

海馬の錐体細胞に関する発生学的・電子顕微鏡的研究

岡山大学医学部第一解剖学教室（主任：大塚長康教授）

藤 本 俊 治

（昭和62年5月7日受稿）

Key words：海馬，錐体細胞
発生学

緒 言

海馬領域（海馬と歯状回）は形態学的に特異な細胞構築を示すと同時に，大脳辺縁系の中樞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。

ジチゾン¹の生体内投与により海馬領域の特定部位が，そこにある亜鉛のために紅色に反応することが，Maske²により報告されて以来，この方面の研究が盛んに行われてきた。その結果，これらの亜鉛は海馬領域に存在する苔状線維終末に一致してみられることがわかった^{1, 5, 8-12, 14}。

一方成熟ラットの海馬の錐体細胞を電子顕微鏡で観察した研究は多数報告されている^{4, 6, 7}。しかし，各分野の錐体細胞を発生学的な立場から電子顕微鏡で観察した研究はまだない。

そこでわれわれはラット生後一日目より成熟に至るまでのC₁野における錐体細胞を検索し，各細胞がどのような微細構造の変化をみせながら成熟していくかを観察した。

材 料 と 方 法

材料としてはラットを用いた。すなわち生後1日目，3日目，5日目，7日目，9日目，12日目，14日目のラットを使用した。

電子顕微鏡で観察するために次の方法が行われた。

無麻酔で開頭後，脳を頭蓋骨から取り出し，海馬領域が含まれている脳の一部分を取り出し実体顕微鏡下で海馬のC₁野と思われる部位を

摘出し3%グルタルアルデヒド燐酸緩衝液（pH7.4）で数時間固定した。ついで1%四酸化オスミウム燐酸緩衝液で40～50分間固定した。その後pH7.4燐酸緩衝液で3回洗い，脱水後にエポン包埋し，厚さ2μに薄切しトルイジンブルー染色を行い目的の部位を定めて超薄切片とした。ウラニールと鉛の二重染色後，電子顕微鏡（JEM 100 CX）で観察した。

結 果

ここでまず結果を記載する前に海馬の分野について概説したい。

海馬はここを構成する錐体細胞の種類，配列，あるいは，神経線維の走行などからいくつかの分野に分けられている。Rose（1926～1931）は海馬後支脚の方からh₁～h₅野に分け，Lorent de No（1934）はC₁～C₄野に分けている。この両者の分けかたを比較するとh₁野は海馬後支脚とC₁野に，h₂野はC₂野に，h₃野とh₄野はC₃野に，h₅野はC₄野に相当する。すなわち，C₁野とC₂野ではそこにみられる錐体細胞はC₃野とC₄野にみられる錐体細胞より小型の細胞が比較的密に配列している。さらに，C₃野では比較的大型の錐体細胞がやや疎に列をなし，その細胞の数も多い。C₄野ではC₁野～C₃野にみられるような錐体細胞の規則正しい配列はなく大型の細胞が歯状回の門のところに散在性に分布している。しかし，このような分野にも動物差がある。

また，海馬のC₁野～C₃野では比較的規則

正しい層的配列も認められた。すなわち、脳室に面する側から、①脳室上衣層、②海馬白板(alveus)、③上昇行層(stratum oriens)、④錐体細胞層(stratum pyramidal)、⑤放線(射)状層(stratum radiatum)、⑥網状層(stratum reticulare & lacunosum)、⑦分子層(stratum moleculare)に分けられる。

脳室上衣層は脳室に面する層で、上衣細胞が一層並んでいる。海馬白板は主に錐体細胞の軸索からなる。上昇層は錐体細胞の基底樹状突起とその軸索のほか海馬への求心性線維が錯綜している。錐体細胞層は上記のように錐体細胞が密集して列を作って並んでいる。この細胞から出る基底樹状突起は上昇層に入る。先端樹状突起は、放線状層、網状層や分子層に分布している。放線状層は錐体細胞の先端樹状突起のほかに神経線維が多く含まれている。分子層は少数の神経細胞やグリア細胞、錐体細胞の先端樹状突起の一部分やその他の層から進入した神経線維からなっている。

