

ニワトリ卵胞顆粒膜におけるプラスミノゲン・アクチベーター活性と 小卵胞の急速成長相への転移との関係

武石 勝¹・安住水穂²・西田沙世²・山村奈美子²・後藤尚也¹・
 渋井仁志¹・土井 守³・上吉道治²

¹ 日本配合飼料株式会社中央研究所飼料畜産開発センター, 栃木県芳賀郡茂木町 321-3621

² 岐阜大学農学部, 岐阜県岐阜市柳戸 501-1193

³ 岐阜大学応用生物科学部, 岐阜県岐阜市柳戸 501-1193

ニワトリにおいて, 小卵胞の急速成長相への転移にエストラジオール 17 β (E2) の関与が報告されているが, 細胞外マトリックスの再構築に関与することが知られているプラスミノゲン・アクチベーター (PA) の関与については未だ十分には検討されていない。そこで, 本実験では顆粒層細胞で合成される PA が急速成長相への転移に関与するかを調べた。

本実験では, 最大卵胞 (F1) の排卵 18 時間前に相当する時期に, 白色レグホーン種産卵鶏から, 大きさが 9 番目の卵胞 (F9) から F1 までの卵胞を採取した。卵胞の重量測定後, 卵胞膜と顆粒膜を単離し, 卵胞膜における E2 濃度をラジオイムノアッセイで, 顆粒膜における PA 活性を色素基質を用いる方法で, DNA をジフェニルアミンの変法で測定した。さらに, 別の個体から同様に採取した卵胞から組織切片を作成し, 卵胞組織を観察した。

卵胞重量は F6 から F5 にかけて有意に増加し, その後はほぼ直線的に増加した。卵胞重量増加量を卵胞表面積で除して算出した物質移動率は, F6 から F5 にかけて有意に増加し, F5 から F4 にかけてピークを示した後, その後は卵胞の発育に従って減少した。PA 活性と E2 濃度は, 共に F8 から F7 にかけて有意に増加し, F7 において最も高い値を示した後, 卵胞の発育に従って減少した。顆粒膜の DNA 含量は F9 から F5 にかけて徐々に増加した後, その後はほぼ一定で推移した。顆粒層細胞層は F9 から F7 までは 3~4 層と密であったが, F6 では 2~3 層となり F5 から F1 においては単層であった。

これらの結果から, 本実験では小卵胞の急速成長相への転移は F6 で起こったと推察され, 転移直前の F7 において PA 活性と E2 濃度が共に増加し, しかも最も高い値を示したことから, 小卵胞の急速成長相への転移に E2 のみならず, 顆粒膜における PA 活性も関与していると示唆された。

キーワード: プラスミノゲン・アクチベーター, 顆粒膜, エストラジオール 17 β , 卵胞急速成長相, ニワトリ

緒 言

成熟したニワトリの卵巣には, 数千個の卵胞が存在し, 卵胞ヒエラルキーを形成している。これらの卵胞は, 直径 10 mm 以上の黄色卵胞と直径 5~10 mm の黄色卵胞, 直径 2~4 mm の白色卵胞と直径 1 mm 以下の白色卵胞に大別される (Gilbert, 1971)。一般的に直径 10 mm 以上の黄色卵胞は急速成長相に入った卵胞で, この相に入った卵胞は急速に卵黄を蓄積して, 7~9 日間で重量は約 0.5 g から 16~19 g へと, 直径は約 8 mm から 30~40 mm へと成長し, 排卵可能な成熟卵胞となり, 排卵される (Gilbert, 1971)。卵胞は, 急速成長相に入った卵胞から順次排卵され, 通常

卵胞の順位制が途中で入れ替わることはない。また, ニワトリの卵胞は, 産卵期になると, 通常, 毎日 1 個ずつ小卵胞が急速成長相へと転移する (Zakaria *et al.*, 1983, 1984a, 1984b)。

このような卵胞発育において, 約 24 時間の周期であるニワトリの排卵周期中において, 急速成長相への転移は, 最大卵胞の排卵 8~14 時間前に相当する時期に高い頻度で起こる (Zakaria *et al.*, 1983; Zakaria *et al.*, 1984b)。しかもこの時期にステロイド産生阻害剤である Aminoglutethimide を投与すると, 小卵胞の急速成長相への転移率が有意に減少し, 卵胞の卵胞膜外層細胞で生産される E2 が著しく減少したことから, E2 が急速成長相への転移に重要な役割を担っていると推察されている (Imai *et al.*, 1998)。

プラスミノゲン・アクチベーター (PA) は, 活性の無い酵素前駆体であるプラスミノゲンを, セリンプロテアーゼの一種であり線維を溶解する酵素であるプラスミンに変換する蛋白質である (Robbins *et al.*, 1967)。ニワトリの卵胞における PA は, Urokinase-Type (uPA) と Tissue-Type (tPA) の 2 種類が存在するが (Tilly and Johnson, 1987; Poilits *et al.*, 1990; Johnson *et al.*, 1997), tPA の方が量的に少ないことから uPA が PA の主

