

## 鶏の卵殻色に関する研究 (3)

誌名	畜産の研究 = Animal-husbandry
ISSN	00093874
著者名	對馬,宣道 蛭名,良充 西館,亮一 向後,克哉 坂本,誠 太田,能之 吉田,達行 中尾,暢宏 田中,実
発行元	養賢堂
巻/号	67巻5号
掲載ページ	p. 523-531
発行年月	2013年5月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



## 鶏の卵殻色に関する研究(3)

### アロウカナ交雑種およびボリス・ブラウン産卵鶏の卵殻腺部 におけるポルフィリン合成能について

對馬宣道<sup>1</sup>・蛭名良充<sup>1</sup>・西館亮一<sup>1</sup>・向後克哉<sup>2</sup>・  
坂本 誠<sup>3</sup>・太田能之<sup>1</sup>・吉田達行<sup>1</sup>・中尾暢宏<sup>1</sup>・田中 実<sup>1</sup>

#### 1. はじめに

我々は、アロウカナ交雑種の産卵鶏における卵殻色素に関する研究を行っており、淡い青緑色の卵殻色素の原因物質は、ビリベルジンとそれよりは量的に少ないプロトポルフィリンであることをすでに報告している<sup>2)</sup>。また、褐色卵を産むボリス・ブラウン産卵鶏の場合、卵殻色素はプロトポルフィリンのみであり、その沈着量と視覚的な色調の濃淡との間には正の相関関係があることも明らかにしてきた<sup>20)</sup>。しかしながら、アロウカナ交雑種およびボリス・ブラウン産卵鶏の卵管において、これらの卵殻色素がどのようにしてつくられているのかについては、まだ十分に調べられているとは言えない。鶏卵管における卵殻色素の合成経路が不明確であるという理由を挙げるならば、以下の

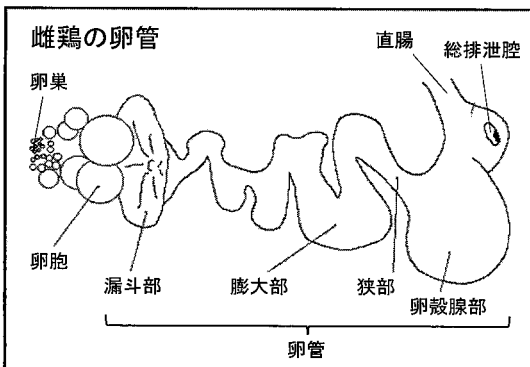


図1 雌鶏の卵管の模式図と卵殻色素を分泌する卵殻腺部の位置関係

ようないくつかの点を指摘することができる。

すなわち、Polin<sup>9)</sup>は、*in vitro* 実験で鶏の卵殻腺部(図1)が、前駆物質であるデルタアミノレブリン酸からポルフィリンを生成する能力を有していることを証明している。また、鶏の卵殻腺部には、ポルフィリン合成経路のいくつかの酵素が存在すること、そしてそれらの酵素活性が卵の形成過程に伴って変動する可能性も示唆されている<sup>16)</sup>。鶏の肝臓や造血組織では、ポルフィリン合成経路で生成されたプロトポルフィリンが、フェロキラーゼの働きにより活発にヘムへと変換されていく<sup>4,14)</sup>。ところが、鶏の卵殻腺部では、おそらくこのフェロキラーゼ活性が極端に低いためにヘムへは容易に変換されずに、一定量のプロトポルフィリンが卵殻腺部の粘膜上皮細胞に蓄積され、その後、何らかの刺激により卵殻表面に向かって一斉に分泌されるものと推測された(図2を参照)。

一方で、鶏の卵殻色素であるプロトポルフィリンは、血液由来であるという報告が未だに根強くある<sup>2,7)</sup>。当初は、あくまでも推測の域を出なかったが、近年になってマウス肝臓において、老化赤血球の分解により生じるヘムを基質として、プロトポルフィリンを生じるフェロキラーゼを介する逆反応が発見されるに至った<sup>12,18)</sup>。鶏の卵殻腺部において、こうしたフェロキラーゼが触媒する逆反応の存在は証明されていないが、全く可能性がないと言うことはなくなったようである。

そこで、本研究は、鶏卵管における卵殻色素の合成経路(図2)を明らかにする第一段階として、アロウカナ交雑種およびボリス・ブラウン産卵鶏を用いて、両鶏の卵殻腺部からホモジネートを調製し、これに基質となるデルタアミノレブリン酸を加えて

<sup>1</sup> 日本獣医生命科学大学 (Nobumichi Tsushima, Yoshimitsu Ebina, Ryoichi Nishidate, Yoshiyuki Ohta, Tatsuyuki Yoshida, Nobuhiro Nakao, Minoru Tanaka)

<sup>2</sup> (有)サントクファーム松尾農場 (Katsuya Kougo)

<sup>3</sup> (有)サントクファーム倉橋農場 (Makoto Sakamoto)

