一 研 究 一

過排卵処理家兎卵巣の酵素組織化学的研究

石 島 芳 郎・佐久間勇次・石 田 一 夫

(東京農業大学) (日本大学農獣医学部) (新潟大学農学部)

過排卵処理を行なった家兎の妊娠は正常には起こりにくく、たとえ、多数の胚が着床しても、その大部分は着床直後あるいはその後において死することが知られている¹⁻⁴⁾。この事実は著者らの観察においても同様であったが、とくに、PMS で処理された家兎の場合には着床成績が芳しくない傾向にあった⁵⁻⁹⁾。したがって、過排卵処理家兎においては、このような着床前、着床直後あるいは妊娠後半に起こる胚の死の原因を解明することは重要な課題であると思われる。このうち、妊娠後半に起こる胎児死の原因は、母体側の環境要因や overcrowding によるものと考えられているが^{4,10,11)}、着床前および直後の胚の死、流失の原因については、まだ十分にわかっていない。

これまでの報告によれば、過排卵処理の影響として、排卵の遅延¹²⁾、卵子の下降促進^{13,14)}、卵分割の遅延¹⁵⁾あるいは卵子自身の欠陥¹⁶⁾などが指摘されているが、一方では、過排卵卵子の受精率は正常で^{7,19-19)}、子宮へ到達した時期の胚も形態的には正常であること^{13,14)}、また、過排卵卵子を正常家兎の子宮に多数移植した場合、可成り多い卵子が着床すること²⁰⁾など卵子側には支障の認められないことが明らかにされている。これらのことから、PMS 処理を行なった家兎の着床成績が芳しくない原因は、子宮の着床条件が整わないことが主なものであると推察される。この子宮における着床条件の不備の原因は、過排卵処理卵巣の内分泌異常にもとづくものか、あるいは、外的ホルモンが直接子宮に影響を与えているか

のいずれかと考えられる。著者らは、これまでに処理卵巣を組織学的および組織化学的に検索した結果、とくに多発する血胞とそれに含まれている脂質の状態から黄体ホルモンの分泌不足が想像されることをのべ²¹⁻²³⁾、過排卵処理家兎の卵巣の異常が妊娠をさまたげている原因の一つと考えてきた。

この実験は、卵巣の steroid 合成、代謝に関連した酵素の動態をしらべることによって卵巣機能の働きを知る目的で、PMS 処理をほどこした家兎卵巣の steroid dehydrogenase (SDH) を含む各種の dehydrogenase (DH), nonspecific esterase (Etase) および acid phosphatase (Acid Phase) を組織化学的に検出し、これらの諸酵素の活性を正常妊娠家兎の卵巣のものと比較したものである。

実験材料および方法

この実験に用いた卵巣は、正常妊娠、過排卵処理妊娠および過排卵処理不妊の家兎(日本白色種成雌、体重約 3 kg) から採取した。採取した卵巣は、いずれも交配後 10 日のもので、それらの肉眼的観察は Table 1 に示した。

過排卵処理は、PMS (セロトロピン、帝臓) を 1 日当り 40 IU、5 日間皮下注射し、PMS 注射終了後 48 時間で交配させ、その直後、HCG 主剤のシナホルン (帝臓) を静脈注射する方法を用いた。卵巣は肉眼的観察を行なった後、直ちにドライアイス・アセトンで凍結し、クリオスタットで 15 μ の切片を作製した。検出した酵素の種類および方法²⁴⁻²⁸⁾は Table 2 に示すとおりである。切片は、いずれの方法においても 37°C で 60 分間浸漬した後、直ちにホルマリンで固定し、グリセリンジェリーで封入した。

実験成績

正常妊娠家兎、過排卵処理妊娠家兎および過排卵処理不妊家兎の交配後 10 日の卵巣における黄体、血胞およ

Enzymohistochemical studies of the rabbit ovary following superovulation treatment.