1) 成熟ラット例

C_{As}野における錐体細胞は海馬の錐体細胞層にその細胞体が認められた。錐体細胞は海馬領域のなかでは大型で一個の核を認めた。核には明瞭な核膜、核小体、核質がみられた。その細胞質内には粗面小胞体は細胞質全体によく発達していた。また、ゴルジ装置も細胞質内のあちらこちらにみられた。ゴルジ装置にもゴルジ空胞、ゴルジ層板やゴルジ小胞がよく認められた。ミトコンドリアも細胞質内にかなり多く存在していた。リボゾームもかなり認められた。シナプス小胞と少数のミトコンドリアをもった axosomatic なシナプスが細胞体の表面のところどころにみられた。また、C_{As}野を構成する錐体細胞は前述のように、放線状層には錐体細胞の先端樹状突起が認められるが、この樹状突起には歯状回の顆粒細胞の神経突起である苔状線維の終末がみられた。

苔状線維終末は極めて大型の終末で3~5μの直径で大部分のものは先端樹状突起から出ている棘をとりまくようにおわっていた。したがって、この終末を横断すると終末内に棘の断面が島のようにみられる場合が多かった。

また、終末内には極めて多数のシナプス小胞が存在していた。そのシナプス小胞の大部分は直径50nmの明るい小胞であったが、その他に直径100nmの芯をもった小胞もみられた。数は少ないがミトコンドリアも存在していた。シナプス膜は前膜より後膜の方があつかった。一方、C_{As}野の錐体細胞の基底樹状突起は主として上昇層の方へのびていた。その錐体細胞の樹状突起の表面にはところどころに小型のシナプスが認められた。

2) 発生学的実験例

生後1日目から3日目までのC_{As}野の錐体細胞においては細胞も小型であった。核は比較的大きく、細胞質の発達が弱かった。即ち、核においては核膜、核小体、核質などがかなりよく観察できた。細胞質内には、少しのミトコンドリアが分布していた。ゴルジ装置は発達の弱いものがところどころに認められた。粗面小胞体はまだほとんど出現してこなかった。その他の細胞内小器官もすべてあまりよく観察出来なかった。錐体細胞層に近い放線状層においてはここにある錐体細胞の先端樹状突起とおもわれる像は認められなかった。

生後5日目のラットではC_{As}野の錐体細胞の核には、核孔をもった核膜、核小体、核質がよくみられた。細胞質内には少数のミトコンドリアが認められた。生後3日目のものと比較するとrERは少し発達していた。ゴルジ装置はまだあまり発達していなかった。その数は増加していた。そのほかの細胞内小器官はいずれも発達が弱かった。生後3日目のラットと同様に先端樹状突起を確認することは出来なかった。

生後7日目のラットでは核孔をもった核膜が核をとりかこんでいた。そして、その核内には核小体、核質などが認められた。細胞質内においては、少数のミトコンドリアが散在性に分布していた。ゴルジ装置はその発達の程度は生後5日目のものとあまりかわらなかった。その分布状態もほとんど同じであった。rERは生後5日目までのラットとちがいで生後7日目には明確にわかるような典型的な形態をしていた。しかし、その分布状態は疎であった。その他の細胞内小器官はまだあまり発達していなかった。放

線状層には、ミトコンドリア、rER、リボゾームが認められる錐体細胞の先端樹状突起と考えられるものが数は少ないが観察出来た。さらに、その細胞膜表面にはところどころにシナプスが存在することがわかった。しかし、樹状突起にみられる棘はまだみることが出来なかった。

生後9日目のラットのC_{As}野の錐体細胞において、その核は大きく、核孔をもった核膜につつまれていた。核の内部には、核小体、核質などが認められた。細胞質には少数のミトコンドリアが散在性に分布していた。ゴルジ装置はあまり発達がよくないものが少数認められた。生後9日目のもので、もっとも変化のある所見としてはrERがよく発達してきたことであった。すなわち、rERが核の両極の細胞質のところはかなりよく発達していた。しかし、その他の細胞内小器官はいずれもあまり発達していなかった。また、放線状層においてはこの時期になると先端樹状突起の断面が認められた。この樹状突起内にはrER、ミトコンドリア、ライボゾームが含まれていた。またこの突起の表面にはところどころに大型の神経終末がシナプスを形成している像が認められた。しかし、棘の構造はみられなかった。

