

# 岡山医学会雑誌

第89巻 5, 6, 合併号 (992, 993)

昭和52年 6月30日発行

## 海馬領域における亜鉛の組織化学的研究

田 村 仁

岡山大学医学部第一解剖学教室 (主任: 大塚長康教授)

(昭和51年 9月10日受稿)

### 緒 言

海馬領域 (海馬および歯状回) は形態学的に特異な細胞構築を示すと同時に, 大脳辺縁系の中核をなす部位として機能的にも, その重要性が認められている。これらの部位に関する細胞構築学的, あるいは髓鞘構築学的研究は今日まで多くの人々 (Rose 1926, 1927, 1931, Vogt 1937, その他) によって詳細に追求されてきた。一方, 組織化学的に, ジチゾンの生体内注射によって, は乳類の海馬領域が鮮紅色に反応し, しかもこの反応が亜鉛の存在によって発現することが明らかになった (Maske 1955)。また硫化銀法による検索も行なわれた (Timm 1958, Otsuka ほか1963, Haug 1972)。

このような海馬領域に存在する亜鉛がいかなる機能を有するかということに関しては不明な点が多い。しかし, 亜鉛に関する電子顕微鏡の組織化学 (Haug 1967, Iyata と Otsuka 1968, 1969, ) や  $Zn^{65}$  の電子顕微鏡のオートラジオグラフィー (Otsuka ほか 1975) 等による検索から, 海馬領域に分布している亜鉛は苔状神経線維終末内のシナプス小胞に一致して存在するところから, 亜鉛は神経伝達物質か, あるいはこれに関係する酵素に含まれているものと推察されているがまだ十分には解明されていない。

そこで各種のは乳類の海馬領域を比較解剖学的に, また発生学的にも検索し, さらに実験的研究も行な

い, 海馬領域における亜鉛の機能の一端を明らかにしたいと思い本研究を行なった。

### 材料と方法

比較解剖学的検索のためにマウス (5例), ラット (5例), モルモット (5例), ウサギ (5例), ネコ (3例) イヌ (3例), ヤギ (2例), サル (3例) の脳を用いた。

また発生学的研究のために出産 1 日, 3 日, 5 日, 7 日, 9 日, 11 日, 12 日, 14 日, 16 日, 20 日, 30 日, 50 日, 70 日, 100 日目のラットを用いた。

これらの動物はエーテル, またはラボナール麻酔ののち, ただちに開頭, 海馬領域を摘出し,  $H_2S$  純アルコールまたはホルマリン液に固定した。パラフィン包埋後, 厚さ 8—12 $\mu$  の切片を作製, 組織の一般像を明らかにするためにヘマトキシリン-エオジン染色, Nissl 染色および神経線維銀法 (Otsuka 1962) を行ない, 亜鉛の検索には硫化銀法 (Timm 1958) を用いた。

#### 硫化銀法 (Timm 1958)

- 1) 流化水素飽和純アルコール溶液に固定 6—12 時間
- 2) 純アルコールで過剰の硫化水素アルコールを簡単に洗う。
- 3) 組織片をパラフィン包埋, 切片をつくる。
- 4) 脱パラフィン後の切片を蒸留水でよく洗う。
- 5) つぎの液に入れて 30 分—1 時間

|     |                       |       |
|-----|-----------------------|-------|
| A 液 | 15~20%アラビアゴム水溶液, 10cc |       |
|     | 10%硝酸銀水溶液, 0.2cc      |       |
| B 液 | ハイドロキノン               | 2g    |
|     | クエン酸                  | 5g    |
|     | 蒸留水                   | 100cc |

A 液全量にB 液 2 ccを加えて混合したのち、ただちに使用する。

b) 蒸留水で充分水洗

7) ヘマトキシリンで核を染める。

8) 脱水, 透徹, 封入

実験的研究のためにラット (50例) を用いた。

この実験は0.2%のアンモニア水溶液10mlにジチゾン (diphenyl-thiocarbazone) 100mgを溶解した液を, 200mg/kg となるようにラットに投与した。腹腔内注射により投与後15分, 30分, 1時間, 1.5時間, 2時間, 2.5時間, 3時間, 3.5時間, 4時間, 5時間, 6時間に動物を殺し, 硫化銀法で染色した。またジチゾンの投与量を5 mg/kg, 10mg/kg, 25 mg/kg, 50 mg/kg, 75 mg/kg, 100 mg/kg, 150 mg/kg, 200 mg/kg, 300 mg/kg と変え, 投与後1.5時間目に殺し, 硫化銀法で染色した。

海馬領域でみとめられる硫化銀法で陽性反応を呈する物質 (亜鉛) の日内リズムを検索するためにラットの海馬領域を用いた。0時から24時までの間を3時間間隔で正常ラットを3例ずつ殺して, 硫化銀法で観察した。

## 結 果

### A. 比較解剖学的研究

Rose (1926, 1927, 1931) や Vogt (1937) らによって海馬領域は細胞ならびに髄鞘構造的にいくつかの分野と層に分けられたが, 彼等によって分類された分野と層は, 本研究に使用したマウス, ラット, モルモット, ウサギ, ネコ, イヌ, ヤギ, サルのいずれの動物においても認めることができた。すなわち, Nissl 染色法ならびに神経線維渡銀法の所見から, 歯状回には stratum moleculare, stratum granulosum および stratum multiforme の各層が, また海馬には脳室面から alveus, stratum multiforme, stratum pyramidale, stratum radiatum, stratum lacunosum および stratum moleculare の各層が分けられた。また, さらに海馬においては stratum pyramidale を構成する錐体細胞の形態, 大きさおよび配列状態から  $h_1$ ,  $h_2$ ,  $h_3$ ,  $h_4$  および  $h_5$  の5分野

が分類できた。

使用したすべての動物において海馬領域の層と分野の構成がほとんど一致しているので, 動物別ではなく各分野と層別に記載する。

#### 1) 海 馬

##### 1) $h_1$ 野

比較的散在性に分布する subiculum の錐体細胞は, 次第に集合して,  $h_1$  野の stratum pyramidale に続く。  $h_1$  野の stratum pyramidale は中等大の錐体細胞からなるやや幅広い帯状の層として認められる。  $h_1$  野では上記の5層が区別された。これらの層のなかで硫化銀法でやや褐色の陽性反応を呈する層は str. multiforme のみであった。

##### 2) $h_2$ 野

$h_2$  野は  $h_1$  野につづく領域で, str. pyramidale を形成する錐体細胞は  $h_1$  野のものにくらべて, やや小型で, それぞれの細胞の配列もかなり密である。  $h_2$  野においても各層を分けることができるが, それらのうち str. multiforme と str. radiatum が硫化銀法で褐色の弱陽性反応を呈した。