ISHIJIMA, Yoshiro (Department of Zootechnical Science, Tokyo University of Agriculture, Setagaya-ku, Tokyo 156), Yuzi SAKUMA (College of Agriculture and Veterinary Medicine, Nihon University, Setagaya-ku, Tokyo 154) & Kazuo ISHIDA (Department of Animal Husbandry, Faculty of Agriculture, Niigata University, Niigata 950)

Jap. J. Animal Reprod. 18 (2), 1972.

Table 1. Ovaries of rabbits used in this study

Treatment	Rabbit No.	No. of implantated embryos		Weight of ovaries	No. of corpora lutea		No. of blood follicles		No. of large follicles	
		L	R		L	R	L	R	L	R
No treatment	406	2	4	750 mg	3	9	0	0	0	0
Superovulation	403	2	5	600	5	10	1	4	0	0
	404	0	0	1040	5	3	16	16	6	8
	405	0	0	640	7	6	8	6	16	10

L: left, R: right, Females were killed 10 days after mating.

Table 2. Histochemical methods

	Enzymes	Substrates	References
Steroid dehydrogenases	3 α -hydroxysteroid dehydrogenase (3 α -OH-SDH)	androsterone**	BAILLIE, FERGUSON & HART (1966) ²⁴⁾
	4 ⁵ -3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (4 ⁵ -3 β -OH-SDH)	dehydroepiandrosterone (DHA)****	
		pregnenolone**	
	11 β -hydroxysteroid dehydrogenase (11 β -OH-SDH)	11 β -hydroxyprogesterone**	
	16 β -hydroxysteroid dehydrogenase (16 β -OH-SDH)	16 β -hydroxyestradiol**	
Other dehydrogenases	17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (17 β -OH-SDH)	estradiol**	BARKA & ANDERSON (1965) ²⁵⁾
	glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PDH)	D-glucose-6-phosphate disodium salt*	
	succinate dehydrogenase (SuDH)	sodium succinate	
	malate dehydrogenase (MDH)	sodium DL-malate***	
	β -hydroxybutyrate dehydrogenase (β α HDH)	DL- β -hydroxybutyric acid sodium salt*	
	lactate dehydrogenase (LDH)	sodium DL-lactate*	
	α -glycerophosphate dehydrogenase (α -GDH)	DL- α -glycerophosphate disodium salt*	
	glutamate dehydrogenase (GDH)	sodium glutamate***	
Esterase	nonspecific esterase	naphthol AS-LC acetate*	BURSTONE (1957) ²⁶⁾
Phosphatase	acid phosphatase (Acid Phase)	naphthol AS-BI phosphate*	BURSTONE (1958) ²⁷⁾ modified by BARKA (1960) ²⁸⁾

Remarks: * Sigma chemical Co., U. S. A.
 ** Ikapharm Co., Israel
 *** Wako pure chemical Industries Ltd.
 **** Nakarai chemicals Ltd., Kyoto