2008年9月11日受付, 2008年9月19日受理

連絡者: 武石 勝

〒321-3621 栃木県芳賀郡茂木町大字天子 451

日本配合飼料株式会社中央研究所飼料畜産開発センター

Tel: 0285-63-1121

Fax: 0285-63-1120

E-mail: masaru.takeishi@nippai.co.jp

体であると考えられている (Lafrance *et al.*, 1993; Johnson *et al.*, 1997)。ニワトリの卵胞における uPA は主に顆粒層細胞で合成され、成長した卵胞より発育途上の卵胞において活性が高く (Politis *et al.*, 1990; Tilly *et al.*, 1992; Lafrance *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1997), しかも PA 活性が排卵誘起ホルモンとして知られる黄体形成ホルモン (LH) によって抑制される (Tilly and Johnson, 1987)。これらの報告から、鳥類では顆粒層細胞で生産される uPA は卵胞発育に関与すると考えられている。しかしながら、小卵胞の急速成長相への転移に顆粒層細胞の PA が関与するか否かについては未だ十分には検討されていない。

そこで本実験では、小卵胞の急速成長相への転移に、PA が関与する可能性があるか否かを検討するために、9 番目に大きい卵胞 (F9) から最大卵胞 (F1) までの卵胞を採取し、それらの卵胞において、色素基質を用いて顆粒膜における PA 活性とラジオイムノアッセイを用いて卵胞膜における E2 濃度を測定すると共に、卵胞重量、卵胞に取り込まれる物質移動率を算出し、また、卵胞発育に伴う顆粒層細胞層の組織変化を観察した。

材料と方法

供試鶏

本実験で使用したニワトリは、白色レグホーン種産卵鶏 (24~30 カ月齢) と雄鶏 (24 ケ月齢) である。産卵鶏は岐阜大学付属農場無窓鶏舎内で点灯開始を午前 5 時とする 14 時間照明: 10 時間暗黒の明暗周期条件下で、餌と水は自由に摂取させた。産卵鶏は最低 3 週間以上産卵記録を取り、1 クラッチの長さが 4 から 6 で、比較的規則正しくクラッチを繰り返す、クラッチ間の休産日が 1 日であるニワトリのみを使用した。また、雄鶏は岐阜大学付属農場開放鶏舎にて飼育し、餌と水は自由に摂取させた。本実験は、実験動物の管理と使用に関する指針 (ILAR and NRC, 1996) に従って実施した。

試料の採取

最大卵胞 (F1) の排卵 18 時間前に相当する時期に、ニワトリを断頭屠殺し、9 番目に大きい卵胞 (F9) から最大卵胞 (F1) までの卵胞を採取した。F9, F8, F7 については見た目の大きさでは序列の判断ができない場合があったため、重量に加えて直径を測定し、序列を明確にした。重量を測定した後、Gilbert らの方法 (1977) に従って卵胞膜と顆粒膜を分離し、卵胞膜の湿重量を測定した後、それらの検体を直ちに液体窒素で凍結させ、E2 と PA 活性測定時まで -80°C で保存した。同様の時期に採取し組織観察に供した卵胞は採取して重量測定後、速やかに固定液 (ブアン液および Modified Karnovsky 固定液) に入れた。

プラスミノージンの精製に使用した血清は雄鶏から採取し、精製当日に常法に従って血清を得た。

物質移動率の算出

物質移動率は、卵胞の単位表面積当たりの 1 日における物質移動率 ($\text{mg}/\text{cm}^2/\text{day}$) として、Warren and Conrad (1939) の方法に従い、序列 n-1 番目から n 番目にかけての卵胞重量増加量を序列 n-1 番目と n 番目の卵胞表面積の平均値で除して求めた。なお、卵胞の 1 日当たりの重量増加量は (g/day) は、同一個体から採取した卵胞の序列 n 番目から序列 n-1 番目の重量を差し引く

ことにより算出し、卵胞の表面積 (cm^2) は、Smith (1959) の方法に従い、卵胞重量 (g) の $2/3$ 乗に定数の 4.83 を掛けることによって求めた。

顆粒膜における PA 活性の測定

顆粒膜の PA 活性は Tilly と Johnson (1987) の色素性合成基質を用いる方法を一部変更して測定した。この方法は、プラスミンがバリニン-ロイシン-リジンのトリペプチドを認識して分解する性質を利用する方法で、トリペプチドに色素性のパラニトロアニリンを結合させた色素性合成基質 (D-Val-Leu-Lys-para-nitro-anilide dihydrochloride, Sigma) とプラスミノージンを検体中に添加することにより、検体中の PA により生成されたプラスミンの作用により、色素性合成基質より遊離したパラニトロアニリン (para-nitro-anilide: pNa) を分光光度計で測定することにより PA を測定する方法である。

1) プラスミノージンの精製

プラスミノージンに対する PA の作用には種特異性があると報告されている (Quigley *et al.*, 1974, Strickland and Beers, 1976) ので、本実験では PA 活性を測定するに際し、プラスミノージンを雄鶏血清から精製した。プラスミノージンの精製は、Deutsch と Mertz (1970) の方法に従って、リジンセファロース 4B によるアフィニティクロマトグラフィーとセファデックス G-25 を使用したゲル濾過により行った。雄鶏の血清 50 ml 当たりのプラスミノージン画分の蛋白質量は牛血清アルブミン相当で約 19 mg であった。

2) 測定操作

凍結保存していた顆粒膜を 0.2% Triton X 100-0.1 M トリス塩酸緩衝液 (0.2% Triton X 100-0.1 M Tris-HCl) 1 ml 中でガラスホモジェナイザー (氷水 4°C 下) を用いてホモジェナイズし、遠心分離 ($1500 \times g$, 20 分間, 4°C) して、その上澄みの一部を PA 活性の測定に、沈殿は DNA の測定に供した。

顆粒膜のホモジェネートの上澄み、雄鶏血清由来のプラスミノージン及び、色素性の合成基質を反応チューブに入れ、 37°C で 4 時間培養した。培養後、基質を分解して遊離した色素 (pNa) を分光光度計 (吸光度 405 nm) で測定することにより、PA 活性を測定した。