##### 3) $h_3$ 野

この分野はいわゆるアンモン角の形成にあずかるために彎曲する領域にあたる。  $h_3$  野を構成する錐体細胞はやや大きくなり, その配列もやや疎であった。この分野においても各層は明らかに区別できた。硫化銀法で反応させた標本で観察すると str. multiforme は他の分野と同様に淡褐色の弱陽性反応を呈した。 str. pyramidale では, ほとんどの錐体細胞は核も細胞体も反応は陰性であった。しかし, 細胞間のいわゆる neuropil に, 散在性に黒褐色の顆粒状の陽性物質が存在していることが観察された。また, str. radiatum では  $h_2$  野と  $h_3$  野の境界部に完全に一致して,  $h_3$  野の str. radiatum の str. pyramidale に接する領域が顕著な黒褐色の陽性反応を呈した。この強い陽性反応物質は str. radiatum を構成する錐体細胞の突起の表面に分布しているように観察された。 str. radiatum の強陽性反応部以外の全層は弱陽性反応を呈した。 str. lacunosum はきわめて薄い層で, 一般標本では固有の層としてみとめにくく, 硫化銀法においても陽性反応は得られなかった。 str. moleculare は全く反応しなかった。

##### 4) $h_4$ 野

$h_4$  野で彎曲した海馬の str. pyramidale は歯状回の門に向かって伸び,  $h_4$  野を形成する。  $h_4$  野の

錐体細胞はやや大型となり、これらの細胞が集まって、やや幅広い層を作っているが、その細胞の配列状態は $h_3$ 野におけるより疎であった。しかし、 $h_4$ 野における str. pyramidale を除く各層の幅は一樣に狭くなるが、その層の構造は観察された。 $h_4$ 野でも str. pyramidale の錐体細胞にはほとんど陽性反応を認めることができなかったが neuropil の所所には顆粒状の陽性物質が観察された。一方、str. radiatum の str. pyramidale に接する帯状の領域では、黒褐色の強陽性反応が認められた。これらの反応物質はここでも錐体細胞の突起の表面に分布しているとみなされた。この強陽性反応を呈する部位以外の str. radiatum の残りの領域および str. multiforme には弱陽性反応が認められたが str. moleculare では反応は陰性であった。

#### 5) $h_5$ 野

$h_5$ では $h_1$ - $h_4$ 野のような層の構造は認められなかった。 $h_4$ 野から移行して来た str. pyramidale の錐体細胞は層的な配列をとらず、歯状回の門内にやや大型の細胞として広く散在性に存在していた。したがってこの分野では str. radiatum に相当する層を認めることができなかった。この部でも錐体細胞は硫化銀法においてほとんど陰性であった。しかし、散在性に分布している神経細胞の突起からなるとされる部位に強陽性反応物質が観察された。

#### II) 歯状回

歯状回では海馬にみられたような分野を区別することはできないが、層の構造は観察することができた。すなわち、その門に対する側から、str. multiforme, str. granulosum および str. moleculare の3層が区分できる。Str. granulosum は顆粒細胞からなる層で、これらの細胞は密集し、数列ならんでいた。Str. moleculare と str. multiforme は顆粒細胞の突起や、他の領域からきた神経線維、および神経膠細胞によって作られた層である。硫化銀法では str. multiforme の str. granulosum に接する領域にのみ明瞭な帯状の強陽性反応がみられた。これらは顆粒細胞の突起に反応物質が存在することを示す像であると考えられた。その他の層には陽性反応は認められなかった。

#### B. 発生学的研究

この研究には方法のところで記載した発生各時期のラットを用いた。生後1日目のもので、すで

に海馬領域の形態は海馬と歯状回に分れており、一応その形をととのえているが、分野と層はまだ完成していなかった。この時期では硫化銀法ではいずれの部位も反応は陰性であった。生後5日目になると海馬の分野が分けられるようになってくるが、硫化銀法では陽性反応を呈する部位は認められなかった。生後9日目では海馬も、歯状回もその分野と層の形態学的な特徴が現れてくるが、硫化銀法ではいずれの部位も陰性であった。生後11日目になると海馬領域全体の分野と層が明らかに分けられるようになり、とくに渡銀法で歯状回の顆粒細胞の神経突起でもって構成される苔状線維が海馬の $h_3$ ,  $h_4$ および $h_5$ 野で認められるようになった。一方、硫化銀法でこの部を染めると歯状回の str. multiforme に相当する領域が陽性反応を呈してきた。他の部位はほとんど染ってこなかった。生後12日目になるとその海馬領域全体の形態は11日目とほとんど変わらないが、渡銀法で苔状線維がより明らかにその分布領域全体に出現してきた。硫化銀法では歯状回の str. multiforme の領域が強陽性反応を呈するとともに、 $h_3$ ,  $h_4$ 野の str. radiatum の str. pyramidale に接する領域、さらに $h_5$ 野が弱陽性反応を呈して来た。生後14日目以後は渡銀法で海馬領域全体の形態が成熟ラットに近い像を呈した。硫化銀法でも、この時期となると成熟ラット同様の領域が陽性反応を呈した。しかし、完全に成熟ラットと同じ反応を認めるのは生後20日目以後であった。

#### C. 実験的研究

ラットにジチゾン200mg/kgを投与して15分後に殺して、硫化銀法で染めると歯状回の str. multiforme は正常例と同様、強陽性反応を呈したが、海馬の $h_3$ - $h_5$ 野の str. radiatum では弱陽性反応を認めた。30分後の例では歯状回の str. multiforme のみが弱陽性反応を呈するが、海馬の $h_3$ - $h_5$ 野ではいずれの部位も陰性であった。ジチゾン投与後1-3時間目のものでは歯状回と海馬のいずれの部位も硫化銀法では全く染まってこなかった。投与後3.5時間目になると歯状回の str. multiforme の領域が硫化銀法で弱陽性を呈するようになった。さらに4時間後では正常例と同様に歯状回の str. multiforme と海馬の $h_3$ - $h_5$ 野の str. radiatum の領域で強陽性反応を認めるようになった。