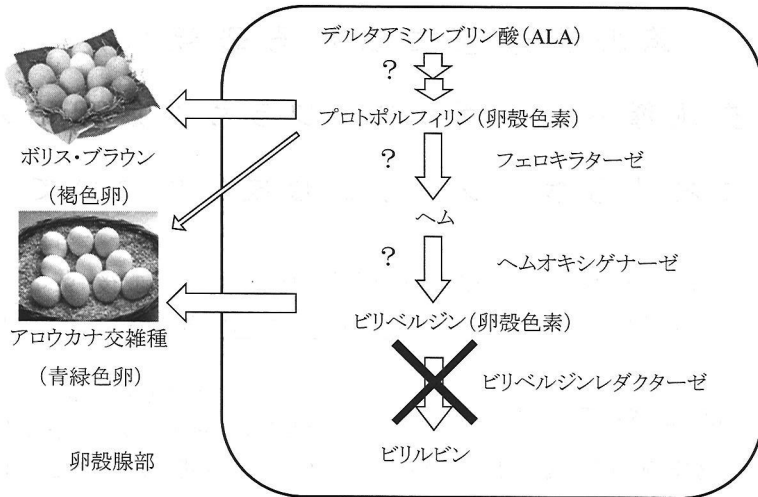


図2 有色卵を産む鶏の卵殻腺部において想定される卵殻色素の合成経路

から加温処理し、経時的にプロトポルフィリンあるいはビリベルジンが合成されるか否かを検討した (*in vitro* 実験)。

## 2. 材料および方法

### 材料

#### 供試鶏について

供試鶏は、(有)サントクファーム倉橋農場で飼養されているアロウカナ交雑種ならびにボリス・ブラウン (褐色卵鶏) の産卵鶏、各8羽であった。このうち、アロウカナ交雑種の産卵鶏は、千葉県畜産総合研究センターで造成されたものであった<sup>1)</sup>。倉橋農場への導入日は、アロウカナ交雑種が2012年3月8日であり、ボリス・ブラウンは2011年5月12日であった。これらの導入日における鶏齢は、それぞれ122日齢と126日齢であった。その後、両鶏は同農場で鶏卵生産を続けながら、分析のために卵殻腺部および肝臓を採取した時点において、アロウカナ交雑種の鶏齢は、400日齢に達していた(2012年12月11日)。また、同様に臓器採取をしたときのボリス・ブラウンの鶏齢は、強制換羽後の709日齢になっていた(2012年12月15日)。

#### 試薬について

試薬の調製は、Tsushima and Yamada<sup>19)</sup>の方法に準拠して行った。鶏肝臓および卵殻腺部のホモジネート (粗酵素液) の調製には、150 mM の塩化カリウムで等張にした100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.1) を用いた。卵殻色素であるプロトポルフィリンあるい

はビリベルジンを生成させるための基質には、デルタアミノレブリン酸 (以下、ALA と略記) 塩酸塩を使用した。ALA 塩酸塩を溶解、中和するために1 M 重炭酸ナトリウム (炭酸水素ナトリウム) 溶液を用いた。また、卵殻色素の生成反応中に、一連の酵素反応を止めるため、100 mM 塩化第二水銀を含む10%トリクロル酢酸溶液を反応停止液とした。

塩化カリウム (特級)、リン酸1-カリウム (特級)、リン酸2-カリウム (特級)、デルタアミノレブリン酸塩酸塩 (生化学用)、炭酸水素ナトリウム (特級)、塩化第二水銀 (特級)、トリクロル酢酸 (特級) は、和光純薬工業株式会社製のものであった。また、標準液の調製に用いたプロトポルフィリンIX 2Na 塩 (CAT No. 102757) ならびにビリベルジン2塩酸塩 (CAT No. 194886) は、MP バイオメディカル社製のものであった。

### 方法

#### 供試鶏からの臓器採取

アロウカナ交雑種からの臓器採取は、2012年12月11日に実施した。8羽のアロウカナ交雑種は、前日に倉橋農場から大学に搬入し、常法どおり給餌、給水を行った。臓器採取の当日は、早朝から産卵 (放卵) が起こるのを目視で観察した。産卵したことが確認された個体から、順次、牛刀を用い断頭放血によって屠殺した。十分に放血した鶏を、外科剪刀を用いて開腹し、肝臓および卵管の順に摘出した。卵管は摘出後、その内部に卵が存在していないかを確認し、卵がなかった個体のみを供試した。

卵管は卵殻腺部のみを実験に使用するため、それ以外の漏斗部、膨大部、狭部および膣部は外科剪刀を用いて切り分け、丁寧に切り除いた(図1を参照)。いずれの臓器も、迅速に脂肪や結合組織などを整形したのち、電子天秤で秤量した。アロウカナ交雑種の肝臓および卵殻腺部は、Tsushima and Yamada<sup>19)</sup>の方法に準じて、分析に必要なホモジネート量(約30 ml)を調製するため、それぞれ7.5 gと3.0 gを切り取った。8羽のアロウカナ交雑種のうち、実験に必要な5羽の臓器サンプルが採取できた時点で、臓器採取を終えた。

8羽のボリス・ブラウンからの臓器採取は、2012年12月15日に実施した。具体的な臓器採取のやり方は、アロウカナ交雑種の場合と同じであった。例外として、産卵が確認されたボリス・ブラウンの1羽で、屠殺解体後に卵殻腺部に卵が存在していた個体があり、これは実験のサンプルからは除外した。以上、述べてきたように、ボリス・ブラウンも臓器採取の日を目視で産卵を確認したのち、順次、採材を行っていき、5羽分の肝臓と卵殻腺部を採取した。これらの肝臓と卵殻腺部を、以下に述べる実験に供した(おのおのn=5)。