測定は同一検体について 3 本ずつ行い、その平均値を検体の測定値とし、pNa を標準液として同様に測定した標準曲線から、色素基質から遊離した pNa 量を算出した。

3) PA 活性値

顆粒層細胞の PA 活性は多くの研究者により報告されているが、その活性の表現法は研究者により様々であり、発色基質の吸光度で表した場合 (Tilly and Johnson, 1987; Johnson and Tilly, 1988), 活性値を総蛋白質濃度 (Tischkau *et al.*, 1996; Jackson *et al.*, 1993), 細胞数 (Tilly *et al.*, 1992), 顆粒層細胞の DNA 含量 (Lafrance *et al.*, 1993), 面積 (Jackson *et al.*, 1994) などで補正した場合が報告されている。一般的には細胞当たりの活性として DNA で補正する方法が考えられるが、ニワトリにおいて、卵胞が大きくなるに従い顆粒層細胞の DNA が減少すると報告され (Gilbert *et al.*, 1980), それは顆粒層細胞には核小体を 2 個以上含む細胞が存在し、その割合は卵胞が大きくなるに従い少なくなることによるのではないかと推察されている (Gilbert *et al.*, 1983)。

それ故、本実験では、卵胞表面積と卵胞重量増加量を基にして求めた物質移動率との関連も考慮して、PA 活性値は色素基質から遊離した pNa 量を卵胞表面積で除することにより卵胞表面積当たりの pNa nmol/cm² follicle として表した。

卵胞膜におけるエストラジオール 17β (E2) の測定

卵胞膜中の E2 の測定は、卵胞膜よりエーテルにより E2 を抽出後、群馬大学医学部生理活性分析センターより提供された抗血清を用いて、ラジオイムノアッセイにより行った。すなわち、凍結保存しておいた卵胞膜は、解凍後、組織の分解を促すためにアンモニア水 50 μl を加えて個体毎に眼科用せん刀で細断し、ガラス製ホモゲナイザーを用いてホモジェネートとし、エーテルによる抽出を 2 回行い、その乾固物を 1% 牛血清アルブミン-0.01 M リン酸緩衝液 (1% BSA-0.01 M PBS) で測定可能な濃度に希釈した。この希釈液 100 μl と 0.05 M エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)-0.01 M PBS で 10,000 倍に希釈した抗血清 100 μl と 1% BSA-0.01 M PBS で約 25,000 cpm/100 μl となるように希釈した³H 標識 E2 (104 Ci/mmol, Amersham Pharmacia Biotech UK Ltd.) 100 μl を入れ、攪拌後、常温で 20 時間以上培養した。培養後、0.5% チャコール・0.05% デキストラン懸濁液を 200 μl 加え、攪拌後、正確に 30 分間、4℃ 下で静置した。その後、遠心分離 (3,000×g, 15 分, 4℃) して、上澄 700 μl を放射能測定用バイアルに採取し、これに液体シンチレーター (ACS-II, Amersham Pharmacia Biotech UK Ltd.) を 4 ml 加え、約 10 秒間攪拌し、一日放置した後、液体シンチレーションアナライザー (Packard) で放射能を測定した。なお、測定は同一検体について 3 本ずつ行い、その平均値を検体の測定値とし、同様にして作成した標準曲線から、E2 濃度を決定した。

顆粒膜中の DNA の測定

顆粒膜中の DNA は、ジフェニルアミン法の変法 (Leyva and Kelly, 1974) に従って測定した。

測定は同一検体について 2 本ずつ行い、その平均値を検体の測定値とし、子牛胸腺 DNA (Sigma) を 0.01 M Tris-HCl 緩衝液に溶解した標準液を用いて同様に測定した標準曲線から DNA 量を算出した。

卵胞の組織観察

本研究では、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色と、トルイジンブルー染色の 2 種類の方法を実施した。HE 染色は、卵胞をブアン固定液に室温下で 24 時間浸漬後、卵胞組織を約 5 mm 平方に切り出してさらにブアン固定液に 24 時間浸漬して固定し、パラフィン切片の作成と HE 染色は常法に従って実施した。トルイジンブルー染色は、卵胞を Modified Karnovsky 固定液に 4℃ 下で 5 時間浸漬後、卵胞組織を 1~2 mm 平方、約 1 mm の厚さに整形してさらに Modified Karnovsky 固定液に 4℃ 下で 5 時間浸漬させた。続いて後固定として、2% オスミウム酸溶液に 4℃ 下で 90 分浸漬してから、エタノールとアセトンによる脱水、樹脂包埋、ウルトラミクロトームによる薄切を順次実施して得られた切片をトルイジンブルー染色に供した。

