



〈原著〉

## ニワトリ胚発育に伴う卵殻内側のプロトポルフィリンの蛍光スペクトル変化と乳頭先端部の溶解

岡崎登志夫<sup>1,2)</sup>、宮井紗弥香<sup>2)</sup>

### Changes in the fluorescence spectrum of protoporphyrin inside the eggshell and dissolution of the tip of the mammillary layer accompanied by chicken embryonic development

Toshio Okazaki<sup>1,2)</sup>, Sayaka Miyai<sup>2)</sup>

**Summary** Protoporphyrin (Pp) was distributed in the microcrystals of the tip of the mammillary layer inside the chicken eggshell. In this study, when the inside of the eggshell was irradiated with ultraviolet A and the emission red fluorescence spectrum was analyzed, the ratio of the peak height at 678 nm to the peak height at 635 nm decreased sharply in the latter half of embryonic development. When the mammillary structural change accompanied by embryonic development was observed using an optical microscope or a scanning electron microscope, the microcrystalline granules on the tip of the mammillary layer had melted. Along with this, the Pp on the mammillary surface had disappeared and the inner Pp was exposed. Hence, it was considered that the peak height of the oxidized Pp at 678 nm had decreased.

**Key words:** Embryonic development, Eggshell, Mammillary layer, Protoporphyrin

#### I. 緒言

ニワトリ卵殻の主成分は炭酸カルシウムで、胚発育期のガス交換のために多数の気孔が開いている<sup>1)</sup>。卵殻の厚さは約0.3 mmで、外側から垂直結晶層、柵状層、乳頭層など、構造の異なる各層から成り、卵殻外側はケラチン様タンパ

ク質から成るクチクラ層に被われ、内側の乳頭先端部にはケラチンファイバーの卵殻膜が接着している<sup>2)</sup>。また、卵殻にはプロトポルフィリン (Pp) やビリベルジン (Bv) などの色素が含まれており<sup>3)</sup>、これらの色素は子宮部で供給され<sup>4)</sup>、抗菌作用の役割を担っているのではないかと考えられている<sup>5)</sup>。Ppは近紫外線 (UVA)

<sup>1)</sup> ヤマザキ動物看護大学大学院、

<sup>2)</sup> ヤマザキ動物看護大学動物看護学部

〒192-0364東京都八王子市南大沢4-7-2

連絡先: 岡崎 登志夫

Tel: +81-42-689-5642

E-mail: t\_okazaki@yamazaki.ac.jp

<sup>1)</sup> Graduate School of Yamazaki University of Animal Health Technology, <sup>2)</sup> Department of Animal Health Technology, Yamazaki University of Animal Health Technology

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

受付日: 2021年12月16日

採択日: 2022年3月8日

を照射すると赤色蛍光を発生し、がん組織に蓄積しやすいため、近年、Ppによる光線力学診断や治療に関する研究が盛んに行われている<sup>6,7)</sup>。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、 $\delta$ -アミノレブリン酸などの中間代謝物を経て生成され、2価鉄を結合してヘムとなる。Bvは、ヘムオキシゲナーゼ-1によるヘム（鉄結合Pp）の分解によって産生される<sup>8,9)</sup>。これら卵殻色素の含量は、ニワトリの品種や個体によって異なっているが、卵殻の内側ほどPp含量は減少する<sup>3)</sup>。今回我々は、色の異なる白色卵、さくら色卵、褐色卵の卵殻外側と内側にUVAを照射したところ、卵殻外側の赤色蛍光強度が違っているにもかかわらず、卵殻内側表面には同程度の赤色蛍光を発生するPpが存在することを発見した。ニワトリ卵殻では、胚発育に伴って乳頭先端部の炭酸カルシウムの微小顆粒が溶解し、このカルシウムイオンが、胚発育期の骨形成の材料として使われることが報告されている<sup>10-12)</sup>。しかし、卵殻内側表面に存在するPpの役割については一切知られていない。そこで本研究では、卵殻内側のPpと胚発育に伴う乳頭先端部の溶解との関係を明らかにすることを企図した。