生後12日目のC_{As}野の錐体細胞は、その核の構造は成熟ラットのものとかかわらない状態を呈していた。細胞質においてはあまり多くないミトコンドリアが細胞質全体に広がって分布していた。ゴルジ装置は9日目のものより少しよく発達していた。その数も9日目のものよりも多かった。rERは9日目のもののように核の両極に密集しておらず細胞質内のあちこちに分布していた。その他の細胞内小器官はあまり発達していなかった。放線状層では錐体細胞の先端樹状突起が観察され、その中にはミトコンドリア、rER、ライボゾームがみられた。さらに、この表面には大型の神経終末が2～3個終っていた。この終末の中には多数のシナプス小胞がみられた。しかし、この樹状突起にはまだ棘を観察することが出来なかった。

生後14日目のラットのC_{As}野の錐体細胞では核は成熟ラットのものとはほとんど変らない形態をみせていた。すなわち、明瞭な核膜におおわ

れておりこの核膜には多くの核孔がみられた。また、核小体もよく観察できた。核質も多く認められた。そしてミトコンドリアは成熟ラットのものと同様に細胞体に分布していた。ゴルジ装置は、よく発達したものが細胞質内のあちこちに認められた。その分布状態は成熟ラットのものとはほとんど変らなかった。rERもよく発達したものが一ヶ所には集中せず、細胞質内に散在性に分布していた。その他の細胞内小器官はあまり発達していなかった。放線状層には、太く、大きな錐体細胞の先端樹状突起がみられた。その樹状突起は棘が発達しており、成熟ラットの苔状線維終末と同様な所見を呈していた。すなわち、樹状突起棘をとりかこみ大きなふくらみとなって終末していた。そうして、一つの棘に1～2個の苔状線維終末がこれをとりかこんでおわっていた。この大きな苔状線維終末の中には多数の密集したシナプス小胞が含まれていた。また、少量であるがこのシナプス内には電子密度の高い小顆粒を含んだ小胞(70～150nm)が認められた。その他比較的多数のミトコンドリアが終末部には認められた。

考 察

Flaischhouer²⁾はラット、ネコや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強く発現することを認めている。しかし、この研究はいずれも個体発生中の一時期のみの報告にすぎない。発生各時期の錐体細胞を観察した研究はない。わずかに田村¹³⁾、藤井³⁾の研究は硫化銀法(Timm法)でその発生学的な検索をおこなっている。特に藤井の研究は苔状線維終末を中心にくわしく観察されている。この研究によれば生後14日目のラットでは苔状線維終末が弱陽性反応を呈していた。20日目ではじめて苔状線維終末が強陽性反応を呈してきた。ラットの成長過程で苔状線維終末が成熟期のような構造に完成する時期と苔状線維終末内の亜鉛が出現してくる時期が生後20日目ごろに一致することを明らかにした。また、電子顕微鏡用に改良された硫化銀法で観察すると、すでに生後3～8日目のラットで硫化銀法陽性を示す銀粒子の

沈着を認めているが、成熟ラットとまったく同様な陽性反応を呈するのは生後14~20日目であると報告されている。

我々の研究からは生後1~3日目にかけてはかろうじて、 C_{A3} 野が認められるだけでその層状構造もまだわからなかった。錐体細胞もまだ未発達であった。生後5日目になると錐体細胞もrERが発達してきて、成熟ラットに近づいた構造を呈した。しかし、まだこの時期にはシナプスをともなった苔状線維終末はみられなかった。生後7日目になると錐体細胞はrERの分布が多くなった。小さなシナプスも認められた。しかし、棘はまだ認められなかった。生後9日目になるとrERもゴルジ装置もよく発達してきた。また、錐体細胞の先端樹状突起はその数を増し、その表面にも大型の終末がおわる像が認められてきた。生後12日目になると錐体細胞は完全に成熟期の錐体細胞とほとんどかわらない形態を呈していた。また、先端樹状突起はさらにその数を増し、そこにみられる苔状線維終末も大型になってきた。しかし、まだ棘は認められなかった。生後14日目になると錐体細胞はまったく成熟ラットのものと同じ形態を呈していた。棘が認められ、成熟ラットとかわらない像を呈していた。