得られた組織標本はカナダバルサムで封入後、光学顕微鏡で観察し、写真撮影を行った。

統計処理

データの統計処理は一元配置の分散分析後、平均値間の有意差

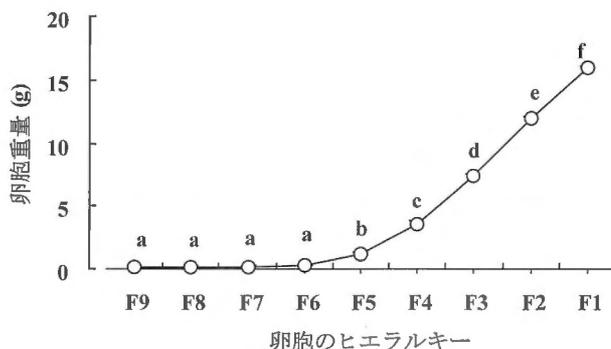


図 1. 排卵 18 時間前に採取した各卵胞の重量
各点は 8~10 羽の平均値±標準誤差
異符号間に 5% 水準の危険率で有意差あり

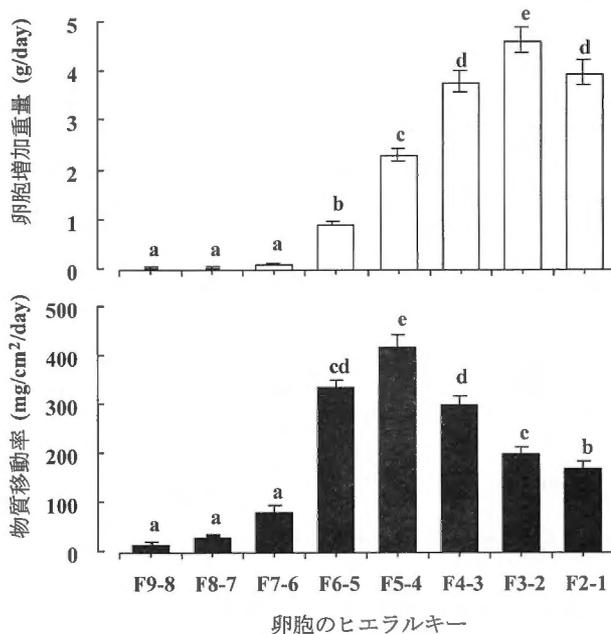


図 2. 排卵 18 時間前に採取した各卵胞重量増加と物質移動率
各点は 8~10 羽の平均値±標準誤差
異符号間に 5% 水準の危険率で有意差あり

の検定は Duncans new multiple range test で危険率が 5% 以下になった場合に有意な差があるものとした。

結 果

卵胞重量と物質移動率

F9 から F1 のヒエラルキーの卵胞における卵胞重量を図 1 に示した。卵胞重量は F6 から F5 にかけて有意に増加し ($P < 0.05$)、その後は卵胞の発育に伴いほぼ直線的に増加した。卵胞重量増加量 (図 2, 上段) を卵胞表面積で除して求めた卵胞単位表面積当たりの 1 日における物質移動率 (図 2, 下段) は、F6 から F5 にかけて有意に増加し ($P < 0.05$)、F5 から F4 にかけて最も高い値を示した後、卵胞の発育に従って徐々に減少した。

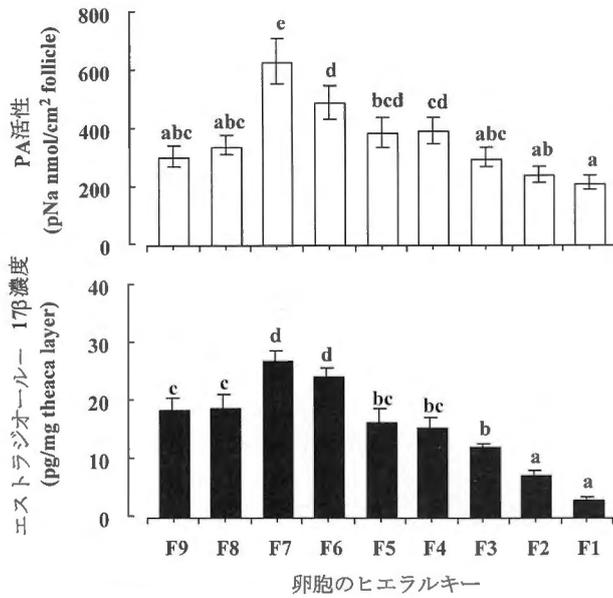


図 3. 排卵 18 時間前に採取した各卵胞の PA 活性と卵胞膜あたりのエストロジオール-17β 濃度
各点は 8~10 羽の平均値±標準誤差
異符号間に 5% 水準の危険率で有意差あり

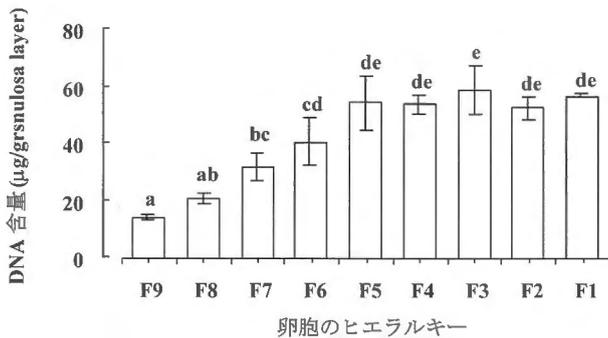


図 4. 排卵 18 時間前に採取した各卵胞の顆粒膜中 DNA 含量
各点は 8~10 羽の平均値±標準誤差
異符号間に 5% 水準の危険率で有意差あり

PA 活性と E2 濃度

卵胞表面積当たりの顆粒膜における PA 活性と卵胞膜 mg 当たりの E2 濃度を図 3 に示した。

PA 活性と E2 濃度は共に、F8 から F7 にかけて有意に増加し (P<0.05), F7 において最も高い値を示した後、卵胞の発育に伴って徐々に減少した。

DNA 含量と卵胞組織の光学顕微鏡観察

卵胞顆粒膜当たりの DNA 含量を図 4 に示した。F9 から F5 にかけて徐々に増加した後、F5 から F1 にかけては有意な差は認められず (P>0.05), ほぼ一定の値で推移した。