#### 実験1-1. 鶏肝臓および卵殻腺部ホモジネートの調製

アロウカナ交雑種およびボリス・ブラウンの肝臓と卵殻腺部におけるプロトポルフィリンおよびビリベルジンの生成を確認するための*in vitro*実験は、Polin<sup>9)</sup>の方法に準じて行った。両鶏から採取した肝臓ならびに卵殻腺部は、直ちに分析に供した。肝臓(7.5 g)は4倍量の150 mMの塩化カリウムを含む100 mMリン酸緩衝液(pH 7.1)を用い、テフロン・ホモゲナイザーを使って冷却しながらホモゲナイズ(磨砕)した。卵殻腺部(3.0 g)は10倍量の同緩衝液(pH 7.1)を用いてホモゲナイズした。平滑筋組織である卵殻腺部は、ホモゲナイズ操作の前に外科剪刀を用いて出来るだけ細かく細切した。これらのホモジネートから細胞壁や結合組織、未破壊の細胞片を除くために、1,089 g(3,000 rpm)で10分間、冷却遠心分離した(4°C)。こうして低速で冷却遠心分離して得られた上清を粗酵素液として、以下の実験1-2と実験2に供試した。

#### 実験1-2. *in vitro*実験によるプロトポルフィリンおよびビリベルジン生成の確認

実験1-1で得られた粗酵素液(肝臓と卵殻腺部)

1.50 mlを共栓付遠沈管に取り、これに基質となる10 mMのALA溶液を0.15 ml加えた(実験区)。対照区の遠沈管には、ALA塩酸塩の溶媒である1 M重炭酸ナトリウム溶液を0.15 ml加えた。ALA溶液を調製するときpHが酸性に傾くので、それを中和する目的でアルカリ性の重炭酸ナトリウム溶液を溶媒とした。総量にして1.65 mlになったものを、プロトポルフィリンおよびビリベルジン生成を確認するための反応溶液とした。実験区および対照区の反応溶液の入った遠沈管に栓をして、鶏の体温付近である41°Cの恒温水槽でインキュベートした。インキュベートを開始したときを0時間とし、プロトポルフィリンおよびビリベルジン(卵殻色素)の生成反応を開始した。一定の反応時間が経過したあと、反応溶液に反応停止液を等量(1.65 ml)加え、プロトポルフィリン合成系の一連の酵素反応<sup>5)</sup>を停止させた。反応停止後に遠沈管をよく攪拌し、白濁した反応溶液を4°C条件下、20,000 gで1時間、高速遠心分離を行った。高速遠心分離後に得られた上清中に生成された卵殻色素の存在を確認するために、島津製作所株式会社製の分光光度計UVmini 1240 100VJを用いた。上清中のプロトポルフィリンあるいはビリベルジンの存在を確認するため、波長300~800 nmの範囲で吸収スペクトルをとった。こうして波長スキャンを行った結果、アロウカナ交雑種およびボリス・ブラウンの肝臓と卵殻腺部から調製されたサンプル(上清)には、406 nm付近に最大吸収(ピーク)が得られた(図3)。しかしながら、波長670~690 nmの範囲には、いずれのサンプルにもピークの存在は確認されなかった。これらのことから、ALAを出発物質として卵殻色素の生成を確認した*in vitro*実験では、肝臓および卵殻腺部由来の上清中にプロトポルフィリンの存在のみが確認された。

#### 実験2. 生成されたプロトポルフィリンの定量

前述の実験1-2の結果から、アロウカナ交雑種およびボリス・ブラウンの肝臓と卵殻腺部から調製されたサンプル(上清)には、406 nmにのみ大きなピークが見られた(図3を参照)。プロトポルフィリン純品を塩酸メタノールに溶解して得られた標準液のピークは、波長412 nmに観察された<sup>20)</sup>。こうしたピークが得られる波長の違い(ズレ)は、吸光度法の欠点でもあるが、吸収スペクトルを取った

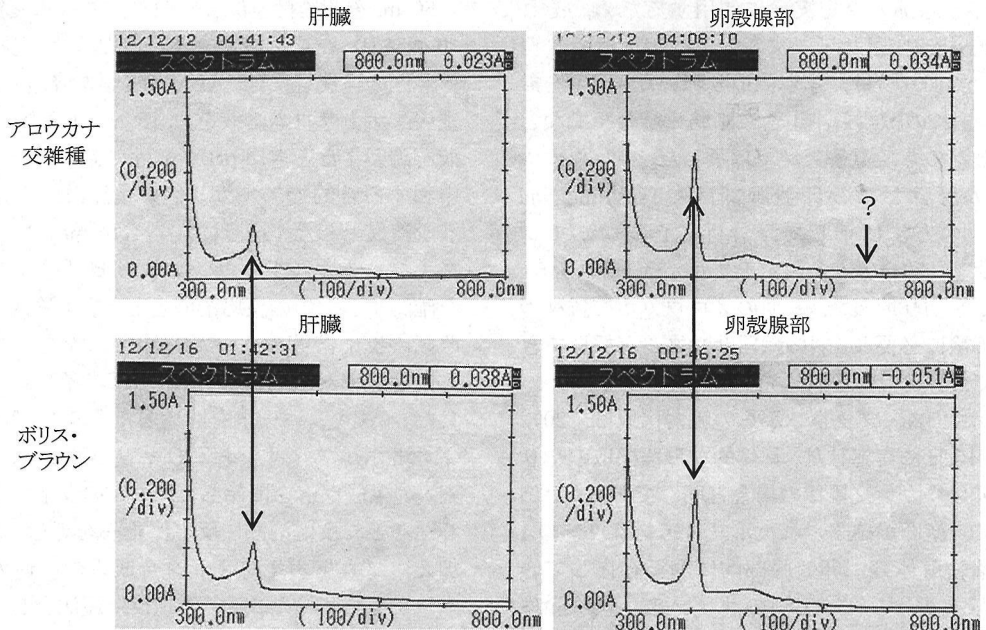


図3 アロウカナ交雑種およびボリス・ブラウンの肝臓と卵殻腺部のホモジネート中に生じた物質を特定するための吸収スペクトルのデータ (*in vitro* 実験)

