このことから、Ppが多く含まれるニワトリ褐色卵殻とウズラ卵殻の反射分光分析を行い、Ppの光酸化度比較を行なった (Fig. 4)。塩酸・メタノールで僅かずつ表面を削りながら、635 nmと670 nmの反射光強度の変化を確認したところ、褐色卵では内側になるほど670 nmのピークが低くなり、P-Ppの割合が低下することが明らかとなった。しかし、ウズラ卵では、Ppが、外

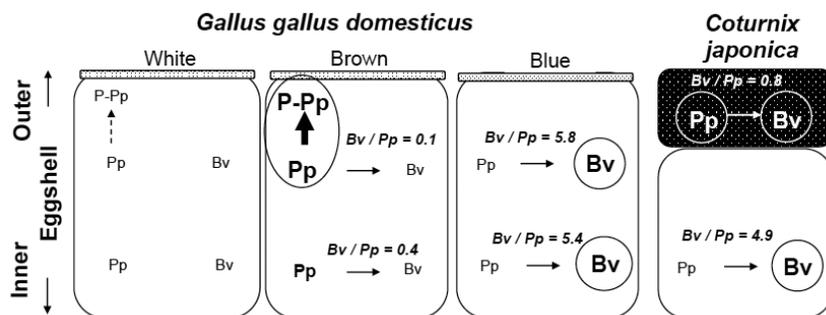


Fig. 5 Pigment distribution map of the chicken and quail eggshells

The quantitative distributions of Pp, P-Pp, and Bv within the white, brown, blue chicken eggshells and the quail eggshells are shown on the map. Larger letters indicate larger amounts of pigment. The upper layer of each eggshell was the cuticle layer. Bv/Pp ratios were calculated from the data shown in Fig. 3.

側のクチクラ層に多く分布するにもかかわらず、光酸化の度合いが低かった。これは、ウズラ卵殻のPpは、抗酸化作用を有するBvと塊になっているため、光酸化が抑制されているのではないかと考えられた (Fig. 5)。

がん研究からPp、Bv代謝に関わるHO1活性は、亜鉛を包摂したZn-Ppによって阻害されることが知られている¹⁷⁾。今回明らかになった卵殻色素のPpとBv分布について考察してみると、鳥卵殻に含まれる重金属は、鉄がもっとも多く、次いで亜鉛であることから¹⁸⁾、Ppに包摂される重金属・鉄、亜鉛の違いによってHO1活性が調節され、卵殻におけるPp、Bv分布の違いが生じているのではないかと考えられた (Fig. 5)。また、卵殻外側に多く分布するPpは、活性酸素発生による抗菌作用の役割を担い¹⁹⁾、内側に多く分布するBvは、抗酸化作用を担っているのではないかと考えられた。

文献

- Rose-Martel M, Du J, Hincke MT: Proteomic analysis provides new insight into the chicken eggshell cuticle. *J Proteomics*, 75: 2697-2706, 2012.
- Cassey P, Thomas GH, Portugal SJ, Maurer G, Hauber ME, Grim T, Lovell PG, Mikšik I: Why are bird' eggs colourful? Eggshell pigments co-vary with life-history and nesting ecology among British breeding non-passerine birds. *Biol J Linn Soc*, 106: 657-672, 2012.
- Hubbard JK, Uy JAC, Hauber ME, Hoekstra HE, Saffran RJ: Vertebrate pigmentation: from underlying genes to adaptive function. *Trends Ecol Evol*, 26: 231-239, 2010.
- Mikšik I, Holáň V, Deyl Z: Avian eggshell pigments and their variability. *Comp Biochem Physiol*, 113B: 607-612, 1996.
- Wang XT, Zhao CJ, Li JY, Xu GY, Lian LS, Wu CX, Deng XM: Comparison of the total amount of eggshell pigments in Dongxiang brown-shelled eggs and Dongxiang blue-shelled eggs. *Poult Sci*, 88: 1735-1739, 2009.
- Zhao R, Xu G-Y, Liu Z-Z, Li J-Y, Yang N: A study on eggshell pigmentation: Biliverdin in blue-shelled chickens. *Poult Sci*, 85: 546-549, 2006.
- Sparks NHC: Eggshell pigments – from formation to deposition. *Avian Biol Res*, 4: 162-167.
- 矢富 裕、横田 浩充編: 矢富 裕他: 血液検査学. 第1版第1刷, 16-17, 医学書院, 東京, 2012.
- Jansen T, Daiber A: Direct antioxidant properties of bilirubin and biliverdin. Is there a role for biliverdin reductase? *Front Pharmacol*, 2012 Mar 16;3:30. Doi:10.3389/fphr.2012.00030.
- Krieg RC, Ficweiler S, Wolfbeis OS, Kneuchel R: Cell-type specific protoporphyrin IX metabolism in human bladder cancer in vitro. *Photochem Photobiol*, 72: 226-233, 2000.
- Constantin C, Neagu M: Fluorescent porphyrin with an increased uptake in peripheral blood cell subpopulations from colon cancer patients. *Med Chem*, 11: 354-363, 2015.
- Nakai K, Motten AG, Chignell CF: An in vivo study of free radicals generated in murine skin by protoporphyrin IX and visible light. *Photochem Photobiol*, 82: 738-740, 2006.
- Menon IA, Persad S, Haberman HF: A comparison of the phototoxicity of protoporphyrin, coproporphyrin

- and uroporphyrin using a cellular system in vitro. *Clin Biochem*, 22: 197-200, 1989.
- 14) Ebihara A, Krasieva TB, Liaw L-H L, Fago S, Messadi D, Osann K, Wilder-Smith P: Detection and diagnosis of oral cancer by light-induced fluorescence. *Laser Surg Med*, 32: 17-24, 2003.
- 15) Koizumi N, Harada Y, Beika M, Minamikawa T, Yamaoka Y, Dai P, Murayama Y, Yanagisawa A, Otsuji E, Tanaka H, Takamatsu T: Highly sensitive fluorescence detection of metastatic lymph nodes of gastric cancer with photo-oxidation of protoporphyrin IX. *Eur J Surg Oncol*, 42: 1236-1246, 2016.
- 16) Ma L, Bagdonas S, Moan J: The photosensitizing effect of the photoproduct of protoporphyrin IX. *J Photochem Photobiol B Biol*, 60:108-113, 2001.
- 17) Rodgers PA, Seidman DS, Wei PL, Dennery PA, Stevenson DK: Duration of action and tissue distribution of zinc protoporphyrin in neonatal rats. *Pediatr Res*, 39: 1041-1049, 1996.
- 18) Abduljaleel SA, Shuhaimi-Othman M, Babji A: Variation in trace elements levels among chicken, quail, guinea fowl and pigeon eggshell and egg content. *RJET*, 5: 301-308, 2011.
- 19) Ishikawa S, Suzuki K, Fukuda E, Arihara K, Yamamoto Y, Mukai T, Itoh M: Photodynamic antimicrobial activity of avian eggshell pigments. *FEBS Lett*, 584: 770-774, 2010.