卵胞を光学顕微鏡下で観察した組織像を図 5 に示した。F9 (A, 0.12 g) から F7 (C, 0.31 g) の顆粒層細胞の組織像は、細胞同士が

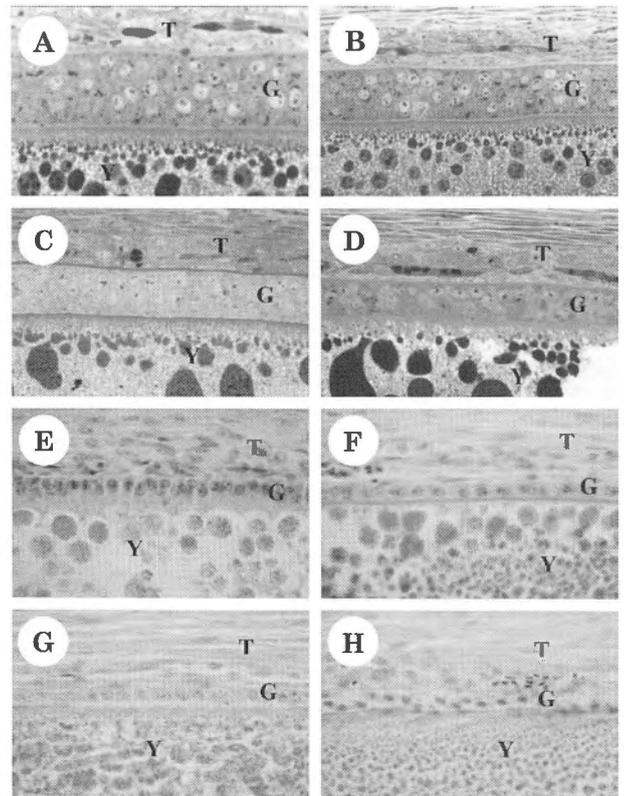


図 5. 排卵 18 時間前に採取した各卵胞の顆粒層の組織像
染色法はトルイジンブルー染色 (A, B, C, D) あるいは HE 染色 (E, F, G, H) とし、写真撮影の倍率は全て 200 倍とした。T=卵胞膜, G=顆粒層, Y=卵黄。(A) 重量が 0.12 g の F9 卵胞。(B) 重量が 0.17 g の F8 卵胞。(C) 重量が 0.31 g の F7 卵胞。(D) 重量が 0.59 g の F6 卵胞。(E) 重量が 1.89 g の F5 卵胞。(F) 重量が 5.94 g の F4 卵胞。(G) 重量が 9.1 g の F3 卵胞。(H) 重量が 17.8 g の F1 卵胞。

密着した 4~5 層の構造を示したが、F6 (D, 0.59 g) では 2~3 層に変化し、F5 (E, 1.89 g) から F1 (H, 17.8 g) の顆粒膜はすべて単層だった。本観察では、ヒエラルキーが上位の卵胞の方が顆粒膜細胞の形状は扁平となり、細胞と細胞の間には間隙が認められた。

考 察

本実験においては、F9 から F1 までの卵胞ヒエラルキーにおける卵胞重量と物質移動率は、共に F6 から F5 にかけて有意に増加し、その後の卵胞重量はほぼ直線的に増加した。このことは、本実験下では、小卵胞の急速成長相への転移が 6 番目に大きい卵胞で起こったことを示している。これに対して、顆粒膜における PA 活性と卵胞膜における E2 濃度は、共に、急速成長相へ転移に先立ち、F8 から F7 にかけて有意に増加し、しかも急速成長相の転移直前の F7 において最も高い値を示した。これらのことは、小卵胞の急速成長相への転移に E2 のみならず顆粒層細胞における PA 活性も関与していることを示唆している。

顆粒層細胞の増殖の指標として、顆粒膜における DNA 量を測

定したところ、本実験で採取した最も小さい F9 の卵胞から急速成長相に入った直後の F5 の卵胞まで徐々に増加し、その後の増加は認められなかった。本実験における顆粒膜の採取は、Gilbertらの方法 (1977) により実施しており、この顆粒膜中に含まれる DNA は全て顆粒層細胞に由来すると考えられる。従って、卵胞ヒエラルキーにおける顆粒膜中の DNA 量の増加は、顆粒層細胞の増殖に依存していると考えられる。従って、DNA 量の測定結果から推察すると、顆粒層細胞は F5 までは増殖するが、その後の増殖は起こらないと推察された。

顆粒層細胞層の形態は、急速成長相に入る前の卵胞では、細胞間が密に詰まった重層の構造を示すが、急速成長相に入る頃から重層が単層へと構造が変化することが既に報告されている (Rothwell and Solomon, 1977; Perry *et al.*, 1978)。この際の顆粒層細胞層の形態は、柱状、立方状へと変化し、細胞間隙が形成され、この間隙を通して卵細胞を取り囲む卵黄膜内層へと卵黄前駆物質が移行することが認められている (Wyburn *et al.*, 1966; Perry *et al.*, 1978)。本実験においても、顆粒膜を形成する顆粒層細胞層は急速成長相に入る前の卵胞の F7 までは 4~5 層で密であったが、急速成長相に入った F6 で 2~3 層に変化し、顆粒層細胞の増殖が認められなくなった F5 から F1 までの卵胞では全て単層であることが観察された。卵胞の成長に伴い、顆粒層細胞層の表面積は増加するが、F5 から F1 までの顆粒層細胞の増殖は認められず、しかも細胞層が単層である状況から考えると、急速成長相において卵胞が成長するに従って顆粒層細胞間の間隔は広がるということが推察される。これは、本実験で観察した F1 の組織において、顆粒層細胞間に間隙を確認したことから裏付けられた。