基質であるデルタアミノレブリン酸 (略号 ALA) を添加し、反応を開始した時点を通 0h とし、41°C で 6 時間インキュベートしたときの吸収スペクトルを表している。

波長 406 nm に観察されたシャープなピークはプロトポルフィリンであった。アロウカナ交雑種の卵殻腺部に見られることが想定されたビリベルジンのピーク (波長 678~693 nm) は得られなかった。

ときに用いた溶媒の性質の違いや、夾雑する物質の干渉によるものであった。したがって、本実験の上清サンプルにおいて波長 406 nm に認められたピークは、プロトポルフィリンによるものに間違いないと判断した。このことをふまえて、前報<sup>20)</sup>で得られている検量線と、その回帰式  $y = 2.549x - 0.052$  ( $r = 0.9993$ ) をもとに、反応溶液中に生成されたプロトポルフィリン量を算出した。なお、波長 406 nm と 412 nm で測定した場合の吸光度を、上述の回帰式に代入して求めたプロトポルフィリン量の差異は、1%以内であった。

実験 2 では、実験 1-2 と同様の操作でアロウカナ交雑種およびボリス・ブラウンの肝臓と卵殻腺部から反応溶液を調製し、これらをもとにプロトポルフィリン生成量の経時的な推移について調べた。インキュベートを開始したときを 0 時間とし、プロトポルフィリンの生成反応を開始した。プロトポルフィリンの生成を調べるための反応時間は、鶏ハーダー腺においてプロトポルフィリン生成量を調べた当研究室の先行研究<sup>17)</sup>にもとづいて、0, 3,

6, 9, 15, 20 および 24 時間とした。それぞれの反応時間が経過したあと、反応溶液中に生成されたプロトポルフィリンを、分光光度計 UVmini 1240 100VJ を用い波長 406 nm で測定した。プロトポルフィリンの定量には、前述の回帰式<sup>20)</sup>を適用した。**統計解析**

本実験において、結果は平均値 ± 標準偏差で示した。*in vitro* 実験における鶏肝臓および卵殻腺部のプロトポルフィリン生成量の経時変化に関する有意差の検定には、SAS の GLM プロシジャを用いた分散分析を行った<sup>15)</sup>。

### 3. 結 果

#### 実験 1. *in vitro* 実験によるプロトポルフィリンおよびビリベルジン生成の確認

図 3 は、アロウカナ交雑種およびボリス・ブラウンの肝臓と卵殻腺部から調製された上清サンプルの吸収スペクトルをとったものである。波長スキャンして得られたシャープなピーク (最大吸収) は、いずれのサンプルにおいても波長 406 nm 付近にのみ

見られた。アロウカナ交雑種の卵殻腺部の場合、波長 678~693 nm の範囲にビリベルジンに相当するもう一つのなだらかなピークが観察されることが想定されたが、こうしたデータは得られなかった(図3を参照)。

実験2. アロウカナ交雑種およびボリス・ブラウンの肝臓と卵殻腺部におけるプロトポルフィリン生成量の比較

図4は、アロウカナ交雑種およびボリス・ブラウンの肝臓と卵殻腺部から調製したホモジネートに、基質となるALA溶液を加え24時間インキュベートしたとき、生成したプロトポルフィリン量の推移を示したものである。肝臓1gあたりのプロトポルフィリン生成量は、アロウカナ交雑種では反応開始(0時間)から9時間までは経時的に有意に増加したが、9時間以降は24時間までほぼ一定のレベル(29.4~48.4 µg/g 肝臓)で推移していた。一方、ボリス・ブラウンの肝臓でも、アロウカナ交雑種

よりわずかに高い値が見られたものの、同様に反応開始から9時間までは経時的に有意な増加を示し、9時間以降は24時間までほぼ一定のレベル(35.7~61.2 µg/g 肝臓)を推移していた。アロウカナ交雑種およびボリス・ブラウンの肝臓1gあたりのプロトポルフィリン生成量同士を比較すると、24時間においてのみ有意な差が見られたが、それ以外の各時間では著しい違いは認められなかった(図4を参照)。

卵殻腺部1gあたりのプロトポルフィリン生成量は、アロウカナ交雑種では反応開始から20時間まで経時的に有意に増加していった(図4)。同様に、ボリス・ブラウンの卵殻腺部における1gあたりのプロトポルフィリン生成量は、反応開始から24時間まで経時的に有意に増加していった。アロウカナ交雑種とボリス・ブラウンとの間で、卵殻腺部1gあたりのプロトポルフィリン生成量を比較すると、20時間ではアロウカナ交雑種の方が有意に高い値に