## II. 材料と方法

### 1. 材料

ニワトリ (*Gallus gallus domesticus*) の白色卵（レグホン種）、さくら色卵（ソニア鶏種）、褐色卵（ボリスブラウン種）を用いて検討を行った。胚発育に伴う卵殻内側の色素変化や構造変化を観察するために、褐色有精卵を温度37.5℃、湿度60%のふ卵器に入れて胚発育を開始させ、経過時間ごとにその卵殻について分析を行った。胚発育が順調に進んでいるのを確認するため、直径90 mmのシャーレに卵内容物を取り出して、発育状態を肉眼で観察するとともに、細血管の血液を採取し、塗抹標本を作製後、ライト・ギムザ染色し、光学顕微鏡観察を行った。

### 2. 光学顕微鏡を用いた卵殻の観察

各種卵殻の断面を落射照明下で観察した。また、卵殻内側を観察するために、卵殻膜をはがした卵殻を、0.7 mol/Lの水酸化ナトリウム溶液に一昼夜浸漬し、残存卵殻膜繊維を溶解除去後、

水洗し、乾燥させ、透過照明下又は落射照明下で光学顕微鏡観察を行った。

### 3. 卵殻色素の吸収スペクトル分析

各卵1個を塩酸・メタノール（3:4）混合液35 mLに浸漬し、卵殻を溶解した。この溶解液を3000 rpmで10分間遠心し、上清について、UVmini-1240紫外可視分光光度計（島津製作所、京都）を用いて、350-750 nm間の吸収スペクトル分析を行った。対照として塩酸・メタノール（3:4）混合液に35  $\mu$  mol/Lになるようにプロトポルフィリン・2Na塩（東京化成、東京）標品を溶解し、吸収スペクトル分析を行い、卵殻溶解液と比較した。

### 4. 近紫外線（UVA）照射時の卵殻の蛍光スペクトル分析

各発育段階の卵殻内側から卵殻膜を取り除いた後、UVイルミネーター UVGL-58 Handheld UV Lamp（フナコシ、東京）を用いて、UVA（368 nm）を照射し、肉眼で観察後、写真撮影を行ったり、ミニ分光器C11009MA（浜松フォトニクス、静岡）で蛍光スペクトル分析を行ったりした。これらの観察は暗室中で行った。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。

### 5. 卵殻の炭酸カルシウム微小顆粒の偏光顕微鏡観察

卵殻内側から削り取った炭酸カルシウム顆粒や、剥がした卵殻膜に付着した炭酸カルシウム顆粒について、クロスニコルで偏光顕微鏡（オリンパス株式会社、東京）観察を行った。

### 6. 卵殻内側の乳頭先端部の走査型電子顕微鏡観察

卵殻膜を剥がした各発育段階の卵殻を、0.7 mol/L水酸化ナトリウム溶液に一昼夜浸漬し、残存卵殻膜繊維を取り除き、水洗し、乾燥させた後、この卵殻内側表面に金を蒸着させ、卓上型SEM TM4000Plus（日立製作所、東京）で観察した。

## III. 結果

### 1. ニワトリ卵殻断面の光学顕微鏡観察及び卵殻色素の吸収スペクトル分析

白色卵、さくら色卵、褐色卵の卵殻断面を、落射照明下で顕微鏡観察したところ、さくら色

卵と褐色卵の卵殻では垂直結晶層に褐色色素が認められた。褐色卵の色が最も濃く、次いでさくら色卵の順であったが、いずれの卵の卵殻も、垂直結晶層、柵状層、乳頭層と表面から内部に行くにつれて色が薄くなり、乳頭層では、白色卵、さくら色卵、褐色卵の色にほとんど差が認められなかった (Fig. 1A)。これらの各卵の卵殻を塩酸・メタノール混合液で溶解し、紫外可視分光光度計で350-750 nmの吸光度分析を行ったところ、それぞれの卵殻溶解液には、400 nm付近と550-600 nm付近にピークが認められ、それらのピークの高さは褐色卵が最も高く、次いでさくら色卵、白色卵の順であった。卵殻溶解液のそれぞれのピークの波長は、同時に測定されたプロトポルフィリン・2Na塩の塩酸・メタノール溶液の400 nm付近のソーレー帯ピーク及び550-600 nm付近のQ帯ピークとほぼ一致し、卵殻色素がPpであることが確認された (Fig. 1B)。