一方、卵胞表面積当たりの物質移動率は、急速成長相に入った直後の卵胞 (F6-F5 および F5-F4) は増加したが、その後は成長に従って順次減少した。本実験において、急速成長相に入った後の F5 から F1 までの卵胞の顆粒層細胞層は単層で、卵胞が成長するに従い顆粒層細胞間の間隔が広がったにもかかわらず、卵胞表面積当たりの物質移動率は減少した。これらのことは、卵黄前駆物質が顆粒層細胞の間隙を通過する際に、顆粒層細胞間の間隔の広さのみに依存していないことを示している。

急速成長相に入る直前の卵胞において、顆粒層細胞層は密な 4~5 層を形成するが、急速成長相に入った直後の卵胞では 2~3 層に再構築される、顆粒膜における PA 活性は急速成長相に入る直前の卵胞において最も高い値を示した。さらに、急速成長相に入った後の卵胞では、卵胞の成長に伴い、卵胞表面積当たりの物質移動率は減少し、顆粒膜における PA 活性も減少した。この結果は、顆粒層細胞の PA が顆粒層細胞層の再構築を促し、結果として小卵胞から急速成長相への転移を引き起こす要因の 1 つになったことを示唆している。これらは、鳥類の卵巣における PA の役割として以前から報告されている顆粒層細胞の増殖への関与 (Tischkau *et al.*, 1996) を裏付けるとともに、卵胞における物質移動、すなわち卵黄前駆物質の取り込みへの積極的な関与を示唆している。

排卵周期中の小卵胞から急速成長相への転移は、排卵 8~14 時間前に相当する時期に最も高い頻度で起こり (Zakaria *et al.*, 1983; Zakaria *et al.*, 1984b)、その転移に E2 が重要な役割を担ってい

ると報告されている (Imai *et al.*, 1998)。本実験でも E2 が小卵胞の急速成長相への転移に関与する可能性が示された。

E2 は、肝臓での卵黄前駆物質の合成を刺激することにより (Deeley *et al.*, 1975) 卵胞発育に関与することが知られているが、鳥類においては卵胞膜外層細胞で合成され (Porter *et al.*, 1989; Nitta *et al.*, 1991; Caicedo *et al.*, 1997)、卵胞膜における濃度は未熟卵胞において高く、卵胞が成長するに従って減少し (Shahabi *et al.*, 1975; Bahr *et al.*, 1983; Marrone and Hartelendy, 1983)、卵胞刺激ホルモン (FSH) により卵胞膜外層細胞における E2 の産生が刺激される (Caicedo *et al.*, 1997)。さらに、卵胞膜における FSH 結合能は小さい卵胞で高く、卵胞が成長するに従い低くなる (Etches and Cheng, 1981) ことが明らかにされている。これらのことは、卵胞発育を刺激するとして知られている FSH が少なくとも E2 を介して小卵胞の急速成長相への転移に関与していることを示唆している。

一方、ほ乳類においては、FSH が顆粒層細胞における PA の合成と分泌を刺激することが報告されている (Liu *et al.*, 1981; Wang and Leung, 1983; Martinat and Combarnous, 1983)。しかしながら、鳥類においては、LH によって抑制されることは知られている (Tilly and Johnson, 1987) が、純粋な FSH が得られていないことから、FSH が刺激するか否かは明らかにされていない。本実験においては、急速成長相に入る直前の卵胞において、顆粒膜 PA 活性は最も高く、その後は卵胞が成長するに従い順次減少することが見出された。この結果は、すでに報告されている未成熟な卵胞ほど顆粒膜 PA 活性が高いとの結果 (Lafrance *et al.*, 1993) と一致し、また、顆粒膜における uPA mRNA レベルが成熟卵胞より未成熟卵胞の方が高いとの結果 (Li *et al.*, 1997) とも相応している。また、顆粒層細胞における FSH 結合能 (Masuda *et al.*, 1984; Ritzhaupt and Bahr, 1987) と FSH 受容体 mRNA 量が、共に卵胞が発育するに従い低くなる (You *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1997) ことが明らかにされている。これらのことから、鳥類における顆粒層細胞 PA 活性も FSH に調節されている可能性が推察されるが、これについては更なる検討が必要とされる。

謝 辞

実験遂行にあたり懇意なる御指導を賜り、エストラジオール 17 β 抗血清を提供して頂いた群馬大学医学部生理活性分析センター及び、終始実験に協力頂いた日本配合飼料株式会社中央研究所の所員一同に感謝致します。

引用文献

- Bahr JM, Wang SC, Huang MY and Calvo FO. Steroid concentrations in isolated theca and granulosa layers of pre-ovulatory follicles during the ovulatory cycle of domestic hen. *Biology of Reproduction* 29 : 326-334. 1983.
- Caicedo RE, Kawashima M and Kamiyoshi M. Steroidogenesis in the theca cells of follicles in response to ovine gonadotropins. *Japanese Poultry Science*, 34 : 36-44. 1997.
- Deeley RG, Mullinix KP, Wetekam W, Kronenberg HM, Meyers M, Eldridge JD and Goldberger RF. Vitellogenin synthesis in the avian liver. Vitellogenin is the precursor of