Table 3. Enzyme activities of ovaries in normal and superovulated rabbits

	No.	3 α -OH-SDH (NAD)			3 α -GH-SDH (NADH)			Δ^5 -3 β -OH-SDH (DHA; NAD)			Δ^5 -3 β -OH-SDH (DHA; NADP)		
		CL	BF	IT	CL	BF	IT	CL	BF	IT	CL	BF	IT
NP	406	+		+	±		±	+		‡	+		‡
SO	P 403	+	+	+	±	±	±	+	+	‡	+	±	‡
	S { 404	±	±	+	±	±	±		±	‡	±	±	‡
	405	±	±	+		±	±	±	±	‡	±	±	‡
	No.	Δ^5 -3 β -OH-SDH (pregnenolone; NAD)			Δ^5 -3 β -OH-SDH (pregnenolone; NADP)			11 β -OH-SDH (NAD)			11 β -OH-SDH (NADP)		
		CL	BF	IT	CL	BF	IT	CL	BF	IT	CL	BF	IT
NP	406	+		‡	±		+	+		+	±		±
SO	P 403	+	+	‡	±	±	+	+	+	+	±	±	±
	S { 404	±	±	‡	±	±	+	±	±	+	±	±	±
	405	±	±	‡	±	±	+	±	±	+	±	±	±
	No.	16 β -OH-SDH (NAD)			16 β -OH-SDH (NADP)			17 β -OH-SDH (NAD)			17 β -OH-SDH (NADP)		
		CL	BF	IT	CL	BF	IT	CL	BF	IT	CL	BF	IT
NP	406	+		+	±		±	+		+	±		±
SO	P 403	+	+	+	±	±	±	+	+	+	±	±	±
	S { 404	±	±	+	±	±	±	±	±	+	±	±	±
	405	±	±	+	±	±	±	±	±	+		±	±
	No.	G-6-PDH			SuDH			MDH (NAD)			MDH (NADP)		
		CL	BF	IT	CL	BF	IT	CL	BF	IT	CL	BF	IT
NP	406	‡		‡	‡		‡	‡		‡	+		+
SO	P 403	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	+	+	+
	S { 404	‡	‡	‡	+	+	‡	‡	‡	‡	+	+	+
	405	‡	‡	‡		+	‡	‡	‡	‡	+	+	+
	No.	β -HDH			LDH			α -GDH			GDH		
		CL	BF	IT	CL	BF	IT	CL	BF	IT	CL	BF	IT
NP	406	±		±	‡		+	+		‡	±		±
SO	P 403	±	±	±	+	+	+	+	+	‡	±	±	±
	S { 404	±	±	±	+	+	+	±	±	‡	±	±	±
	405	±	±	±	+	+	+		±	‡	±	±	±
	No.	Etase			Acid Phase			NP: Normal pregnancy SO: Superovulation P: Pregnancy S: Sterility CL: Corpora lutea BF: Blood follicles IT: Interstitial tissues					
		CL	BF	IT	CL	BF	IT						
NP	406	+		+	‡		+						
SO	P 403	±	±	±	‡	‡	+						
	S { 404	±	±	±	‡	‡	+						
	405		±	±	‡	‡	+						

Remarks: ± trace, + weak, ‡ moderate, ‡‡ intense, ‡‡‡ very intense

び間質腺について、SDH, その他の DH, Etase および Acid Phase を組織化学的に検出したところ、Table 3 および Fig. 1~16 に示すような成績が得られた。

黄体: Table 3 で明らかなように、正常妊娠家兎 (No. 406) の黄体では、G-6-PDH および MDH (NAD) の活性は強く、SuDH (Fig. 8), LDH (Fig. 13) および Acid Phase は中等度、 3α -OH-SDH (NAD), Δ^5 - 3β -OH-SDH (DHA 基質, NAD, NADP) (Fig. 1), Δ^5 - 3β -OH-SDH (pregnenolone 基質; NAD) (Fig. 4), 11β -OH-SDH (NAD), 16β -OH-SDH (NAD), 17β -OH-SDH, MDH (NADP), α -GDH (Fig. 15) および Etase は弱く、 3α -OH-SDH (NADP), Δ^5 - 3β -OH-SDH (pregnenolone 基質; NADP), 11β -OH-SDH (NADP), 16β -OH-SDH (NADP), 17β -OH-SDH (NADP), β -HSDH および GDH は痕跡的に認められた。過排卵処理後妊娠した家兎 (No. 403) の黄体では、LDH および Etase 活性が低下している以外は、すべて正常妊娠の黄体の所見と変わりは認められなかった (Table 3 および Fig. 2, 5, 9, 11)。これに対して、過排卵処理後不妊に終わった家兎 (No. 404 および 405) の黄体では、 3α -OH-SDH (NAD), Δ^5 - 3β -OH-SDH (DHA; NAD, NADP) (Fig. 3), Δ^5 - 3β -OH-SDH pregnenolone, NAD) (Fig. 6), 11β -OH-SDH (NAD), 16β -OH-SDH (NAD), 17β -OH-SDH (NAD), SuDH (Fig. 10), MDH (NAD) (Fig. 12) および α -GDH (Fig. 16) 活性は、正常妊娠および過排卵処理妊娠の黄体にみられた活性よりは低い傾向にあった。LDH (Fig. 14) および Etase は正常妊娠の黄体よりは低かったが、過排卵処理妊娠の黄体とは差がなく、また、上記以外の酵素は妊否に関係なく同程度の活性を示した。