2. ニワトリ卵殻の外側と内側のプロトポルフィリン赤色蛍光の観察

PpはUVA照射によって赤色蛍光を発することが知られているが<sup>3)</sup>、高濃度のプロトポルフィリン・2Na塩の塩酸・メタノール溶液をシリカゲルプレートに滴下して、UVAを照射し、暗室で観察すると赤色蛍光を発していた (Fig. 2B)。同様に、白色卵、さくら色卵、褐色卵の卵殻の外側と内側にUVAを照射して、暗室で観察したところ、卵殻外側の赤色蛍光の強さは、Pp含量の多い褐色卵で最も強く、次いでさくら色卵、白色卵の順であった。一方、内側の赤色蛍光は、白色卵、さくら色卵、褐色卵ともほぼ同じ強さであった (Fig. 2A)。

3. ニワトリ胚発育に伴う卵殻内側のプロトポルフィリン赤色蛍光スペクトルの変化

Fig. 2で示した通り、白色卵、さくら色卵、褐色卵の卵殻内側のPp含量には大差が認められなかったため、本研究では、ポリスブラウン

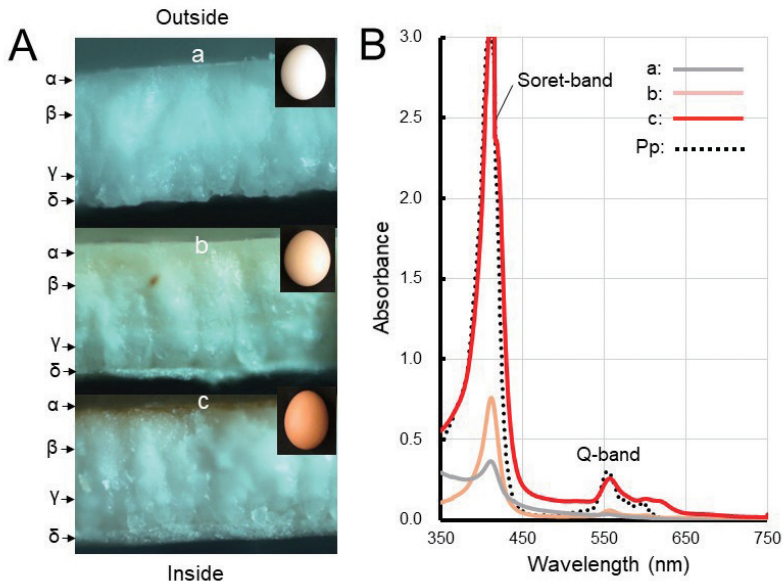


Fig. 1 Cross-sectional structure and pigment analysis of eggshells. A: Cross-sectional structure of white (a), cherry-colored (b), and brown (c) eggshells.  $\alpha$ : vertical crystal layer;  $\beta$ : palisade layer;  $\gamma$ : mammillary layer;  $\delta$ : eggshell membrane. B: Absorption spectrum analysis of hydrochloric acid / methanol solution of white (a), cherry-colored (b), and brown (c) eggshells. As a control, the absorption spectrum of 35  $\mu\text{mol} / \text{L}$  of the hydrochloric acid / methanol solution of protoporphyrin disodium salt was also measured simultaneously.