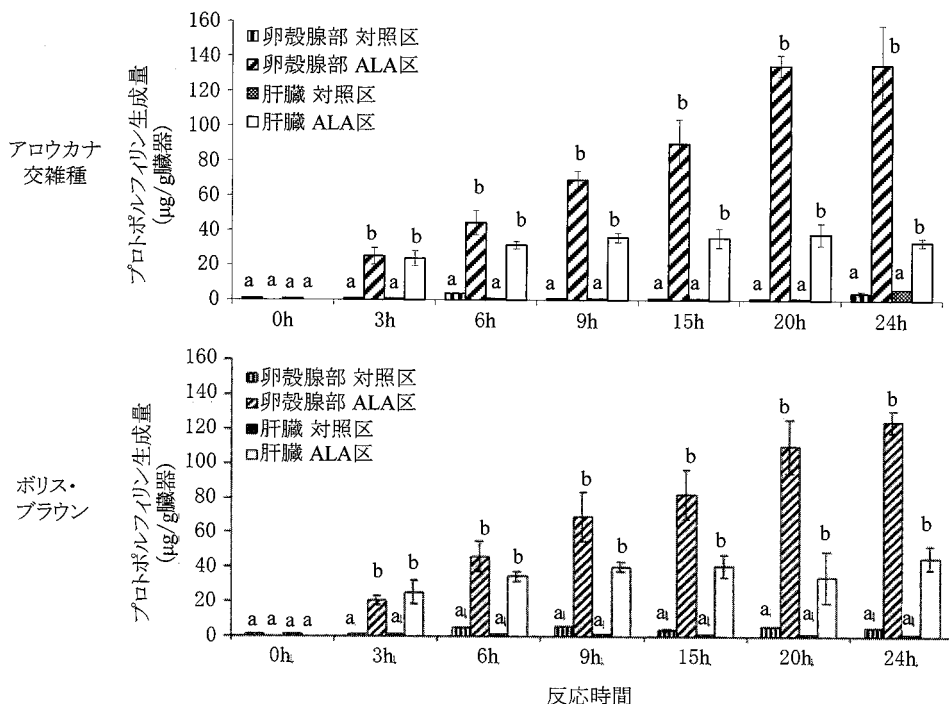


図4 アロウカナ交雑種およびボリス・ブラウンの卵殻腺部と肝臓におけるプロトポルフィリン生成量の経時的推移 (in vitro 実験)

0~24h (横軸) : 基質であるデルタアミノレブリン酸 (略号 ALA) を添加し、反応を開始した時点を 0h とし、41°C でインキュベートしたときの経過時間を表している。

a, b: ALA の溶媒である 1M 重曹溶液を添加した対照区と比較したとき、同じ時間における実験区との間が、異符号である場合には有意差あり (p < 0.05)。

なったが、それ以外の各時間においては有意な差は認められなかった。

これらのデータ(図4)をもとに、アロウカナ交雑種およびボリス・ブラウンの肝臓と卵殻腺部が、それぞれ1時間あたりに生成するプロトポルフィリン量を試算してみた(図5)。肝臓における1時間あたりのプロトポルフィリン生成量は、アロウカナ交雑種では反応開始から3時間において最も高い値(平均8.0  $\mu\text{g/g}$  肝臓)を示し、その後は3~6時間、6~9時間にかけて経時的に減少していった。ボリス・ブラウンの肝臓でも、同様に1時間あたりのプロトポルフィリン生成量は、反応開始当初の3時間において最も高い値(平均8.3  $\mu\text{g/g}$  肝臓)を示し、その後は3~6時間、6~9時間にかけて経時的に減少していった。また、ボリス・ブラウンの肝臓のみ、20~24時間において1時間あたりのプロトポルフィリン生成量が、わずかに高い時間帯が見られた(平均2.8  $\mu\text{g/g}$  肝臓)(図5を参照)。

一方、アロウカナ交雑種の卵殻腺部における1時間あたりのプロトポルフィリン生成量は、反応開始から9時間において相対的に高いレベルを推移したが(6.4~8.4  $\mu\text{g/g}$  卵殻腺部)、9~15時間で一旦低い値となった(平均3.5  $\mu\text{g/g}$  卵殻腺部)。

その後、アロウカナ交雑種の卵殻腺部における1時間あたりのプロトポルフィリン生成量は、15~20時間で再び高い値を示した(平均8.9  $\mu\text{g/g}$  卵殻腺部)。最後の20~24時間において、卵殻腺部の1時間あたりのプロトポルフィリン生成量は、著しく低い値になった(平均0.1  $\mu\text{g/g}$  卵殻腺部)。これに対して、ボリス・ブラウンの卵殻腺部においても1時間あたりのプロトポルフィリン生成量は、反応開始から9時間において相対的に高いレベルを示したが(6.9~8.5  $\mu\text{g/g}$  卵殻腺部)、9~15時間で一旦低い値となった(平均2.2  $\mu\text{g/g}$  卵殻腺部)。その後、ボリス・ブラウンの卵殻腺部における1時間あたりのプロトポルフィリン生成量は、15~20時間で再び高い値を示した(平均5.6  $\mu\text{g/g}$  卵殻腺部)。最後の20~24時間において、卵殻腺部の1時間あたりのプロトポルフィリン生成量は、やや低い値を示した(平均3.5  $\mu\text{g/g}$  卵殻腺部)。これら卵殻腺部の1時間あたりのプロトポルフィリン生成量と、肝臓におけるそれらを比べたとき、反応開始からのすべての時間帯において、卵殻腺部の方が肝臓よりも高い値を示した(ボリス・ブラウンの0~3時間を除く)(図5を参照)。