血胞: 正常妊娠家兎の卵巣には血胞が存在しなかったが、過排卵処理家兎の卵巣には妊、不妊に関係なく血胞が出現した (Table 1)。血胞には卵胞内膜性細胞増殖がみられるので、この細胞の酵素活性について観察を行なった。血胞に検出された酵素の活性は、Table 3 および Fig. 2, 3, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 14, 16 にみられるように、黄体とほとんど変わらなかった。過排卵処理後に妊娠したものと不妊のものとは血胞における酵素活性にちがいがみられ、妊娠のものにおいて、NAD 依存の 3α -OH-SDH, Δ^5 - 3β -OH-SDH (pregnenolone), 11β -OH-SDH, 16β -OH-SDH および 17β -OH-SDH などの SDH は黄体と同様弱い活性ながら、不妊のものにくらべるとやや高い傾向であった。その他の酵素では SuDH, α -GDH および MDH (NAD) 活性がやはり不妊のもの

より高い傾向にあった。これら以外の酵素については、両者の間にまったく差がみられなかった。

間質腺: 間質腺の酵素活性は α -GDH が正常妊娠において強く (Fig. 15), 過排卵処理妊娠および過排卵処理不妊のものでは幾分弱かったが (Fig. 16), その他の酵素では処理、未処理にかかわらず差は認められなかった。間質腺の酵素活性を黄体と血胞のそれとくらべると、 Δ^5 - 3β -OH-SDH (DHA; NAD, NADP) (Fig. 2 および 3), Δ^5 - 3β -OH-SDH (pregnenolone; NAD, NADP) (Fig. 5 および 6) および α -GDH (Fig. 16) は間質腺が高く、逆に Acid Phase は間質腺が低い傾向にあった。間質腺においての各種酵素の活性は、MDH (NAD), G-6-PDH, Δ^5 - 2β -OH-SDH (DHA, NAD) が強く、SuDH は中等度、その他は弱い出現が痕跡的であった。

考 察

過排卵処理家兎の妊娠がうまくいかないことはよく知られており¹⁻⁹⁾、とくに、PMS 処理された家兎では着床前の胚の消失や着床直後の胚斃死率が高いため不妊に終るか、たとえ、妊娠したとしても生存胎児数は正常の範囲を超えるものは少ない傾向にある^{8,5-9)}。著者らは、この原因について処理後の卵子の動態^{7,12-14,17)}や処理卵巣の組織観察²¹⁻²³⁾の面から検討を加え、卵子側にはほとんど問題がみみられないのに着床しにくい事実を認め、一方、卵巣とくに血胞の組織化学的検索から推測して、これは、過排卵処理を受けた卵巣の内分泌異常、とくに、黄体ホルモンの不足から着床条件が整わないためではないかと想像した。そこで、さらに卵巣の steroid 合成、代謝に関連した酵素の動態を観察する必要性を感じ、この実験を行なった。したがって、今回の実験では妊否のはっきりした材料を使うため交配後 10 日の正常妊娠卵巣、過排卵処理妊娠卵巣ならびに処理不妊卵巣を用いて諸酵素の検出を試みた。

まず、SDH についてみると、正常妊娠家兎の黄体では、 3α -OH-SDH (NAD), Δ^5 - 3β -OH-SDH (DHA 基質; NAD, NADP), Δ^5 - 3β -OH-SDH (pregnenolone 基質; NAD), 11β -OH-SDH (NAD), 16β -OH-SDH (NAD) および 17β -OH-SDH (NAD) は弱いながら活性を示し、これは過排卵処理妊娠の黄体でも同様であった。妊娠家兎の黄体には、これらの SDH が組織化学的にこれまでにも証明されている。一方、過排卵処理後不妊に終わった 2 例 (No. 404, 405) の卵巣とも、妊娠卵巣の黄体に出現した酵素活性は痕跡的となり、処理後不妊に終わった家兎の黄体の SDH 活性の低下が示唆された。