上記の実験ではジチゾンの投与量を一定にして、

その投与後の時間を追って硫化銀法による海馬領域の反応状態を観察した。次の実験としてジチゾン投与後、海馬領域が全く硫化銀法で陰性となる投与後1.5時間目において、そのジチゾンの投与量を変えて、硫化銀法の反応状態を観察した。その結果、ジチゾンを5mg/kg投与したラットでは、その海馬領域における硫化銀法による陽性反応を呈する部位は正常例と変らなかった。投与量を10mg/kgに増加した後は、海馬領域の正常例で陽性反応を呈した部位がすべて陰性になった。さらに投与量を10mg/kg, 50mg/kg, 75mg/kg, 100mg/kg, 150mg/kg, 200mg/kg, 300mg/kgと増加していくと、いつれの投与量においても海馬領域の全領域は硫化銀法では染ってこなかった。また300mg/kgの投与量では投与後1.5時間後には実験に用いたラットのすべてが死んだ。

ラットの海馬領域を硫化銀法で反応させると上記のようにその一定領域に陽性反応を呈する部位が認められるが、これらの陽性物質が日内リズムにより、その反応態度が変わるかどうかを検索するため方法の項で記載したような実験を行った。このような実験を染色性の強弱のみで判定するのはあまり良い方法ではないが、できるだけ条件をよくするため、切片の厚さを一定にし、各時間の切片を同じ染色液の中で同時に染色した。また各時間ごとにラットを3例ずつ使用して、それぞれを比較検討した切片の所見を記載した。その結果、3時のものが、もっとも染色性が低下し、とくに $h_3$ 野の str, radiatum の帯状の硫化銀法で強陽性部位がほとんど陰性に近い反応を呈した。 $h_4$ の str, radiatum の str, pyramidale に接する部位や $h_5$ 野、また、歯状回の str, multiforme などの部位は強陽性反応を呈していた。しかし、 $h_3$ 野や $h_4$ 野の str, radiatum の強陽性反応部以外の部位や、str, multiforme の部位は硫化銀法ではほとんど染ってこなかった。21時のものでは、3時のもので硫化銀法で陰性であった $h_3$ 野の str, radiatum の部位が陽性を呈してくる以外は、ほとんど3時のものと、その所見は同様であった。6時と18時のものでは $h_3$ - $h_4$ 野の str, radiatum や $h_5$ 野や歯状回の str, multiforme の部位などの硫化銀法での強陽性反応部位はすべて強陽性反応を呈した。一方、 $h_3$ - $h_4$ 野の str, radiatum の強陽性部位以外の部位や str, multiforme では反応がほとんど陰性に近い状態を認めた。9時と15時のものでは海馬と

歯状回における硫化銀法での強陽性反応部位はすべて強陽性反応を呈した。また $h_3$ - $h_4$ 野の str, radiatum の強陽性反応部位以外の残りの部位と str, multiforme では陽性反応を認めた。12時と24時のものでは海馬領域の強陽性反応部位のすべての領域が強陽性反応を呈していた。さらに $h_3$ - $h_4$ 野の陽性反応部位も、この時間のものでは非常に強く反応していた。

## 考 察

Maske (1955) はモルモット、イヌ、ネコ、ウサギ、ラット、マウスを用い、そのいずれの動物においても、アルカリ性にしたジチゾンのアルコール溶液を静脈内に注射すると、海馬領域の特定の部位が紅染されることを認めた。つづいてFleischhauerとHorstmann (1967) はこの研究を追試し、イヌ、ネコ、ウサギ、モルモット、ハムスター、ハリネズミ、ラットで同様な所見が得られることを認めた。また、紅染する部位はRose (1926, 1927) の細胞構築学的分類にしたがうと、海馬領域では $h_3$ 野および歯状回の皮質板（もっぱら顆粒細胞を含む層）にあたることを報告した。しかし、これらの報告はいずれもジチゾン法で観察した研究で反応物質の組織学的な局在性を知ることができなかった。その点、Timm (1958) によって開発された硫化銀法は組織学的に光顕で観察できる利点がある。この硫化銀法を使用して検索した研究 (Timm 1958, von Euler 1961, Mc Lardy 1962, Otsuka と Umetani 1962, Haug 1973) では硫化銀法によって黒褐色に反応する物質は主として $h_3$ - $h_4$ 野の str, radiatum の str, pyramidale に接する帯状の領域と歯状回の str, multiforme に局在してもっとも強い反応が得られることが認められた。そして海馬における錐体細胞や歯状回における顆粒細胞の細胞体（核周部）にはほとんど反応物質が認められず、強陽性に反応する領域はさらに組織学的に詳しく検索すると錐体細胞の樹状突起の根部および顆粒細胞の神経突起の根部によって形成される部位に相当する。すなわち、この部位は歯状回の顆粒細胞の神経突起が海馬の $h_3$ ,  $h_4$  および $h_5$ 野に達し、この領域の錐体細胞の樹状突起に終る苔状神経線維の終末部に一致するのではないかと考えられた。(von Euler 1961, Otsuka ほか 1965)。しかし、光顕による検索ではこれ以上のことは不明であった。そこでHaug (1967), Iyata と Otsuka (1968, 1969) らは硫化銀法を電顕用に改良し

た方法でラットやウサギの海馬領域を検索した。その結果、 $h_3$ ,  $h_4$ ,  $h_5$ 野および齒状回の光顕で強陽性反応を呈した部位において電顕的に陽性反応物質の認められたのは苔状神経線維終末部のみであった。さらに神経終末部の中では、シナプス小胞に一致して、陽性物質が存在することが認められた。光顕で観察した結果、硫化銀法で陽性を呈す物質の海馬領域における分布状態は本研究で行なったように各種のは乳類のすべてにおいてどの動物も類似の反応を呈した。このことは電顕的にラットやウサギで認められたように、どののは乳類の海馬領域においても陽性物質はすべて苔状神経終末内に存在するものと思われる。

ジチゾン法も硫化銀法とともに重金属に対する組織化学的反応であるので、これらの方法のみでは、その反応する物質がどのような重金属であるかということを確認できない。しかし、すでにMaske (1955) は分光計測による所見から、ジチゾン反応が海馬領域に存在する亜鉛と結合することによって発現するものであろうと予測した。Timm もまた、顕微灰化法を用いて豊富な亜鉛の存在を確認している。Von Euler (1961), Otsuka ほか (1967) らは電顕による  $Zn^{65}$  のオートラジオグラフィによる研究から海馬の  $h_3$ - $h_5$ 野および齒状回の一部が多量の亜鉛を含んでいることを明らかにした。さらに Otsuka ほか (1975) の電顕による  $Zn^{65}$  のオートラジオグラフィにより亜鉛が苔状神経線維終末内のシナプス小胞に一致して存在することが認められた。したがって、海馬領域における硫化銀法による陽性反応物質は豊富な亜鉛を含んだ物質から構成されているものと考えられる。