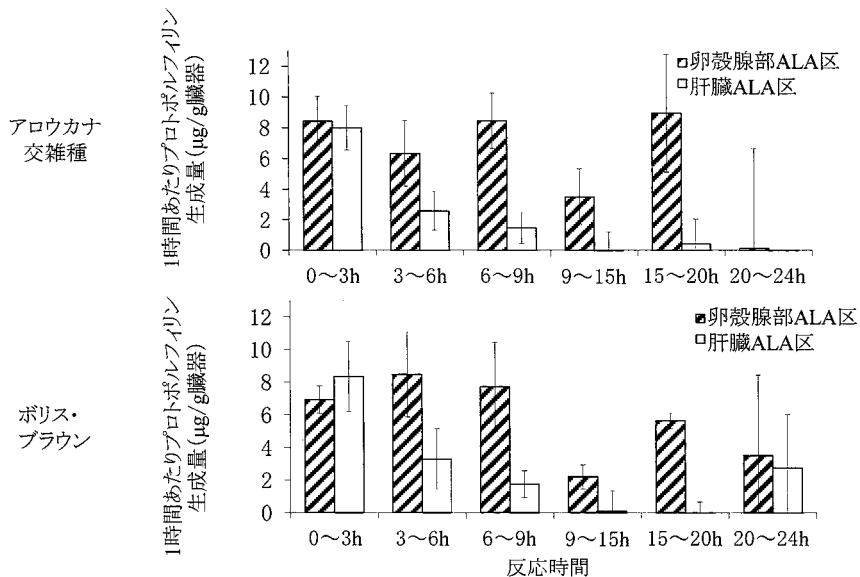


図5 アロウカナ交雑種およびボリス・ブラウンの卵殻腺部と肝臓における1時間あたりのプロトポルフィリン生成量の比較

0~3h: 反応開始から3時間までのプロトポルフィリン生成量を1時間あたりの生成量として算出したもの。他の時間帯も同様に、1時間あたりのプロトポルフィリン生成量を計算で求めた。

#### 4. 考 察

本研究では、青緑色の卵殻が特徴的なアロウカナ交雑種、ならびに褐色卵鶏のボリス・ブラウンを供試した。これらの鶏の卵殻色の原因物質は、ビリベルジンやプロトポルフィリンであることが、最近の我々の研究で明らかになっている<sup>20, 21)</sup>。これらの研究成果をふまえて、本研究ではアロウカナ交雑種およびボリス・ブラウンから卵管と肝臓を摘出し、卵管に関しては卵殻色素の分泌部位である卵殻腺部を実験対象にしている(図1を参照)。具体的には、アロウカナ交雑種およびボリス・ブラウンの肝臓と卵殻腺部からホモジネート(粗酵素液)を調製し、これらに基質となるALA溶液を加えてから、一定時間加温処理を行ったのち、反応溶液中に卵殻色素であるビリベルジンやプロトポルフィリンが生成されるか否かについて検討した(*in vitro* 実験)。

図4は、アロウカナ交雑種およびボリス・ブラウンの肝臓と卵殻腺部から調製したホモジネートに、基質となるALA溶液を加えてから24時間のあいだインキュベートしたとき、反応溶液中に生じるプロトポルフィリン量の推移を示したものである。肝臓1gあたりのプロトポルフィリン生成量は、アロウカナ交雑種でも、ボリス・ブラウンにおいても反応開始(0時間)から9時間までは経時的に有意に増加していった。その後、肝臓1gあたりのプロトポルフィリン生成量は、両鶏において9~24時間までほぼ一定の高いレベルを保って推移していた。この反応開始9~24時間までの肝臓1gあたりの生成量のレベルは、アロウカナ交雑種(35.7~61.2 µg)の方がボリス・ブラウンよりも高い傾向にあった(29.4~48.4 µg)。このアロウカナ交雑種およびボリス・ブラウンの肝臓1gあたりのプロトポルフィリン生成量に認められた結果は、白色レグホーン種の肝臓で観察されたものとよく一致していた<sup>17)</sup>。

アロウカナ交雑種およびボリス・ブラウンの肝臓において、プロトポルフィリンの経時的推移を1時間あたりの生成量で見た場合、両鶏とも反応開始~3時間において最も高い値を示した(図5)。その後は、両鶏の肝臓における1時間あたりの生成量は、3~6時間、6~9時間と経時的に減少していった。

ボリス・ブラウン肝臓の20~24時間を除いて、両鶏の肝臓における1時間あたりのプロトポルフィリン生成量は、反応開始9時間以降はほぼゼロに近いレベルであった(図5を参照)。このことは、アロウカナ交雑種およびボリス・ブラウンの肝臓ホモジネートにおいて、ALAから生成されたプロトポルフィリンは、ホモジネート中に共存する酵素フェロキターゼの働きによってヘムへと活発に変換されていったために<sup>5)</sup>、両鶏の肝臓では反応開始9時間以降はゼロに近いレベルに至ったものと考えられた。

図4に示したように、ボリス・ブラウンの卵殻腺部1gあたりのプロトポルフィリン生成量は、反応開始(0時間)から24時間までは経時的に有意に増加していった。同様の結果は、アロウカナ交雑種の卵殻腺部1gあたりの生成量にも認められた。両鶏間において、卵殻腺部1gあたりのプロトポルフィリン生成量を比較したとき、経時的に有意な差は認められなかった(20時間を除く)。このことから、アロウカナ交雑種およびボリス・ブラウンの卵殻腺部には、いずれもALAからプロトポルフィリンを合成する一連の酵素群が存在しており<sup>5)</sup>、アロウカナ交雑種の卵殻腺部は、ボリス・ブラウンのそれに匹敵する高いプロトポルフィリン合成能を有することが判明した。鶏の卵殻腺部1gあたりのプロトポルフィリン生成量に関して、直接比較し得る文献は見あたらないが、本実験で得られた卵殻腺部での経時的な推移のパターンは、白色レグホーン種のハーダー腺で観察されたものとよく一致していた<sup>17)</sup>。