また、正常妊娠の卵巣には血胞の出現はみられないが、過排卵処理卵巣では妊、不妊に関係なく血胞が存在し、これらの血胞において、NAD 依存の 3α -OH-SDH, Δ^5 - 3β -OH-SDH (DHA 基質, pregnenolone 基質), 11β -OH-SDH, 16β -OH-SDH および 17β -OH-SDH 活性は、妊娠家兎の方がいくぶん高い傾向にあった。間質腺については、3 種の卵巣の間にまったく差が存在せず、検出された酵素の種類は、妊娠卵巣の黄体と同様であったが、 Δ^5 - 3β -OH-SDH (DHA 基質; NAD, NADP), Δ^5 - 3β -OH-SDH (pregnenolone 基質; NAD) は黄体や血胞より強い活性を示した。組織化学的に Δ^5 - 3β -OH-SDH 活性が黄体より間質腺に強く現われることはこれまでも報告されており³¹⁾、著者らの前の観察^{32,33)}においても同様であった。このことは、この時期の黄体ホルモン分泌の主体が間質腺にあることを示唆しているのではないと思われる。文献的に、間質腺が黄体ホルモンの産生を行なっていることはよく知られている^{32~35)}。以上のように、今回の観察で過排卵処理卵巣と正常妊娠卵巣との間の SDH 活性は間質腺には差がみられなかったが、黄体、血胞では処理後不妊になった場合に若干低下することが判明した。このような事実は、ホルモンバランスになんらかの影響を与えていることは想像にかたくない。一方、HAFEZ ら³⁶⁾、POLIDORO および BLACK⁴⁾ は、正常妊娠家兎と過排卵処理妊娠家兎の黄体ホルモン量を比較し、妊娠時には差がないとのべていること、また、HALLIDAY³⁷⁾ は着床前の胚の消失は閉鎖黄体の多い場合に高いことを報告している。したがって、今後着床前の卵巣についての検討も必要であろう。

その他の DH については、妊娠家兎の黄体、間質腺に G-6-PDH および MDH (NAD) の活性が強く、また SuDH 活性は中等度に現われ、これは過排卵処理後妊娠したものの黄体、血胞、間質腺においても同様であった。過排卵処理後不妊に終わった卵巣ではこれらの酵素のうち MDH (NAD), SuDH 活性が黄体と血胞でいくぶん低い活性を示していた。 α -GDH は正常妊娠の卵巣の間質腺に強く、また、黄体に弱く活性が認められ、これらは不妊卵巣にくらべるといくぶん高い活性であった。このように、steroid 代謝に関係すると考えられている³⁸⁾ G-6-PDH, MDH, SuDH 活性はいずれの卵巣にも認めることができた。BIDDULPH ら³⁹⁾ は、生化学的に過排卵処理家兎卵巣と偽妊娠卵巣の SuDH 活性を比較し、妊娠初期には差がないと報告している。したがって、今回の不妊卵巣における MDH, SuDH 活性の低下がどのような意味をもつものかは、なお検討を要する。KIDWELL ら⁴⁰⁾

は、成熟ラットに過排卵を誘起させると G-6-PDH は卵巣全体として増加するとのべている。本実験の家兎の場合にも G-6-PDH が不妊卵巣で低下しなかったのは処理が影響しているためと考えられる。

Etase は、正常妊娠の黄体と間質腺に弱く、過排卵処理卵巣(妊、不妊とも)の黄体、血胞、間質腺に痕跡的に認められ、過排卵処理によっていくぶん活性が低くなる傾向がみられた。Acid Phase は 3 者間にまったく差がみられなかった。この Acid Phase は間質腺より黄体に高い傾向がみられたが、これは黄体機能と関連しているためと思われる。

以上のように、過排卵処理卵巣の諸酵素を検出して、正常家兎卵巣の活性と比較した結果、処理後不妊に終わった卵巣に活性の低下した酵素がいくつか認められた。したがって、これらの酵素活性の異なりから過排卵処理を受けた卵巣機能の低下を推論することができるが、なお今後、生化学的方面からも検討を加えてみたい。