上記のように海馬領域に存在する亜鉛の機能的な意義やその化学的性状についてはいまだ充分には解明されていない。Fleischhauer ほか (1958), Ortmann (1961) は亜鉛の分布状態が carboanhydrase の分布と McLardy (1962) らはそれと酸性フォスファターゼの分布がよく一致することから、亜鉛はこれら酵素類と関係があるのではないかと推論した。また、von Euler (1962) は海馬領域で苔状線維終末が分布する部位の興奮の伝達は、実験的に硫化水素で飽和されたリンゲル液を使用するとその伝達がシャ断されるという報告を行った。このことは苔状線維終末の伝達物質として亜鉛を含んだ物質が存在し、これが硫化水素により化学的变化を起こし、伝達をシャ断したものと推測できる。このような実

験結果と電顕的組織化学によって亜鉛の分布がシナプス小胞と密接な関係のあることから、Haug (1967), Ibata と Otsuka (1968, 1969) は亜鉛は酵素の成分としてではなく、なにかの終末に特異的に存在する神経伝達物質、あるいはこれと関係のある物質として作用しているのではないかと考えた。

Fleischhauer ほか (1957) はラット、ネコ、イヌ、では出産直後から年令の増加にともなうジチゾン反応がすくなく発現するが、モルモットでは新生仔ですでに陽性物質の存在がみとめられると報告している。しかし、これらの研究はいづれも個体発生中の一時期のみの所見であって、発生各時期の海馬領域を硫化銀法で検索したのは本研究が初めてである。本研究ではラットの海馬領域に硫化銀法で陽性反応物質すなわち、亜鉛が出現してくる時期は生後11~12日目であった。この時期は渡銀法で観察すると苔状線維が海馬領域の一定部位に出現してくる時期と一致した。また Otsuka ほか (1976) がラットの発生各時期の海馬領域を電顕的に観察した研究において、生後10~12日目頃は海馬領域に苔状線維終末がシナプスとしての形態を整えてくる時期に相当していた。このように海馬領域に亜鉛が出現してくる時期と苔状線維終末が完成する時期がよく一致することはまた、亜鉛が神経終末の機能と密接な関係があることを示唆しているものと思われる。

動物にジチゾン投与すると海馬領域の亜鉛は投与後一定時間 (1-3時間) の間、硫化銀法によって一過性に証明することができなくなり、その後、再び反応が陽性に回復することが初めて Otsuka ほか (1966, 1968) らにより報告された。その後 Danscher ほか (1971) や本研究においても同様な所見が得られた。また、Otsuka ほか (1975) らはジチゾン投与後における時間的経過による亜鉛の消長とよく一致して苔状線維終末の微細構造の変化が起ることを報告している。すなわち、ジチゾン投与後30分で苔状線維終末のシナプス小胞は減少を来し、1-2時間後ではもっとも減少する。しかし、3-4時間後には、シナプス小胞の数はほとんど正常に回復すると述べている。一方、このような変化はジチゾンの投与量の増減によっても同じ現象が生ずるのでないかと考え、われわれはジチゾンの投与量を代えて硫化銀法で反応を観察した。その結果はジチゾン 5 mg/kg の投与では変化を生じないが、10mg/kg になると海馬領域の硫化銀法で陽性反応を呈した部位がすべて陰性になった。しかし、ジチゾンの海馬領

域に対する作用機序を理論的に明らかにすることはできないが、その作用が苔状神経線維の終末にのみ選択的に変化を与え、近接の組織に対しては全く影響しないという事実は重要である。

海馬領域は行動と密接な関係があるといわれているので、この領域に存在する亜鉛に関係あるのではないかと思ひ、その分布状態の日内リズムを観察した。その結果、3時と21時のものが最も反応が弱く、次いで6時と18時のものがやや強い反応を呈した。さらに9時と15時のものが強い反応を呈し、最も反応が強いものには12時と24時のものであった。この結果から、海馬領域における硫化銀法による反応陽性物質が日内リズムによって量的な変動を呈しているということを示唆しているように考えられるが、これは組織切片の染色性の強弱による判定であって、今後より正確な生化学的定量が必要と考えられる。

#### 結 語

各種は乳類（サル、ヤギ、イヌ、ネコ、ウサギ、モルモット、ラット、マウス）の海馬領域（海馬と歯状回）を細胞構築学的に分類し、同時に硫化銀法を用いてこの領域における陽性反応物質（ここでは亜鉛）の分布を検索した。検索したすべての乳類

の海馬領域においてRoseの分類に一致した分野（ $h_1$ - $h_5$ 野および歯状回）と層がみられた。このように分類された分野と層において硫化銀法で強陽性反応を呈する領域は $h_3$ 、 $h_4$ および $h_5$ 野の錐体細胞の樹状突起に終る歯状回の顆粒細胞の神経突起（苔状線維）の終末部に一致していた。

また、個体発生学的にラットの海馬領域において亜鉛が出現してくる時期は渡銀法で苔状線維が海馬の錐体細胞の樹状突起に終末部を形成する生後11～12日目に相当した。

実験的にラットにジチゾン投与すると、海馬領域の亜鉛は投与後一定時間（1～3時）の間、硫化銀法によって一過性に反応を呈さなくなり、その後、再び反応が陽性に回復した。また、ジチゾンの投与量（5～300mg/kg）を変えて、投与後一定時間（1.5時間）して硫化銀法で海馬領域を検索すると投与量5mg/kgではその反応陽性部位には変化がなかったが、10mg/kg以上の投与量では反応がすべての部位で陰性となった。海馬領域にみられる亜鉛の日内リズムを、ラットで観察したが、硫化銀法で12時と24時で反応が最強となり、3時と21時が最弱となった。さらに硫化銀法による強陽性反応物質と亜鉛との関係、および亜鉛と考えられる物質の細胞内局在性とその機能が検討された。

#### 文 献

- 1) Danscher, G. and Haug, F. M. S. : Depletion of metal in the rat hippocampal mossy fiber system by intravital chelation with dithizone. *Histochemie*, **28**, 211, 1971.
- 2) Euler, C. von : On the significance of the high zinc content in the hippocampal formation. In *physiologie de Lhippcampe*. Edition du Centre National de la Recherche Scintifique, Paris, 1962, P. 135.
- 3) Fleischhauer, K. und Horstmann, E. : Intravitale Dithizonfärbung homologer Felder der Ammonsformation von Säugern. *Z. Zellforsch.*, **46**, 598, 1957.
- 4) Fleischhauer, K. und Ohnesorge, F.-K. : Zur Pharmakologie des Dithizon. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Exp. Path. Pharmak.*, **235**, 63, 1958.
- 5) Haug, F. M. S. : Electron microscopical localization of the zinc in hippocampal mossy fiber synapses by a modified sulfide silver procedure. *Histochemie*, **8**, 355, 1967.
- 6) Haug, F. M. S. : Heavy metals in the brain. A light microscope study of the rat with Timm's sulphide silver method. Methodological considerations and cytological and regional staining patterns. *Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology*, Springer Verlag, New York, P. 71. 1973,
- 7) Ibata, Y. and Otsuka, N. : Fine structure of synapses in hippocampus of the rabbit with special reference to dark presynaptic endings. *Z. Zellforsch.*, **91**, 547, 1968.