- the egg yolk phosphoproteins. *Journal of Biological Chemistry*, 250 : 9060-9066. 1975.
- Deutsch D and Mertz ET. Plasminogen purification from human plasma by affinity chromatography. *Science*, 170 : 1095-1098. 1970.
- Etches RJ and Cheng KW. Changes in the plasma concentrations of luteinizing hormone, progesterone, oestradiol and testosterone and in the binding of follicle-stimulating hormone to the theca of follicle during the ovulation cycle of the hen (*Gallus domesticus*). *Journal of Endocrinology*, 91 : 11-22. 1981.
- Gilbert AB. The ovary. In : *Physiology and biochemistry of the domestic fowl*. (Bell DJ and Freeman BM eds.), Vol. 3. pp. 1163-1208. Academic Press. London. 1971.
- Gilbert AB, Evans AJ, Perry MM and Davidson MH. A method for separating the granulosa cells, the basal lamina and the theca of the preovulatory ovarian follicle of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Journal of Reproduction and Fertility*, 50 : 179-181. 1977.
- Gilbert AB, Hardie MA, Perry MM, Dick HR and Wells JW. Cellular changes in the granulosa layer of the maturing ovarian follicle of the domestic fowl. *British Poultry Science*, 21 : 257-263. 1980.
- Gilbert AB, Hardie MA and Wells JW. Variations in the number of nucleoli in the granulosa cells of the domestic fowl during follicular growth. *British Poultry Science*, 24 : 57-61. 1983.
- ILAR and NRC (Institute of Laboratory Animal Research, Commission on Life Sciences, National Research Council). *Guideline for the care and use of laboratory animals* (7th edition). National Academy Press. 1996.
- Imai K, Sonoda Y and Kai O. Follicular transformation in hen's ovary after the administration of aminoglutethimide. *Japanese Poultry Science*, 35 : 329-336. 1998.
- Jackson JA, Zhang P and Bahr JM. Plasminogen activator activity in preovulatory follicles during the ovulatory cycle of the chicken. *Biology of Reproduction*, 49 : 1141-1146. 1993.
- Jackson JA, Tischkau SA, Zhang P and Bahr JM. Plasminogen activator production by the granulosa layer is stimulated by factor(s) produced by the theca layer and inhibited by the luteinizing hormone surge in the chicken. *Biology of Reproduction*. 50 : 812-819. 1994.
- Johnson AL, Bridgham JT and Anthony RV. Expression of avian urokinase and tissue-type plasminogen activator messenger ribonucleic acid during follicle development and atresia. *Biology of Reproduction*, 56 : 581-588. 1997.
- Johnson AL and Tilly JL. Effects of vasoactive intestinal peptide on steroid secretion and plasminogen activator activity in granulosa cells of the hen. *Biology of Reproduction*, 38 : 296-303. 1988.
- Lafrance M, Zhou L and Tsang BK. Interactions of transformation growth factor- α and - β and luteinizing hormone in the regulation of plasminogen activator activity in avian granulosa cells during development. *Endocrinology*, 133 : 720-727. 1993.
- Leyva A Jr and Kelley WN. Measurement of DNA in cultured human cells. *Analytical Biochemistry*, 62 : 173-179. 1974.
- Li J, Croze F, Yan W, Hache RGJ and Tsang BK. Up-regulation of urokinase plasminogen activator messenger ribonucleic acid and protein in hen granulosa cells by transforming growth factor alpha in vitro during follicular development. *Biology of Reproduction*, 56 : 1317-1322. 1997.
- Liu Wk, Burleigh BD and Ward DN. Steroid and plasminogen activator production by cultured rat granulosa cells in response to hormone treatment. *Molecular Cellular Endocrinology*, 21 : 63-73. 1981.
- Marrone BL and Hertelendy F. Steroidogenesis by avian ovarian cells : effects of luteinizing hormone and substrate availability. *American Journal of Physiology*, 244 : E487-E493. 1983.
- Martinat N and Combarous Y. The release of plasminogen activator by rat granulosa cells is highly specific for FSH activity. *Endocrinology*, 123 : 433-435. 1983.
- Masuda S, Wakabayashi K, Koga O. Change of properties of the follicle stimulating hormone like gonadotropin binding sites in the follicles of the hen during follicular growth. *Japanese Journal of Zootechnical Science*, 55 : 399-408. 1984.
- Nitta H, Osawa Y and Bahr JM. Multiple steroidogenic cell populations in the thecal layer of preovulatory follicles of the chicken ovary. *Endocrinology*, 129 : 2033-2040. 1991.
- Perry MM, Gilbert AB and Evans AJ. Electron microscope observations on the ovarian follicle of the domestic fowl during the rapid growth phase. *Journal of Anatomy*, 125 : 481-497. 1978.
- Politis I, Wang L, Turner JD and Tsang BK. Changes in tissue-type plasminogen activator-like and plasminogen activator inhibitor activities in granulosa and theca layer during ovarian follicular development in domestic hen. *Biology of Reproduction*, 42 : 747-754. 1990.
- Porter TE, Hargis BM, Silsby JL and Halawani EIM. Differential steroid production between theca interna and theca externa cells : a three-cell model for follicular steroidogenesis in avian species. *Endocrinology*, 125 : 109-116. 1989.
- Quigley JP, Ossowski L and Reich E. Plasminogen, the serum proenzyme activated by factors from cells transformed by oncogenic viruses. *Journal of Biological Chemistry*, 249 : 4306-4311. 1974.
- Ritzhaupt LK and Bahr JM. A decrease in FSH receptors of granulosa cells during follicular maturation in the domestic hen. *Journal of Endocrinology*, 115 : 303-310. 1987.
- Robbins JC, Summarián L, Hsieh B and Shah R.J. The peptide chains of human plasmin. Mechanism of activation of human plasminogen to plasmin. *Journal of Biological Chemistry*, 242 : 2333-2342. 1967.
- Rothwell B and Solomon S. The ultrastructure of the follicle wall of the domestic fowl during the phase of rapid growth. *British Poultry Science*, 18 : 605-610. 1977.
- Shahabi NA, Norton HW and Nalbandov AV. Steroid levels in follicles and plasma of hens during the ovulatory cycle. *Endocrinology*, 95 : 962-968. 1975.
- Smith AH. Follicular permeability and yolk formation. *Poultry Science*, 38 : 1437-1446. 1959.
- Strickland S and Beers WH. Studies on the role of plasminogen activator in ovulation : in vitro response of granulosa cells to gonadotropins, cyclic nucleotides and prostaglandins. *Journal of Biological Chemistry*. 251 : 5694-5702. 1976.
- Tilly JL and Johnson AL. Presence and hormonal control of