藤井³⁾とわれわれの所見を比較すると錐体細胞も、苔状線維終末もどちらも成熟ラットと同様な構造をみせはじめるのは生後14~20日目の間であることがわかった。

また、われわれが海馬の C_{A3} 野の錐体細胞を中心に検索してきたかという理由をのべたいとおもう、この分野の錐体細胞が他の分野の錐体細胞より大型でありこの錐体細胞の先端樹状突起には極めて大型のシナプスを形成する苔状線維終末が認められることである。さらに、この苔状線維終末内にZnが存在して、このZnがシナプスにおいて伝達物質ようのはたらきをもっているのではないかと考えられていることから、この大型のシナプスにいかなる変化を呈しながら発生していくのかを知りたかったので C_{A3}

野を研究した。

また、この C_{A3} 野の錐体細胞はカイニン酸のような薬剤で海馬領域のなかでもことにおかれやすい部位であるといわれているので、発生の段階でなにかがった構造上の変化がみられるかと思いこの研究をおこなった。

結 語

海馬の C_{A3} 野の錐体細胞を発生学的、電子顕微鏡的に研究してつぎのような結果を得た。

ラットは生後1, 3, 5, 7, 9, 12, 14, 日目のものをもちいた。

生後1~3日目のラットでは錐体細胞質内にミトコンドリアと発達の弱いゴルジ装置がわずかに認められた。

生後5日目のラットでは錐体細胞の細胞質内に少数のミトコンドリア、やや発達したゴルジ装置と少数のrERがみられた。

生後7日目になるとここではミトコンドリア、ゴルジ装置やrERなどが生後5日目のものより少し発達していた。この時期から錐体細胞の先端樹状突起らしきものが観察出来た。

生後9日目になるとミトコンドリアとゴルジ装置はあまり発達してなかったが、rERは核の両極の細胞質内にかなり認められた。この時期になると錐体細胞の先端樹状突起が認められ、その表面にはシナプスがみられた。

生後12日目のラットになるとミトコンドリアが細胞内全体に分布するようになってきた。ゴルジ装置も発達していた、また、錐体細胞の先端樹状突起の数が増加していた。その細胞膜の表面には大型の2~3のシナプスが認められた。

生後14日目になるとミトコンドリアの分布状態、ゴルジ装置の発達の程度、rER、の分布状態などが成熟ラットのものとかわらなくなってきた。

以上の所見により C_{A3} 野の錐体細胞が成熟ラットとかわらない形態を呈してくるのは生後14日目であった。

文 献

1. Euler C von: On the significance of the high zinc content in the hippocampal formation. In *physiologie de l'hippocampe*. Edition du Center National de la Recherche Scintifique, Paris (1962).
2. Fleischhauer K und Horstmann E: Intravitale Dithizonfärbung homologer Felder der Ammonsformation von Säugern. *Z Zellforsch* (1957) 46, 598-609. 写真 2.
3. 藤井龍平: 海馬領域の発生学的・組織化学的・電子顕微鏡的研究. *岡山医誌* (1984) 96, 537-549.
4. Haug FMS: Electron microscopical localization of the zinc in hippocampal mossy fiber synapses by a modified sulfide silver procedure. *Histochemie* (1967) 8, 355-368.
5. Haug FMS: 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. In *Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology*. Springer Verlage, New York (1973) pp 71.
6. Ibata Y and Otsuka N: Fine structure of synapses in hippocampus of the rabbit with special reference to dark presynaptic endings. *Z Zellforsch* (1968) 91, 547-553.
7. Ibata Y and Otsuka N: Electron microscopic demonstration of zinc in the hippocampal formation using Timm's sulfide-silver technique. *J Histochem Cytochem* (1969) 17, 171-175.
8. Maske H: Über den topochemischen Nachweis von Zink in Ammonshorn verschiedener Säugetiere. *Naturwissenschaften* (1955) 42, 424.
9. McLardy T: Zinc enzymes and the hippocampal mossy fiber system. *Nature* (1962) 194, 300-302.
10. Otsuka N und Kawamoto M: Histochemische und autoradiographische Untersuchungen der Hippocampusformation der Maus. *Histochemie* 6, 267-273.
11. Otsuka N und Umetani M: Chemocytoarchitectonics of ammon's formation. *Proc Jpn Histochem Assoc* (1962) 3, 231-234.
12. 高橋親彦: 大脳辺縁系垂鉛に関する実験的研究. 11. 各種条件下にみられる海馬型垂鉛の消長について. *岐阜医紀* (1968) 15, 161-176.
13. 田村 仁: 海馬領域における垂鉛の組織化学的研究. *岡山医誌* (1977) 89, 551-564.
14. Timm F: Zur Histochemie des Ammonshorngebietes. *Z Zellforsch* (1956) 48, 548-555.