- 8) Ibata, Y. and Otsuka, N. : Electron microscopic demonstration of zinc in the hippocampal formation using Timm's sulfide-silver technique. *J. Histochem. Cytochem.*, **17**, 171, 1969.
- 9) Maske, H. : Über den topochemischen Nachweis von Zink in Ammonshorn verschiedener Säugetiere. *Naturwissenschaften*, **42**, 424, 1955.
- 10) McLardy, T. : Zinc enzymes and the hippocampal mossy fiber system. *Nature*, **194**, 300, 1962.
- 11) Ortmann, R. : Die Chemoarchitektonik des Gehirns, *Dtsch. Med. Wschr.*, **86**, 2063, 1961.
- 12) Otsuka, N. and Ibata, Y. : Über die quantitativen Veränderungen des Zinkgehaltes in der Hippocampusformation nach der Dithizon-Zufuhr. *Arch. Histol. Jap.*, **27**, 419, 1966.
- 13) Otsuka, N. and Ibata, Y. : Über die Veränderungen des Zinkgehaltes in der Hippocampus formation der Ratte nach Dithizon-, Alloxan- und Oxinzufuhr. *Histochemie*, **12**, 357, 1968.
- 14) Otsuka, N. and Kawamoto, M. : Histochemische und autoradiographische Untersuchungen der Hippocampusformation der Maus. *Histochemie*, **6**, 267, 1967.
- 15) Otsuka, N. and Umetani, M. : Chemocytoarchitectonics of ammon's formation. *Proc. Jap. Histochem. Ass.*, **3**, 231, 1962.
- 16) Otsuka, N., Okano, H. and Tamura, M. : Electron microscopic study of the hippocampal formation of the rat embryo. (in print)
- 17) Otsuka, N., Okano, H. and Yokoyama, K. : A study on the mossy fiber endings in the hippocampal formation by electron microscopic autoradiography. *Acta Histochem. Cytochem.*, **8**, 175, 1975.
- 18) Otsuka, N., Okano, H., Shobatake, H. and Ibata, Y. : Electron microscopic study of the mossy fiber ending in the hippocampal formation after dithizone administration. *Acta Histochem. Cytochem.*, **8**, 91, 1975.
- 19) Rose, M. : Der Allocortex bei Menschen und Tier. I. Teil., *J. Psychol. Neurol.*, **34**, 1, 1926.
- 20) Rose, M. : Die sog. Riechrinde beim Menschen und beim Affen. II. Teil des Allocortex. *J. Psychol. Neurol.*, **34**, 262, 1927.
- 21) Rose, M. : Cytoarchitektonischer Atlas der Gehirnrinde des Kaninchens. *J. Psychol. Neurol.*, **43**, 354, 1931.
- 22) Timm, F. : Zur Histochemie des Ammonshorngebietes. *Z. Zellforsch.*, **48**, 548, 1956.
- 23) Vogt, C und Vogt, O. : Sitz und Wesen der Krankheiten im Lichte der topistischen Hirnforschung und des Variierens der Tiere. *J. Psychol. Neurol.*, **47**, 237, 1957.

## 写 真 説 明

図 1 海馬領域の模式図

$h_1, h_2, h_3, h_4, h_5$ は海馬における分野を示す.

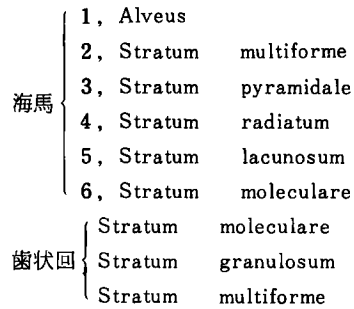


図 2 各種哺乳類の前頭断像, 硫化銀法,

- |          |       |
|----------|-------|
| a, マウス   | b, ネコ |
| b, ラット   | f, イヌ |
| c, モルモット | g, サル |
| d, ウサギ   |       |

図 3 ウサギの海馬の $h_3$ 野の前頭断像. 錐体細胞の樹状突起の表面に硫化銀法による陽性物質(亜鉛)が認められる.

図 4 ジチゾン(200mg/kg)の投与後における海馬領域の硫化銀法による像. ラット.

- a: ジチゾン投与後2時間目. 反応は陰性  
b: ジチゾン投与後4時間目: 正常像と同部位が陽性

図 5 ジチゾン投与後1.5時間目の投与量の変化による海馬領域の硫化銀法による変化像

- |                                          |                 |
|------------------------------------------|-----------------|
| a, ジチゾン投与量 5 mg/kg: 正常像と変わらない陽性反応が認められる. |                 |
| b, ジチゾン投与量 25mg/kg                       | } いずれもすべての部位が陰性 |
| c, ジチゾン投与量 100mg/kg                      |                 |
| d, ジチゾン投与量 200mg/kg                      |                 |