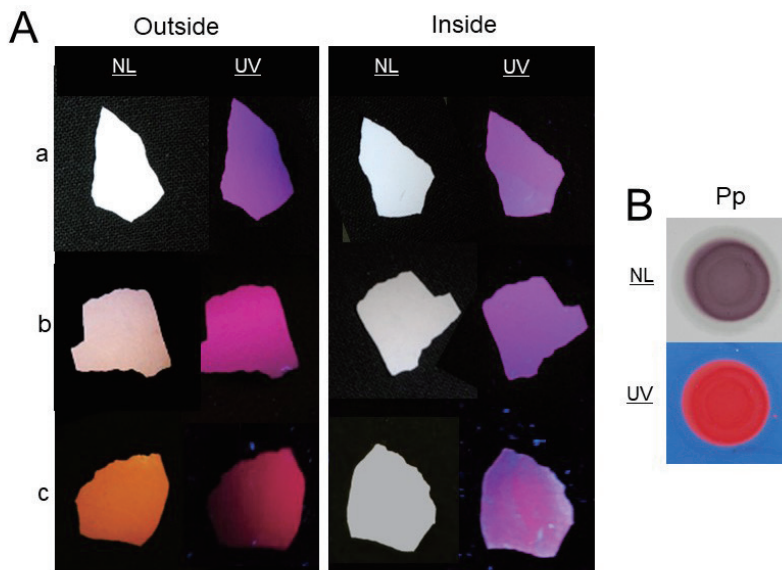


Fig. 2 Spectroscopic analysis of red fluorescence emitted by UVA irradiation from the outside and inside of the eggshell.

A: Color was observed when natural light was applied to the outside and inside of the eggshell. Then, fluorescence was observed when UVA was irradiated in a dark room. B: As a control, a photograph was obtained by absorbing a solution of protoporphyrin disodium salt in hydrochloric acid / methanol into a silica gel plate and irradiating it with UVA, shown on the left. Pp: Protoporphyrin; NL: Natural light irradiation; UV: Ultraviolet A light irradiation.

種の褐色有精卵を用いて、胚発育に伴う卵殻内側のPpの変化を解析することとした。まず褐色有精卵を37.5℃のふ卵器に入れて胚発育を開始させ、経過日数ごとに、発育の様子を観察しながら卵殻を採取し、UVA照射時の蛍光スペクトル分析を行った。胚発育状態を見てみると、開始5日目には、胚の大きさが約5 mmとなった。細血管内の血中には、細胞質のヘモグロビン(Hb)量が少なく円形に近い幼若な赤芽球様の血液細胞が観察された。10日目になると胚の大きさが約20 mmとなった。細血管内の血中には、細胞質にHbを含み、やや丸みを帯びた幼若赤血球が観察された。15日目以降になると胚はさらに大きくなり、Fig. 3Aの挿入写真の黄色味があった卵黄嚢は次第に縮小し、胚発育は順調に進行した。19日目の胚発育最終段階には、細血管内の血中に楕円型の成熟赤血球が観察された (Fig. 3A)。次に0-19日目の各時期の卵殻内側にUVAを照射したところ、ほぼ同様の赤色蛍光を発した (Fig. 3B)。この赤色蛍光のスペク

トル分析を行ったところ、635 nmと678 nmにピークを有していたが、胚発育経過に伴って678 nmのピークのみが低下した (Fig. 3C)。635 nmと678 nmのピークの高さの比率を算出し、胚発育に伴う変化について解析したところ、10日目以降急激に低下した (Fig. 3D)。

4. ニワトリの褐色卵殻内側の炭酸カルシウム微小顆粒の観察と胚発育に伴う乳頭先端部の変化

透過照明下でニワトリの褐色卵殻内側を光学顕微鏡で観察すると、Fig. 4Aの矢印のように、乳頭先端部が黒く見えた。この卵殻内側の乳頭先端部から削り取った粉末試料を、偏光顕微鏡のステージ上に載せて回転させると、きらきら色の変わる虹色の粒が確認され、乳頭先端部には微細結晶構造が存在することが明らかになった (Fig. 4B)。このことから、Fig. 4Aで乳頭先端部が黒く見えたのは、微小顆粒による散乱反射によって、照明光の透過が阻害されたためと考えられた。卵殻内側に接着した卵殻膜をはが