写 真 説 明

- 写真1. 生後3日目の C_{A3} 野の錐体細胞. わずかにみられるミトコンドリア, ゴルジ装置. $\times 5000$
- 写真2. 生後3日目の C_{A3} 野の錐体細胞近傍部. 錐体細胞の先端樹状突起はまだ出現していなかった. $\times 20000$
- 写真3. 生後5日目の C_{A3} 野の錐体細胞. 少数のミトコンドリア, やや発達したゴルジ装置, 少数の rER が認められた. $\times 4500$
- 写真4. 生後5日目の C_{A3} 野の錐体細胞近傍部. 先端樹状突起はまだみられなかった. $\times 12000$
- 写真5. 生後7日目の C_{A3} 野の錐体細胞. ミトコンドリア, ゴルジ装置, rER が少し発達していた. $\times 6000$
- 写真6. 生後7日目の C_{A3} 野の錐体細胞近傍部. 先端樹状突起らしきものが観察出来た. $\times 18000$
- 写真7. 生後9日目の C_{A3} 野の錐体細胞. rER がかなりみられた. $\times 9000$
- 写真8. 生後9日目の C_{A3} 野の錐体細胞近傍部. 先端樹状突起がみられ, その表面にシナプスが認められた. $\times 15000$
- 写真9. 生後12日目の C_{A3} 野の錐体細胞. ミトコンドリアが細胞質全体に分布していた. ゴルジ装置も発達していた. $\times 15000$
- 写真10. 生後12日目の C_{A3} 野の錐体細胞近傍部. 先端樹状突起の数が増加し, その表面には大型の2-3のシナプスが観察出来た. $\times 17000$
- 写真11. 生後14日目の C_{A3} 野の錐体細胞. 成熟ラットのものとかわらない像を呈していた. $\times 12000$
- 写真12. 生後14日目の C_{A3} 野の錐体細胞近傍部. 先端樹状突起の表面に成熟ラットと同様な苔状線維終末がみられた. $\times 13000$