要 約

交配後 10 日の正常妊娠、過排卵処理妊娠および過排卵処理不妊家兎の卵巣について、酵素組織化学的検出を行なったところ、つぎのような成績が得られた。

正常妊娠家兎の黄体の steroid dehydrogenase (SDH) については、 3α -OH-SDH (NAD), Δ^5 - 3β -OH-SDH (DHA 基質, NAD, NADP; pregnenolone 基質, NAD), 11β -OH-SDH (NAD) 16β -OH-SDH (NAD) および 17β -OH-SDH (NAD) の活性は弱く認められたが、 3α -OH-SDH (NADP), Δ^5 - 3β -OH-SDH (pregnenolone 基質, NADP), 11β -OH-SDH (NADP), 16β -OH-SDH (NADP) および 17β -OH-SDH (NADP) は痕跡程度にしか観察できなかった。その他の dehydrogenase (DH) 活性については、G-6-PDH, MDH (NAD) 活性は強く、SuDH, LDH は中等度、MDH (NADP), α -GDH は弱く、 β -HDH, GDH は痕跡的であった。さらに、Acid Phase は中等度に、Etase は弱い活性を示した。

過排卵処理後妊娠した家兎の黄体では、LDH および Etase 活性が正常妊娠のものより低かったが、その他の酵素活性は、いずれも正常妊娠のもと変わらなかった。これに対して、過排卵処理後不妊に終わった家兎にあっては、妊娠したものに弱いながら活性を示した OH-SDH はいずれも低い活性を示し、同時に SuDH, MDH (NAD) および α -GDH の活性も低かった。過排卵処理家兎にみられる血胞の酵素活性は黄体の場合とほぼ同様で、妊否による違いも黄体と同じ傾向を示した。

間質腺の酵素活性は、黄体や血胞のそれに比べて、 $4^5-3\beta-OH-SDH$, $\alpha-GDH$ が強く現われ、これに反して Acid Phase は低かったが、その他の酵素活性には差がみられなかった。また、正常妊娠、過排卵処理妊娠および過排卵処理不妊家兎の間では、SDH 活性にはまったく変化が現われず、その他の酵素についても、処理家兎において $\alpha-GDH$ および Etase 活性の低下がみられた程度であった。

この論文の概要は、本会秋季研究会 (1971) において発表した。

(1972. 2. 14 受付)