卵殻色素という視点でみた場合、ボリス・ブラウンでは卵殻腺部で合成されたプロトポルフィリンは、直接、卵殻表面に分泌され沈着するものと思われた<sup>20)</sup>。しかしながら、アロウカナ交雑種の場合、卵殻表面に沈着している色素はビリベルジンが優勢であり、プロトポルフィリンはその半量以下であった<sup>21)</sup>。今回の実験結果から、アロウカナ交雑種の卵殻腺部では、卵殻色素の本体であるビリベルジンをALAから合成、供給しているという可能性は極めて低いように思われた。すなわち、図6に示したように、ボリス・ブラウンのみならずアロウカナ交雑種においても、卵殻腺部ではフェロキターゼ活性が強く抑制されていることが示唆された。



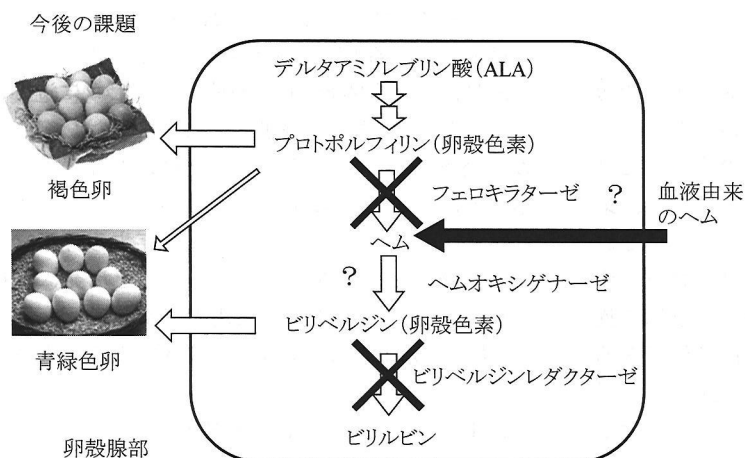


図6 本研究で明らかになった鶏の卵殻腺部における可能性のある卵殻色素の合成経路と今後の課題

今回の *in vitro* 実験の結果から、アロウカナ交雑種の卵殻腺部は、プロトポルフィリンを合成する潜在的な能力を有しているものの、白色レグホーン種と交雑して造成したために、白色レグホーン種の場合と同様に、ALA そのものを供給するALA合成酵素の活性が極めて低いであろうという可能性が十分に考えられた<sup>16)</sup>。

アロウカナ交雑種およびボリス・ブラウンの卵殻腺部において、プロトポルフィリンの経時的推移を1時間あたりの生成量で見た場合、反応開始～3時間、3～6時間および6～9時間において、生成量が高いレベルを推移してした(図5)。その後は、両鶏とも9～15時間にかけて1時間あたりのプロトポルフィリン生成量は、一旦減少したものの、15～20時間では再び増加に転じた。この15～20時間の時期における卵殻腺部の1時間あたりの生成量に見られた増加は、以下の報告によって裏付けられる現象かもしれない。すなわち、アロウカナ原種の卵殻腺部では、二次的な卵殻色素の分泌現象の存在が知られていることから<sup>7)</sup>、本実験のアロウカナ交雑種の卵殻腺部において15～20時間に認められた一過的な増加(図5)は、二次的な色素分泌である可能性が考えられた。

本研究では、アロウカナ交雑種およびボリス・ブラウンの卵殻腺部ホモジネートにおいて、ALAからのプロトポルフィリン生成は確認されたが、ビリベルジンの生成は認められなかった。ボリス・ブラウンの卵殻腺部においてビリベルジンが生成

されないのは予想されたが、アロウカナ交雑種の卵殻腺部でビリベルジンが生成されなかったのは想定外の結果であった。このことから、アロウカナ交雑種の卵殻に沈着しているビリベルジンは、本実験の開始前に予想されたように、プロトポルフィリンを経由して生成されるのではなく(図2を参照)、別の経路でつくられている可能性が考えられた<sup>24)</sup>。すなわち、別経路については、鶏の体内においてヘムが最も多く含まれている老化赤血球由来のヘムからビリベルジンが

生成されている可能性が考えられ(図6)、今後はこの経路の存在について検討を進めていく必要があるように思われた。

## 5. おわりに

ボリス・ブラウンに代表される褐色卵鶏において、鶏齢の進行に伴って卵殻色が薄くなったり、色ムラが現れたりすることは生産現場ではよく知られている<sup>6, 11, 22, 23)</sup>。このことを改善するために、褐色卵鶏の飼料中にALAを添加給与し、卵殻色の推移を分光色差計で測定した学会報告がある<sup>13)</sup>。彼らは、ALAの添加給与が褐色卵鶏の卵殻色の赤色度を向上させたと結論としている。一方、当研究室の先行研究では、白色レグホーン種産卵鶏にALAを静脈内投与して、卵殻の色調の変化について調べている<sup>8)</sup>。その結果、わずかではあるが、卵殻1gあたりのプロトポルフィリン量を増加させることができた。しかし、白色レグホーン種産卵鶏では、ALAの静注により褐色卵に相当するような卵殻色をつくり出すまでには至らなかった。これは、鶏の血中に投与されたALAが、赤血球や肝臓などに存在するプロトポルフィリン合成系の酵素群に利用されてしまい<sup>3, 16)</sup>、卵殻色を顕著に変化させるために必要な量のALAが、卵殻腺部には十分に到達しなかったものと考えている。また、ALAの経口投与による褐色卵鶏の卵殻色の改善技術<sup>13)</sup>も、未だに普及には至っていないことから、費用対効果の点や、卵殻色の改善効果の確実性等の問題が解決