藤本俊治論文附図

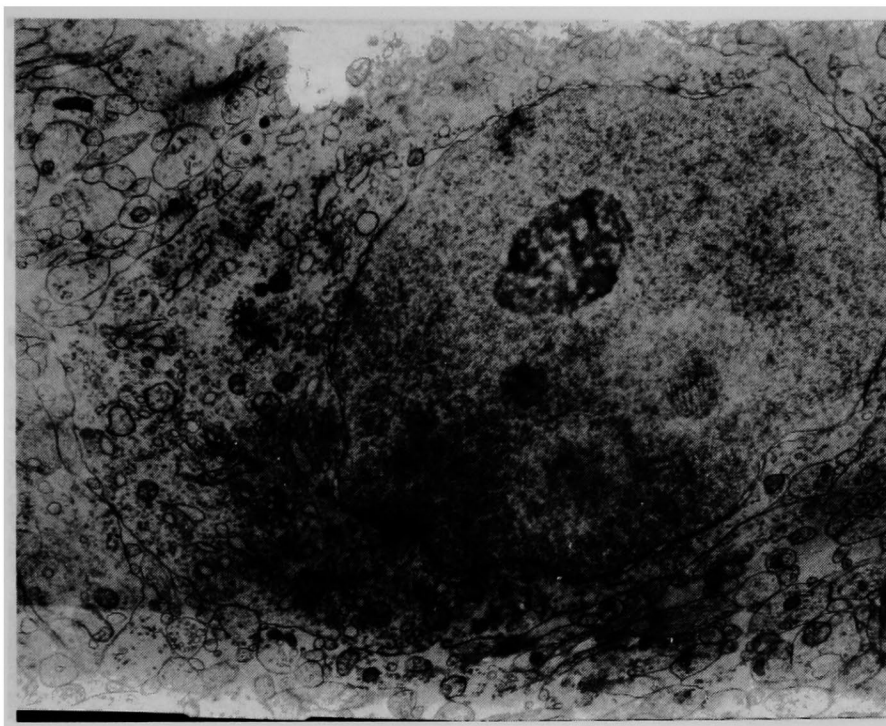


写真 1

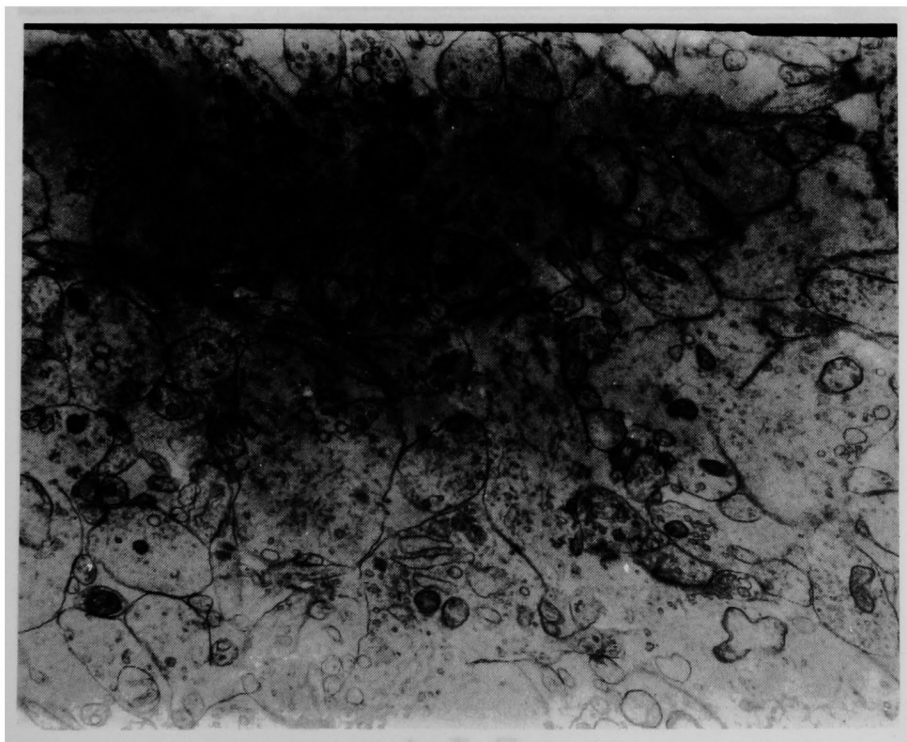
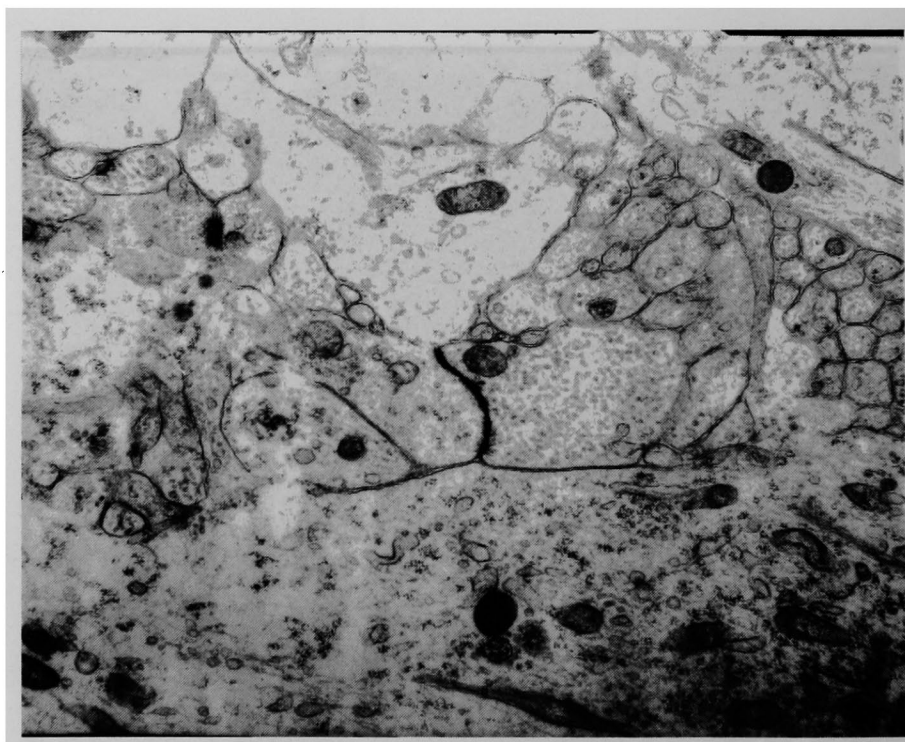