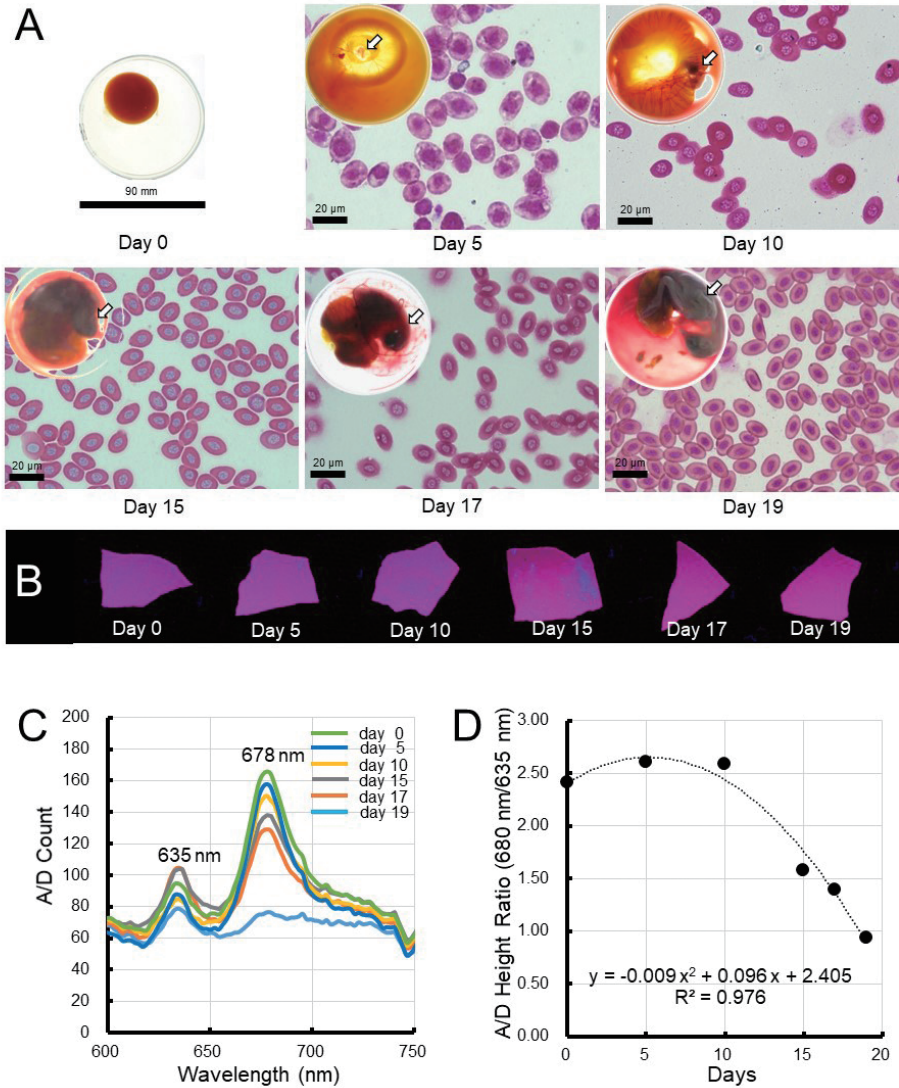


Fig. 3 Changes in red fluorescence under UVA irradiation from the inside of the eggshell accompanied by embryonic development.  
 A: Embryonic developmental status and erythrocyte morphology at each stage. Arrows indicate embryos. B: Red fluorescence photograph from the inside of eggshell at each stage; C: Spectral analysis of red fluorescence from the inside of the eggshell at each stage; D: Change in the ratio of the height of the fluorescence spectrum peaks at 678 nm and 635 nm accompanied by embryonic development.