文 献

- 1) PARKES, A. S.: *J. Endocrinol.*, **3**, 268, 1942.
- 2) WARWICK, E. J., R. L. MURPHREE, L. E. CASIDA & R. K. MEYER: *Anat. Rec.*, **87**, 279, 1943.
- 3) ADAMS, C. E.: *J. Reprod. Fert.*, **1**, 36, 1960.
- 4) POLIDORO, J. P. & D. L. BLACK: *J. Reprod. Fert.*, **22**, 493, 1970.
- 5) 佐久間(勇)・石島(芳)・石田(一): 日不妊会誌, **9**, 5, 1964.
- 6) 石島(芳)・伊藤(雅)・平林(忠): 日本畜産学会 56 回大会, 1969.
- 7) 石島(芳)・平林(忠)・佐久間(勇): 家畜繁殖研究会秋季研究会, 1970.
- 8) ISHIJIMA, Y., M. ITO, T. HIRABAYASHI & Y. SAKUMA: *Jap. J. Fert. & Ster.*, **16**, 1, 1971.
- 9) 石島(芳)・平林(忠): 本誌, **18**, 29, 1972.
- 10) HAFEZ, E. S. E.: *Cornell Vet.*, **53**, 348, 1963.
- 11) HAFEZ, E. S. E.: *J. Exp. Zool.*, **156**, 269, 1964.
- 12) 石島(芳)・伊藤(雅)・平林(忠)・佐久間(勇): 農学集報, **13**, 145, 1969.
- 13) 石島(芳)・伊藤(雅)・平林(忠)・佐久間(勇): 本誌, **13**, 71, 1967.
- 14) 石島(芳): 農学集報, **16**, 44, 1971.
- 15) VARIAN, N. B., R. R. MAURER & R. H. FOOTE: *J. Reprod. Fert.*, **13**, 67, 1967.
- 16) TESH, J. M.: *J. Endocrinol.*, **35**, XXVIII-XXIX, 1966.
- 17) 石島(芳)・伊藤(雅)・東(泰): 本誌, **15**, 29, 1969.
- 18) 石島(芳)・伊藤(雅)・平林(忠)・佐久間(勇): 本誌, **14**, 43, 1968.
- 19) ADAMS, C. E.: *J. Endocrinol.*, **13**, 296, 1956.
- 20) ADAMS, C. E.: *J. Endocrinol.*, **24**, 471, 1962.
- 21) ISHIDA, K. & Y. SAKUMA: *Jap. J. Fert. & Ster.*, **7**, 151, 1962.
- 22) 石島(芳)・石田(一): 日不妊会誌, **15**, 10, 1970.
- 23) 石島(芳)・石田(一): 本誌, **16**, 126, 1971.
- 24) BAILLIE, A. H., M. M. FERGUSON & D. MCK HART: *Developments in Steroid Histochemistry*, pp. 72~102, Academic Press, 1966.
- 25) BARKA, T. & P. J. ANDERSON: *Histochemistry*, pp. 312~318, Hoeber Medical Division, Harper & Row Publishers, 1965.
- 26) BURSTONE, M. S.: *J. Nat. Cancer Inst.*, **18**, 167, 1957.
- 27) BURSTONE, M. S.: *J. Nat. Cancer Inst.*, **21**, 523, 1958.
- 28) BARKA, T.: *Nature*, Lond., **187**, 248, 1960.
- 29) RUBIN, B. L., H. W. DEANNE & J. A. HAMILTON: *Endocrinol.*, **73**, 748, 1963.
- 30) DAVIES, J., G. R. DAVENPOST, J. L. NORRIS & P. I. C. RENNIE: *Endocrinol.*, **78**, 667, 1966.
- 31) 和田(武)・森(浩)・田中(要)・竹内(晃)・岡野(錦): 日分泌会誌, **45**, 154, 1969.
- 32) 石田(一)・石島(芳)・遠藤(克): 本誌, **17**, 29, 1971.
- 33) 石島(芳)・平林(忠)・石田(一): 農学集報, 投稿中.
- 34) JACKNICZ, T. M. & D. T. ARMSTRONG: *Endocrinol.*, **83**, 769, 1968.
- 35) 岡野(錦): 卵巣, pp. 70~109, 協同医書出版社, 1963.
- 36) HAFEZ, E. S. E., Y. TSUTSUMI & M. A. KAHN: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **120**, 75, 1965.
- 37) HARRIDY, R.: *J. Endocrinol.*, **19**, 10, 1959.
- 38) 武内(忠)・清水(信)・小川(和): 酵素組織化学, p. 134, 朝倉書店, 1967.
- 39) BIDDULPH, C., M. S. MARTIN, S. C. BECKER & W. H. MCSHAN: *J. Endocrinol.*, **18**, 125, 1959.
- 40) KIDWELL, W. R., K. BALOGH, Jr. & W. G. WIEST: *Endocrinol.*, **79**, 352, 1966.

Summary

An enzymohistochemical demonstration was carried out using rabbit ovaries obtained 10 days after mating from normally pregnant, and pregnant or non-pregnant rabbits after superovulation treatment. The results are as follows.