写真 2

藤 本 俊 治 論 文 附 図



写 真 3



写 真 4

藤本俊治論文附図

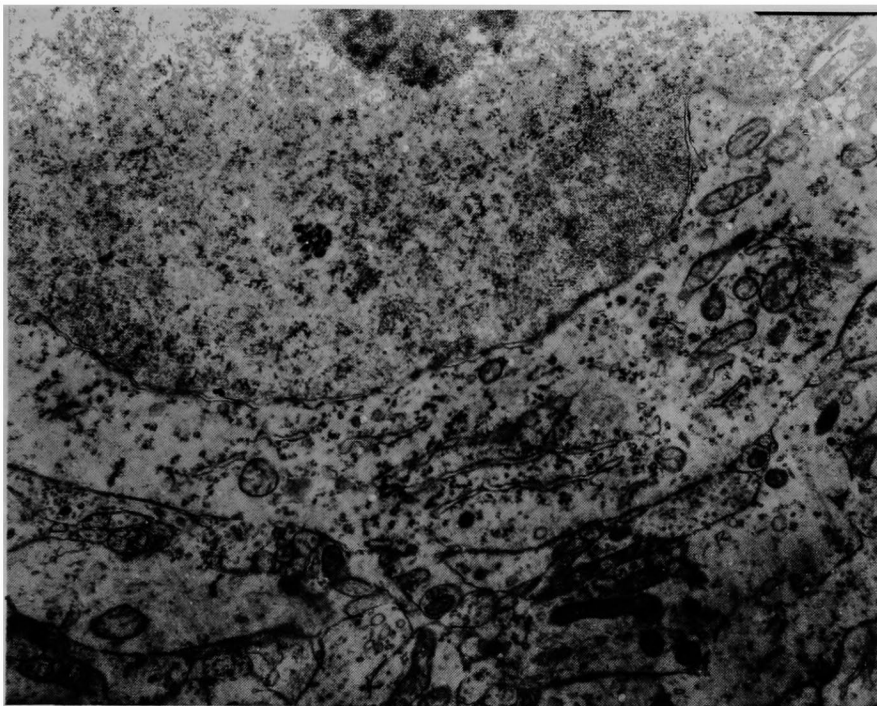


写真 5

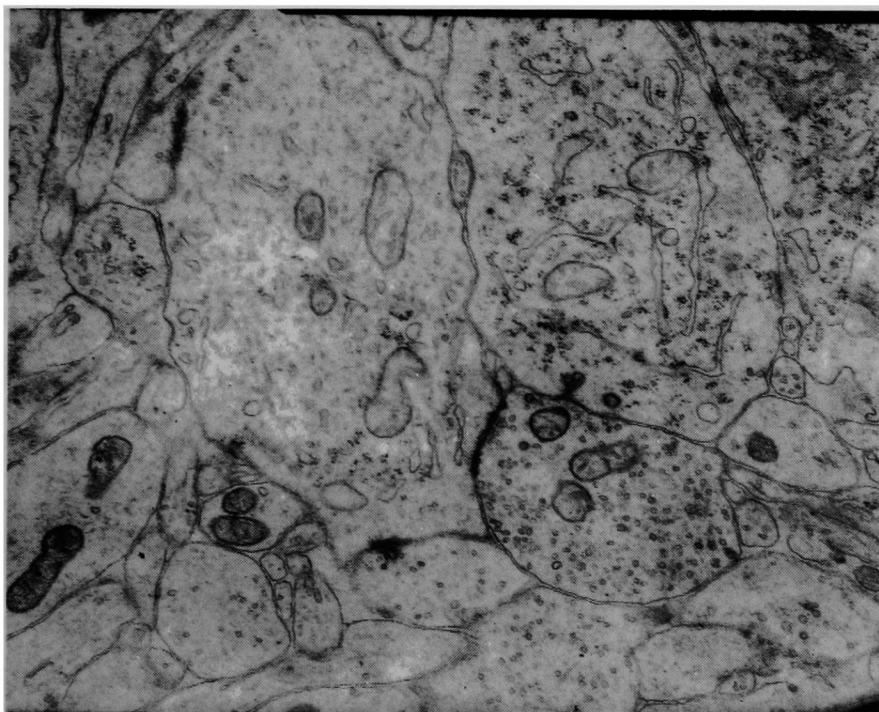