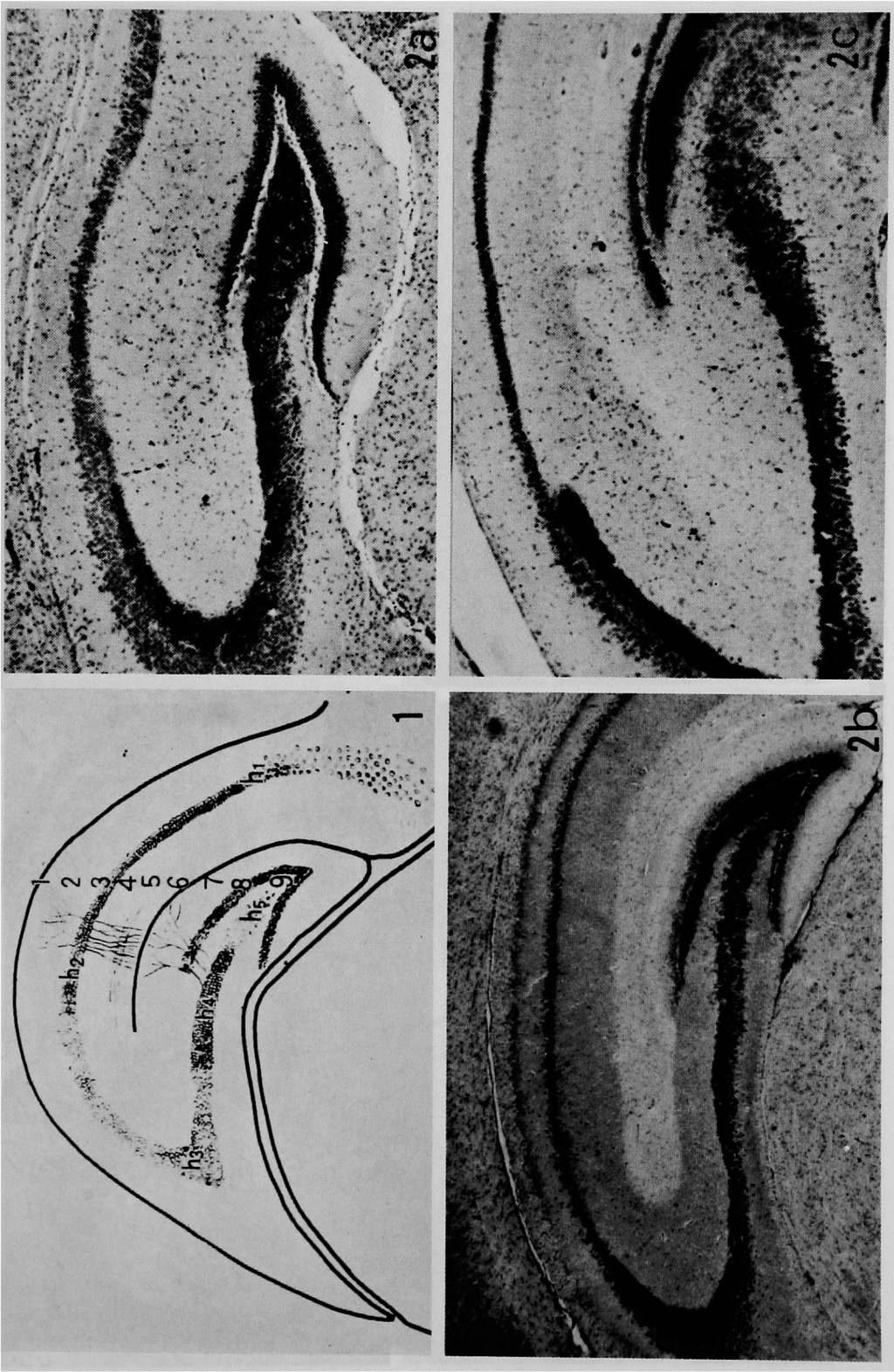
図 6 ラットの海馬領域における各発生時期の硫化銀法による像

- a, 生後8日目  
b, 生後12日目  
c, 生後14日目

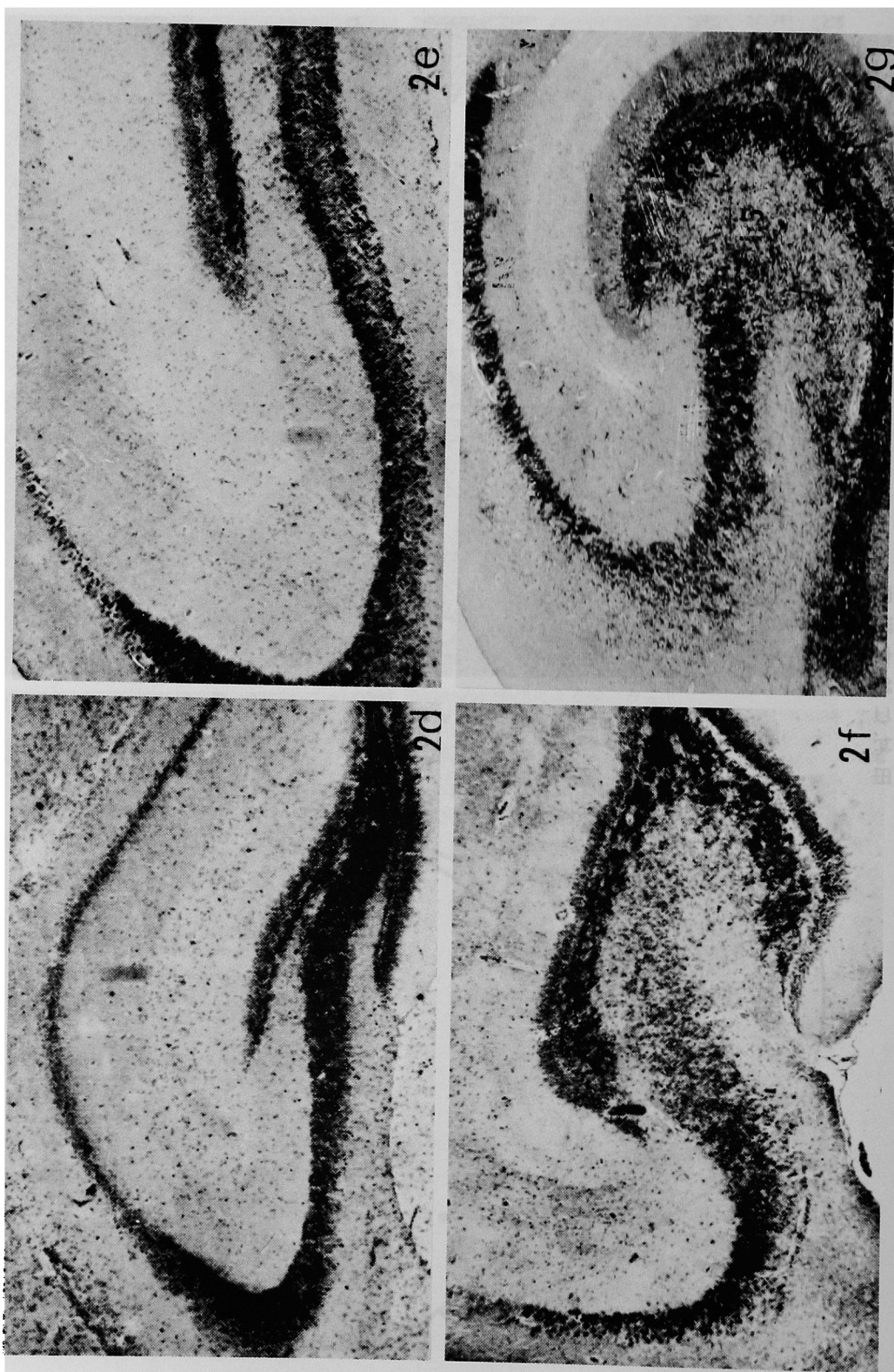
図 7 ラットの海馬領域における硫化銀法による陽性物質(亜鉛)の日内リズムを示す像