- plasminogen activator in granulosa cells of the domestic hen. *Biology of Reproduction*, 37 : 1156-1164. 1987.
- Tilly JL, Kowalski ZLI, Levoresse JM and Johnson AL. Plasminogen activator activity and thymidine incorporation in avian granulosa cells during follicular development and periovulatory period. *Biology of Reproduction*, 46 : 195-200. 1992.
- Tischkau SA, Jackson JA, Finnigan-Bunick C and Bahr JM. Granulosa layer : primary site of regulation of plasminogen activator messenger ribonucleic acid by luteinizing hormone in the avian ovary. *Biology of Reproduction*, 55 : 75-79. 1996.
- You S, Bridgham JT, Foster DN and Johnson AL. Characterization of the chicken follicle stimulating hormone receptor (cFSH-R) complementary deoxyribonucleic acid and expression of cFSH-R messenger ribonucleic acid in the ovary. *Biology of Reproduction*, 55 : 1055-1062. 1996.
- Wang C and Leung A. Gonadotropins regulate plasminogen activator production by granulosa cell. *Endocrinology*, 112 : 1201-1207. 1983.
- Warren DC and Conrad RM. Growth of the hen's ovum. *Journal of Agricultural Research*, 58 : 875-894. 1939.
- Wyburn G, Johnston H and Aitken R. Fate of the granulosa cells in the hen's follicle. *Zeitschrift Fur Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, 72 : 53-65. 1966.
- Zakaria AH, Miyaki T and Imai K. The effect of aging the ovarian follicular growth in laying hens. *Poultry Science*, 62 : 670-674. 1983.
- Zakaria AH, Miyaki T and Imai K. The relationships of clutch length and egg position on ovarian follicular growth in laying hens. *Poultry Science*, 63 : 1250-1254. 1984a.
- Zakaria AH, Sakai H and Imai K. Time of follicular transformation to the rapid growth phase in relation to the ovulatory cycle of laying hens. *Poultry Science*, 63 : 1061-1063. 1984b.
- Zhang C, Shimada K, Saito N and Kansaku N. Expression of messenger ribonucleic acids of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone receptors in granulosa and theca layers of chicken preovulatory follicles. *General and Comparative Endocrinology*, 105 : 402-409. 1997.

Relationship between Plasminogen Activator Activity in Granulosa and Follicular Transformation to the Rapid Growth Phase of Small Follicles

Masaru Takeishi¹, Mizuho Azumi², Sayo Nishida², Namiko Yamamura², Hisaya Goto¹, Hitoshi Shibui¹, Osamu Doi³ and Michiharu Kamiyoshi²

¹ Laboratory of Nippon Formula Feed Mfg. Co., Ltd. Tochigi 321-3621

² Faculty of Agriculture, Gif University, Gif 501-1193

³ Faculty of Applied Biological Science, Gif University, Gif 501-1193

In domestic fowl, estradiol-17 β (E2) is reported in relation to the follicular transformation to the rapid growth phase of small follicles. However, the participation of the plasminogen activator (PA) in granulosa, which is known to be involved in cell proliferation and extra-cellular matrix remodeling, is not sufficiently clear. To confirm its participation, follicles from the largest follicle (F1) to the ninth largest follicle (F9) were collected at 18 hours before ovulation of the F1 and weighed. In the follicles, the activity of PA in granulosa was measured using plasminogen extracted from rooster's plasma and chromogenic substrate. DNA content of granulosa was determined by the diphenylamine method. Also, E2 in theca was determined by radioimmunoassay. Morphological investigation of ovarian follicles was implemented by the usual method.

Follicular weight increased significantly from F6 to F5, and thereafter in a straight manner until F1. The material transfer rate of follicles increased significantly from F6 to F5, and the peak was from F5 to F4, and then decreased according to the growth of follicles. Both the PA activity of granulosa and the E2 concentration of theca increased significantly from F8 to F7, showed a peak in F7 and decreased according to the growth of follicles. The granulosa layer changed from multilayer into monolayer in the developmental stage from F7 to F5. DNA content of granulosa increased from F9 to F5, and thereafter remained constant. In the present experiment, follicular transformation of the rapid growth phase of small follicles was found to occur in F6, and both E2 and PA activity increased before the follicular transformation. This suggests that not only E2 of theca but also PA activity of granulosa participate in the transformation to the rapid growth phase of small follicles.

(Japanese Journal of Poultry Science, 46 : J1-J8, 2009)

Key words : chicken, estradiol-17 β , granulosa layer, plasminogen activator activity, rapid growth phase