して光学顕微鏡で観察すると、乳頭先端部から剥離したと思われる顆粒が付着しており、この顆粒表面には、白矢印のような、うす紫色のプロトポルフィリンと思われる細かい粒が分布していた。また、この顆粒を偏光顕微鏡で観察すると、削り取った粉末試料と同様、虹色の微細

結晶構造が観察された (Fig. 4C)。次に、胚発育に伴う乳頭先端部の形態変化を光学顕微鏡で観察したところ、胚発育前半で黒く見えた乳頭先端部 (Fig. 4D左黒矢印) が19日目には消失し、中央部の色が抜けたようになっていた。また、胚発育に伴う乳頭先端部の形態変化を走査型電

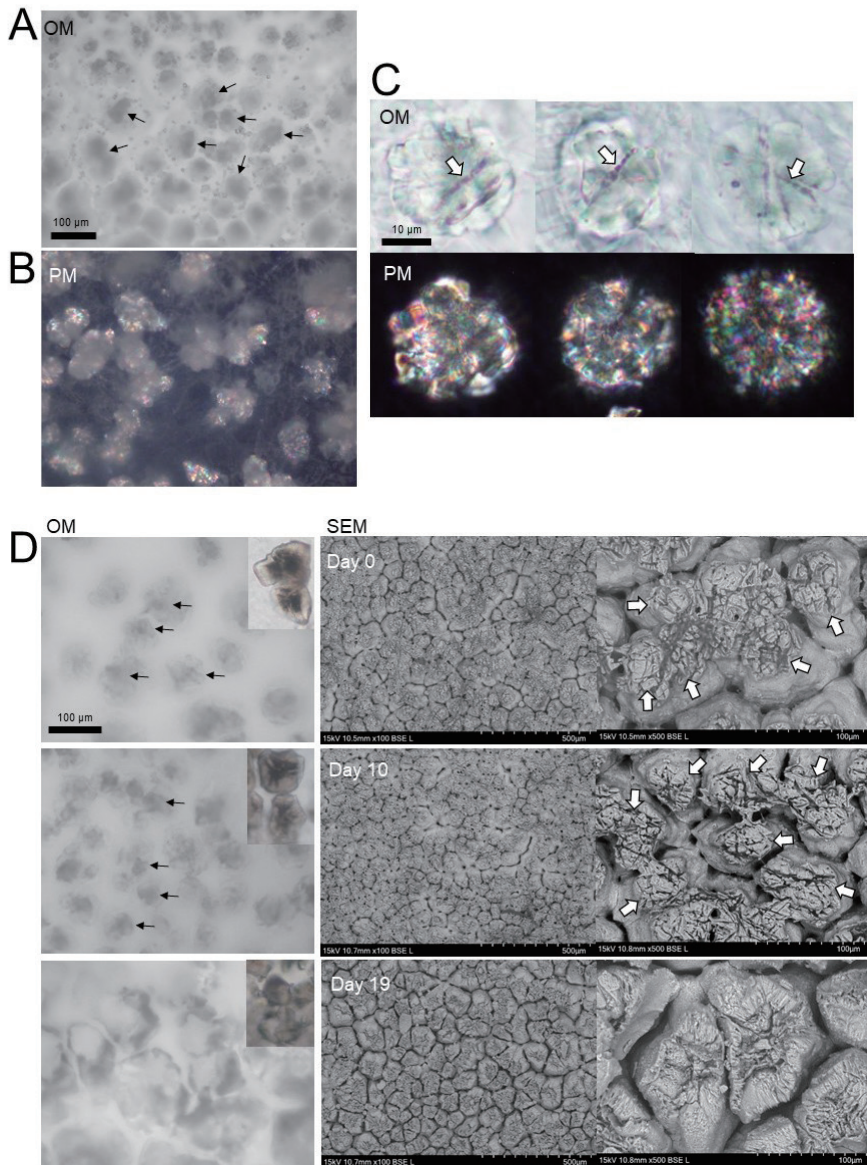


Fig. 4 Observation of calcium carbonate microcrystals inside the eggshell.  
 A: Optical microscopy (OM) of the inside of the eggshell; B: Polarized microscopy (PM) of residue scraped from the inside; C: OM and PM of calcium carbonate microcrystals attached to the eggshell membrane. White arrows indicate Pp like particles. D: Observation of the tip of the mammillary structure at each of the embryonic developmental stages with optical microscopy (left) and scanning electron microscopy (right). An optical micrograph of the mammillary structure at each embryonic developmental stage by epi-illumination was added to the upper right corner. Black arrows in the OM image and white arrows in the scanning electron microscopy (SEM) image indicate the tip of the mammillary layer, comprising calcium carbonate microcrystals.