されていないように思われた。今後は、プロトポルフィリンの前駆物質である ALA を、鶏の卵殻腺部に確実に到達させることが出来るような技術が開発されれば、加齢に伴って生じる褐色卵鶏の卵殻の退色を画期的に改善できるかもしれない。

## 謝 辞

供試鶏であるアロウカナ交雑種ならびにボリス・ブラウンを無償提供して頂いた(有)サントクファーム代表取締役 豊村彰治氏に深く感謝いたします。

## 文 献

- 1) 青木ひかる (1996) アローカナ交雑鶏の青色卵. 養鶏の友, 410: 48-50.
- 2) Baird T, Solomon SE and Tedstone DR (1975) Localisation and characterisation of egg shell porphyrins in several avian species. *British Poultry Science*, 16: 201-208.
- 3) Granick S and Mauzerall D (1958) Porphyrin biosynthesis in erythrocytes. II. Enzymes converting  $\delta$ -aminolevulinic acid to coproporphyrinogen. *Journal of Biological Chemistry*, 232: 1119-1140.
- 4) Hanson JW and Dailey HA (1984) Purification and characterization of chicken erythrocyte ferrochelatase. *Biochemical Journal*, 222: 695-700.
- 5) 林 典夫 (1987) ヘムの合成およびその調節. 蛋白質 核酸 酵素, 臨時増刊 (血色素の分子生理と分子病理), 32: 797-814.
- 6) 埴和靖俊・御幡 寿 (2001) 優良素材鶏有効利用促進事業 (赤玉タイプ). 茨城県畜産センター研究報告, 31: 87-88.
- 7) Kennedy GY and Vevers HG (1973) Eggshell pigments of the Araucano fowl. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 44B: 11-25.
- 8) 小笠原嘉紀・李 樹美・阿部智士 (2004) デルタアミノレブリン酸の投与が白色レグホーン種産卵鶏の卵殻色に及ぼす影響. 日本獣医畜産大学 動物生理制御学教室 卒業論文.
- 9) Polin D (1957) Formation of porphyrin from delta-aminolevulinic acid by uterine and liver tissue from laying hens. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 94: 276-279.
- 10) Poole HK (1965) Spectrophotometric identification of eggshell pigments and timing of superficial pigment deposition in the Japanese quail. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 119: 547-551.

- 11) 坂井田 節 (1990) 鶏の飼養管理の改善による生産性向上. 11. 卵質改善による商品の差別化. 鶏の研究, 65: 105-108.
- 12) Sakaino M, Ishigaki M, Ohgari Y, Kitajima S, Masaki R, Yamamoto A and Taketani S (2009) Dual mitochondrial localization and different roles of the reversible reaction of mammalian ferrochelatase. *FEBS Journal*, 276: 5559-5570.
- 13) 坂本恭一・石塚昌宏・宮成節子・鈴木貴也・田中 徹 (2006) 5-アミノレブリン酸による卵殻色改善効果. 日本家禽学会講演要旨 (秋季大会号), 43 巻, p. 43.
- 14) Sinclair PR, Sinclair JF, Bonkowsky HL, Gibbs AH and DeMatteis F (1982) Formation of cobalt protoporphyrin by chicken hepatocytes in culture. Relationship to decrease of 5-aminolaevulinate synthase caused by cobalt. *Biochemical Pharmacology*, 31: 993-999.
- 15) Statistical Analysis System (2004) SAS Software, Ver. 9.1., SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- 16) Stevens EV, Miller LK, Weinstein S and Kappas A (1974) Biosynthesis of  $\delta$ -aminolevulinic acid and porphobilinogen in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 47B: 779-786.
- 17) 杉山みのり (2006) 鶏ハーダー腺におけるプロトポルフィリン合成能の検討. 日本獣医畜産大学 動物生理制御学教室 卒業論文.
- 18) Taketani S, Ishigaki M, Mizutani A, Uebayashi M, Numata M, Ohgari Y and Kitajima S (2007) Heme synthase (Ferrochelatase) catalyzes the removal of iron from heme and demetalation of metalloporphyrins. *Biochemistry*, 46: 15054-15061.
- 19) Tushima N and Yamada M (1988) Comparison of sex hormone dependent induction of  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase in chick liver and oviduct. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 90B: 187-192.
- 20) 對馬宣道・蛭名良充・西館亮一・向後克哉・坂本 誠・上野正博・吉田達行・中尾暢宏・田中 実 (2012a) 鶏の卵殻色に関する研究 (1) 褐色卵の視覚的な判定基準と卵殻色素量との関係について. 畜産の研究, 66: 1113-1117.
- 21) 對馬宣道・蛭名良充・西館亮一・向後克哉・坂本 誠・吉田達行・中尾暢宏・田中 実 (2012b) 鶏の卵殻色に関する研究 (2) アロウカナ交雑種の卵殻色素について. 畜産の研究, 66: 1199-1205.
- 22) 内野健志 (1993) ロードアイランドレッド種の卵殻色改善. 鶏の研究, 68: 84-86.
- 23) 魚住紀雄 (2010) 個体別データから見た採卵鶏の特徴. Available from URL: <http://www.kyodo-siryu.co.jp/develop/20100115P19-23.pdf>
- 24) Wang ZP, Liu RF, Wang AR, Li JY and Deng XM (2011) Expression and activity analysis reveal that heme oxygenase (decycling) 1 is associated with blue egg formation. *Poultry Science*, 90: 836-841.