Corpora lutea from normally pregnant rabbits showed weak or very slight hydroxysteroid dehydrogenase (OH-SDH) activities: activities of 3α -OH-SDH (NAD dependent), Δ^5 - 3β -OH-SDH (DNA as a substrate, NAD, NADP; pregnenolone, NAD), 11β -OH-SDH (NAD), 16β -OH-SDH (NADP) and 17β -OH-SDH (NAD) were weak, while those of 3α -OH-SDH (NADP), Δ^5 - 3β -OH-SDH (pregnenolone, NADP), 11β -OH-SDH (NADP), 16β -OH-SDH (NADP) and 17β -OH-SDH (NADP) were weaker, or slight. As for other dehydrogenases (DH), activities of G-6-PDH and MDH (NAD) were intense, those of SuDH and LDH were moderate, of MDH (NADP) and α -GDH were weak, and of β -GDH and GDH were slight. Activity of acid phosphatase was moderate, while that of non-specific esterase (Etase) was weak.

Corpora lutea from superovulated pregnant rabbits exhibited almost the same enzyme activities as those from normally pregnant rabbits, except for the decrease shown in LDH and Etase activities. On the other hand, corpora lutea from superovulated but non-pregnant rabbits showed weaker activities, in the OH-SDH that showed weak but plus activities concerning pregnant rabbits. They showed weaker activities in SuDH, MDH (NAD) and α -GDH also. Blood follicles that appeared in treated rabbits showed similar enzyme activities to corpora lutea.

Interstitial tissue, too, were observed concerning about the same enzymes as above.

Explanation of Figures

All the pictures of rabbit ovaries, each collected 10 days after mating, were taken at a magnification of $\times 100$.

- Fig. 1. Δ^5 - 3β -OH-SDH (DHA as substrate, NAD) in a normally pregnant ovary. The corpus luteum (C.L.) exhibits a weak reaction, whereas the interstitial tissue (I.T.) an intense one.
- Fig. 2. Δ^5 - 3β -OH-SDH (DHA, NAD) in a superovulated pregnant ovary. The C.L. and blood follicle (B.F.) exhibit weak reactions, whereas the I.T. an intense one.
- Fig. 3. Δ^5 - 3β -OH-SDH (DHA, NAD) in a superovulated non-pregnant ovary. The C.L. and B.F. exhibit very slight reactions whereas the I.T. an intense one.
- Fig. 4. Δ^5 - 3β -OH-SDH (pregnenolone as a substrate, NAD) in a normally pregnant ovary. The C.L. exhibits a weak reaction, whereas the I.T. a moderate one.
- Fig. 5. Δ^5 - 3β -OH-SDH (pregnenolone, NAD) in a superovulated pregnant ovary. The C.L. and B.F. exhibit weak reactions, while the I.T. a moderate one.
- Fig. 6. Δ^5 - 3β -OH-SDH (pregnenolone, NAD) in a superovulated non-pregnant ovary. The C.L. and B.F. exhibit very slight reactions, whereas I.T. a moderate one.
- Fig. 7. G-6-PDH in a superovulated pregnant ovary. The C.L., B.F. and I.T. exhibit intense reactions.
- Fig. 8. SuDH in a normally pregnant ovary. The C.L. and I.T. exhibit moderate reactions.
- Fig. 9. SuDH in a superovulated pregnant ovary. The C.L., B.F. and I.T. exhibit moderate reactions.
- Fig. 10. SuDH in a superovulated non-pregnant ovary. The C.L. and B.F. exhibit weak reactions, and the I.T. a moderate one.
- Fig. 11. MDH (NAD) in a superovulated pregnant ovary. The C.L., B.F. and I.T. exhibit very intense reactions.
- Fig. 12. MDH (NAD) in a superovulated non-pregnant ovary. The C.L. and B.F. exhibit moderate reactions, while the I.T. a very intense one.
- Fig. 13. LDH in a normally pregnant ovary. The C.L. exhibits a moderate reaction, and the I.T. a weak one.
- Fig. 14. LDH in a superovulated non-pregnant ovary. The C.L., B.F. and I.T. exhibit weak reactions.
- Fig. 15. α -GDH in normally pregnant ovary. The C.L. exhibits a weak reaction, whereas the I.T. an intense one.
- Fig. 16. α -GDH in a superovulated non-pregnant ovary. The C.L. and B.F. exhibit very slight reactions, while the I.T. a moderate one.

PLATE

PLATE