- a, 3時  
b, 15時

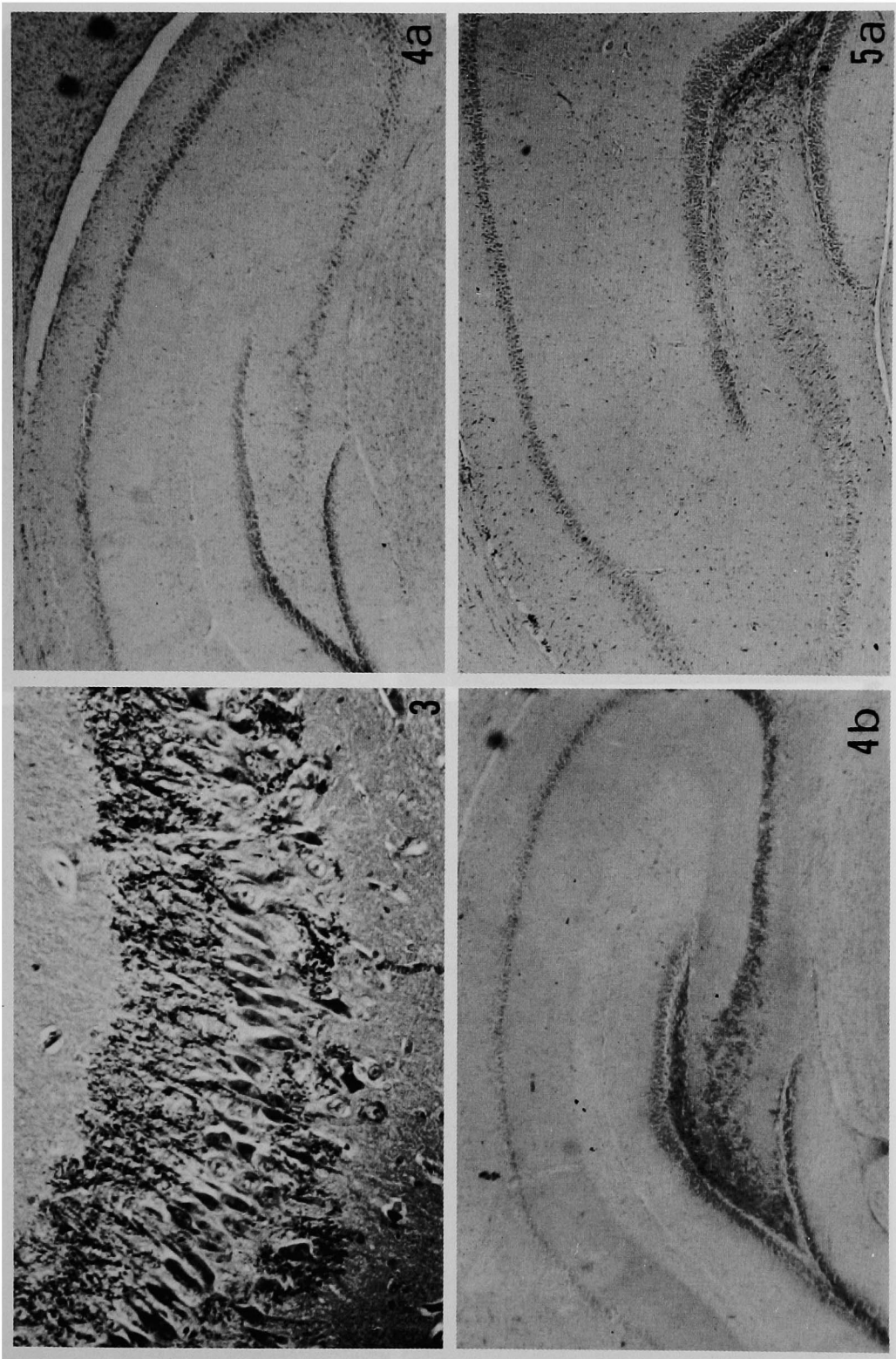
田村仁論文附図



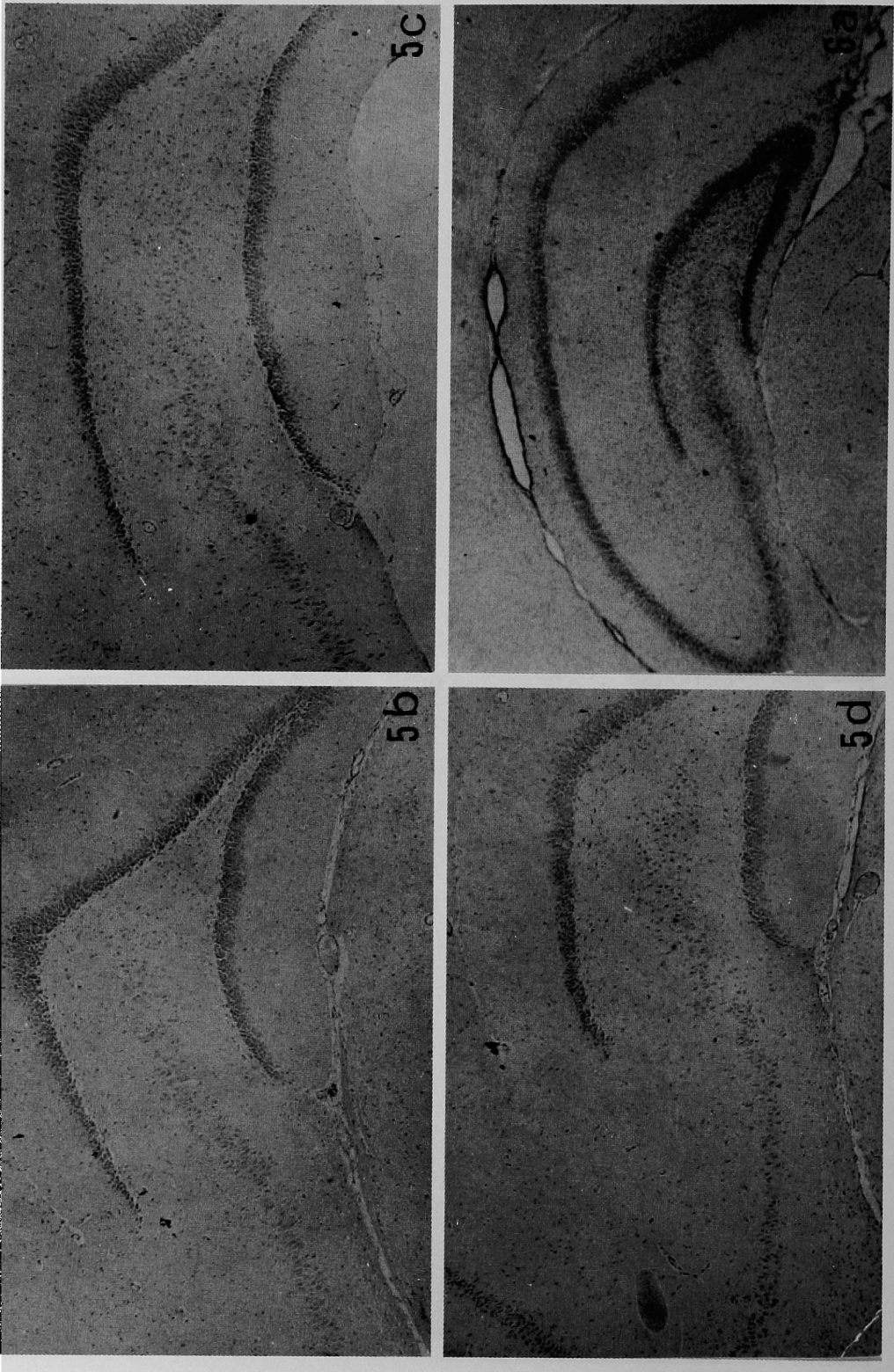
田村仁論文附図



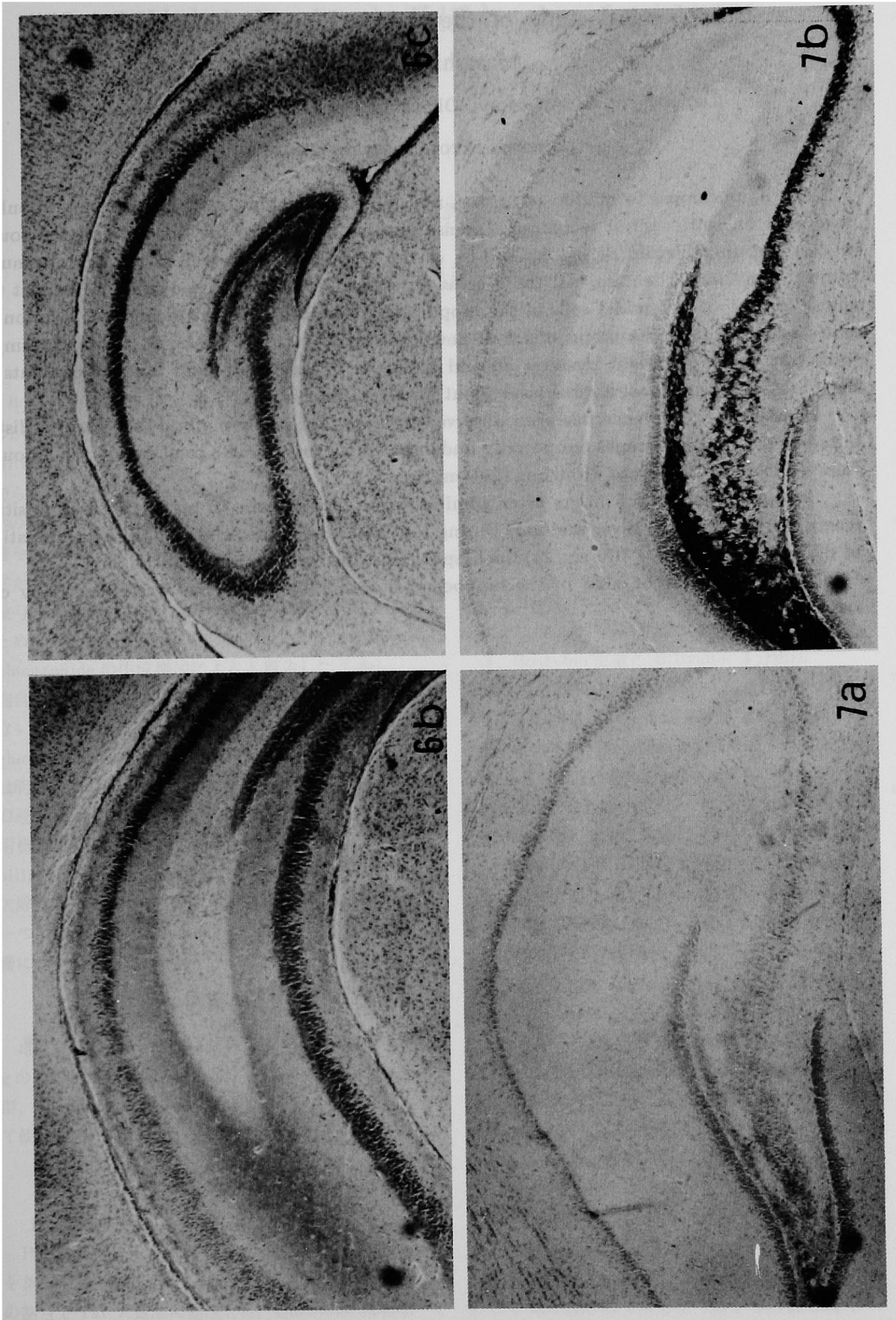
田村仁論文附图



田村仁論文附図



田村仁論文附図



## Histochemical study of the zinc in hippocampal formation

Masashi TAMURA

Department of Anatomy, Okayama University Medical School

(Director : Prof. Nagayasu Otsuka)

The hippocampal formation of mouse, rat, guinea pig, rabbit, cat, dog, goat and monkey were seen by sulfide silver technique. Intense positive reaction to the this method was found in the stratum radiatum of  $h_3$ ,  $h_4$  and  $h_5$  of the hippocampus, as well as the stratum multi-forme of the fastia dentata. All these areas corespond to the endings of mossy fibers at the apical dendrit of pyramidal cells in the hippocampal formation. No histochemical reaction of zinc was observed in the brains of rat of newborns up to 10 day after birth. The hippocampal formation showed a slight reaction on and after the 11 day of life and the zinc contents of these areas reacted almost normal level about 2 weeks after birth.

Histochemical evidence has been observed by the sulfide silver method that the zinc distributed in the region becomes temporarily undemonstrable for a certain brief period (1–3 hours) following administration of dithizone (200 mg/kg).

Sections taken at 1.5 hours after administration of dithizone (5 mg/kg) showed positive reaction by the sulfide silver method. During the first three hours following the administration of dithizon (10 mg/kg — 300 mg/kg) the hippocampal formation remains unstained.

The distribution of zinc in the hippocampal formation of the rat was changed by circadian rhythm.