子顕微鏡で観察したところ、乳頭先端部の構造物 (Fig. 4D右白矢印) が、胚発育に伴って次第に小さくなり、19日目にはほとんど消失し、平らなテーブル状になっていた。

#### Ⅳ. 考察

ニワトリ卵殻にはPp色素が含まれていることが知られている<sup>3)</sup>。白色卵、さくら色卵、褐色卵について卵殻断面の色素の分布状態を落射照明下で光学顕微鏡観察を行ったところ、褐色卵の卵殻の垂直結晶層の色が最も濃く、さくら色卵の垂直結晶層もうすく色づいているのが確認された (Fig. 1A)。卵殻の塩酸・メタノール溶解液中のPpのソーレー帯やQ帯のピークの高さは、卵殻の色に応じて、褐色卵、さくら色卵、白色卵の順であったが (Fig. 1B)、各色の卵の卵殻の色素の分布状態を見てみると、垂直結晶層、柵状層、乳頭層と卵殻の内部に行くにつれて減少し、乳頭層の色素含量は極わずかで、ほとんど差が認められなかった。また、卵殻内側にUVAを照射してPpの赤色蛍光を観察したところ、白色卵もさくら色卵も褐色卵も肉眼的には赤色蛍光強度に違いが認められなかった (Fig. 2)。Ppは活性酸素を介した抗菌作用を有し、細菌の卵殻への垂直浸透を阻害する働きがあることが知られているが<sup>3,13)</sup>、胚発育に対する直接的影響は確認されていない<sup>14)</sup>。これらのことから、卵殻表側の色素の違いは、胚発育には直接関係しないと考えられた。そこで今回は、特に褐色有精卵を用いて胚発育に伴う卵殻内側のPpや乳頭先端部の形態変化に関する研究を実施した。卵殻内側の赤色蛍光の変化を、ミニ分光器を用いてスペクトル分析を行ったところ、635 nmと678 nmに2つのピークが認められ、胚発育の10日目以降、678 nmのピークが急激に低下した (Fig. 3)。PpはUVA照射によって635 nmの蛍光を発生し、光酸化によって670 nm付近のピークが新たに出現することが知られている<sup>3,15-17)</sup>。本研究において、胚発育前期の卵殻内側に678 nmの光酸化型Ppが多く存在する原因は不明であるが、SEMを用いて胚発育に伴う卵殻乳頭部の構造変化を見てみると、胚発育前には乳頭先端部にPpを含む炭酸カルシウム微小顆粒が認められ、胚発育に伴って溶解するの

が観察された (Fig. 4D)。このことから、乳頭先端部の炭酸カルシウム微小顆粒の溶出によって、乳頭内部のPpが露出し、光酸化型Ppが減少したのではないかと考えられた。しかし、炭酸カルシウムとともに溶出した光酸化型Ppが、溶出したカルシウムイオンのように、胚に取り込まれて胚発育の材料として利用されるのかは不明である。乳頭先端部の微小顆粒中にはオステオポンチンやイノシトールリン酸が含まれており、これらが炭酸カルシウムの微小顆粒形成や易溶解性を高めて、胚のカルシウム取り込みや骨形成に貢献していると考えられている<sup>18-21)</sup>、Ppもまた、炭酸カルシウムの易溶解性微小顆粒形成を促し、胚発育のための代謝制御機構に関連しているかもしれない。

本論文内容に関連する著者(ら)の利益相反:なし

#### 文献

- 1) Kulshreshtha G, Rodriguez-Navarro A, Sanchez-Rodriguez E, and Diep T, Hincke T: Cuticle and pore plug properties in the table egg. *Poultry Science*, 97: 1382-1390, 2018.
- 2) Ketta M and Tůmová: Relationship between eggshell thickness and other eggshell measurements in eggs from litter and cages. *Italian J Animal Science*, 17: 234-239, 2018.
- 3) 岡崎 登志夫、宮井 紗弥香: ニワトリとウズラ卵殻のプロトポルフィリンとビリルジン分布. *生物試料分析*, 40: 168-175, 2017.
- 4) Sparks NHC: Eggshell pigments – from formation to deposition. *Avian Biol Res*, 4: 162-167.
- 5) Ishikawa S, Suzuki K, Fukuda E, Arihara K, Yamamoto Y, Mukai T, and Itoh M: Photodynamic antimicrobial activity of avian eggshell pigments. *FEBS Lett*, 584: 770-774, 2010.
- 6) Ohsaki Y, Sasaki T, Endo S, Kitada M, Okumura S, Hirai N, Kazebayashi Y, Toyoshima E, Yamamoto Y, Takeyama K, Nakajima S, and Sakata I: Observation of Zn-photoporphyrin red autofluorescence in human bronchial cancer using color-fluorescence endoscopy. *BMC Cancer*, 17: 289, 2017.
- 7) Yoshioka E, Chelakkot VS, Licursi M, Rutihinda SG, Som J, Derwish L, King J, Pongnopparat T, Mearow K, Larijani M, Dorward A, and Hirasawa K: Enhancement of cancer-specific protoporphyrin IX fluorescence by targeting oncogenic Ras/MEK pathway. *Theranostics*, 8: 2134-2146, 2018.

- 8) Wang XT, Zhao CJ, Li JY, Xu GY, Lian LS, Wu CX, and 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.
- 9) Zhao R, Xu G-Y, Liu Z-Z, Li J-Y, and Yang N: A study on eggshell pigmentation: Biliverdin in blue-shelled chickens. *Poult Sci*, 85: 546-549, 2006.
- 10) Johnston PM and Comar CL: Distribution and contribution of calcium from the albumen, yolk and shell to the developing chick embryo. *Am J Physiol*, 183: 365-370, 1955.
- 11) Simkiss K: Calcium metabolism and avian reproduction. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 36: 312-367, 1961.
- 12) Crooks RJ and Simkiss K: Respiratory acidosis and eggshell resorption by the chick embryo. *J Exp Biol*, 61: 197-202, 1974.
- 13) 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.
- 14) Fargallo JA, López-Rull I, Mikšfik I, Eckhardt A, Peralta-Sánchez JM: Eggshell pigmentation has no evident effects on offspring viability in common kestrels. *Evol Ecol*, 28: 627-637, 2014.
- 15) Ma L, Bagdonas S, and Moan J: The photosensitizing effect of the photoproduct of protoporphyrin IX. *J Photochem Photobiol B Biol*, 60:108-113, 2001.
- 16) Koizumi N, Harada Y, Beika M, Minamikawa T, Yamaoka Y, Dai P, Murayama Y, Yanagisawa A, Otsuji E, Tanaka H, and 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.
- 17) Grigalavicius M, Mastrangelopoulou M, Berg K, Arous D, Ménard M, Raabe-Henriksen T, Brondz E, Siem S, Gørgen A, Edin NFJ, Malinen E, Theodosiou TA: Proton-dynamic therapy following photosensitizer activation by accelerated protons demonstrated through fluorescence and singlet oxygen production. *Nat Commun*, 10: 3986, 2019.
- 18) Chien YC, Hincke MT, and McKee MD: Ultrastructure of avian eggshell during resorption following egg fertilization. *J Struct Biol*, 168: 527-538, 2009.
- 19) Chien YC, Hincke MT, Vali H, and McKee MD: Ultrastructural matrix-mineral relationships in avian eggshell, and effects of osteopontin on calcite growth in vitro. *J Struct Biol*, 163: 84-99, 2008.
- 20) Nys Y, Gautron J, Garcia-Ruiz JM, and Hincke MT: Avian eggshell mineralization: biochemical and functional characterization of matrix proteins. *C R Palevol*, 3: 549-562, 2004.
- 21) Ito T, Itokawa H, Miyaki T, Kamimura M, Hamano M, Nakata M, Saikawa Y: Inositol tetrakisphosphate from chicken eggshell. *Tetrahedron*, 76: 130853, 2019.