写真 6

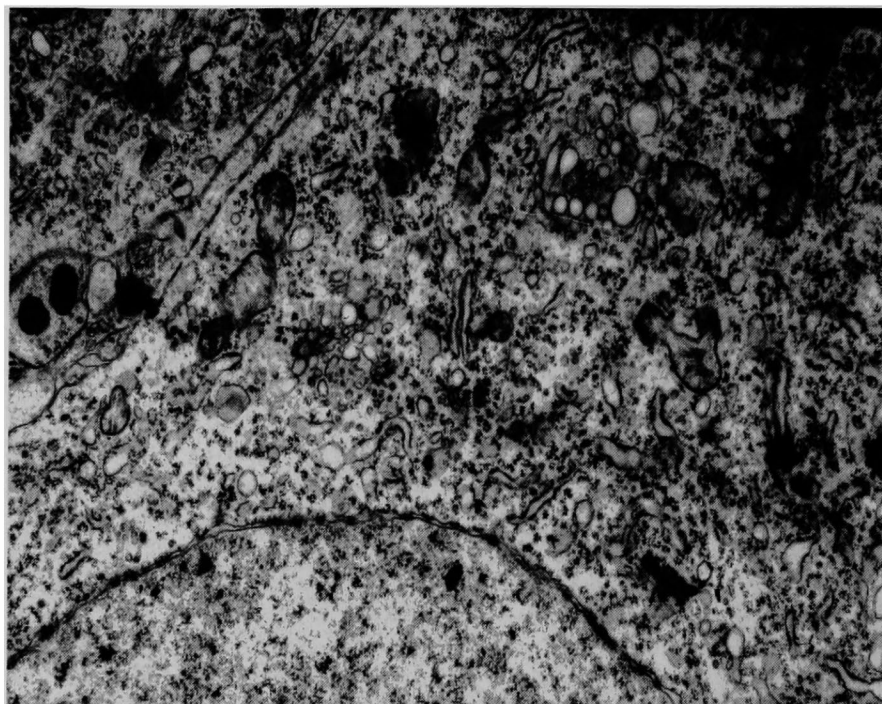


写真 7

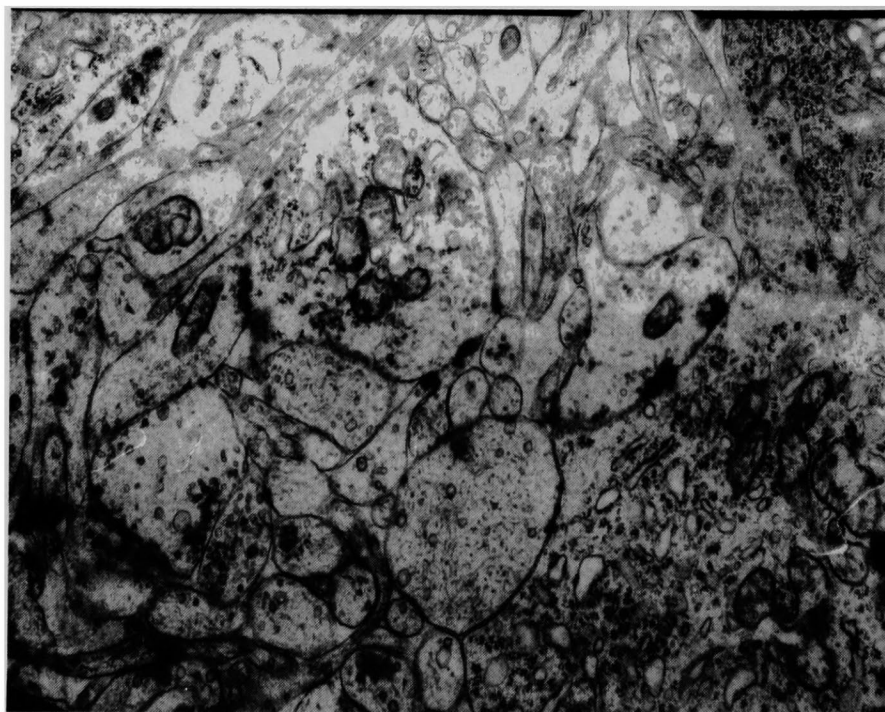


写真 8

藤本俊治文論附図

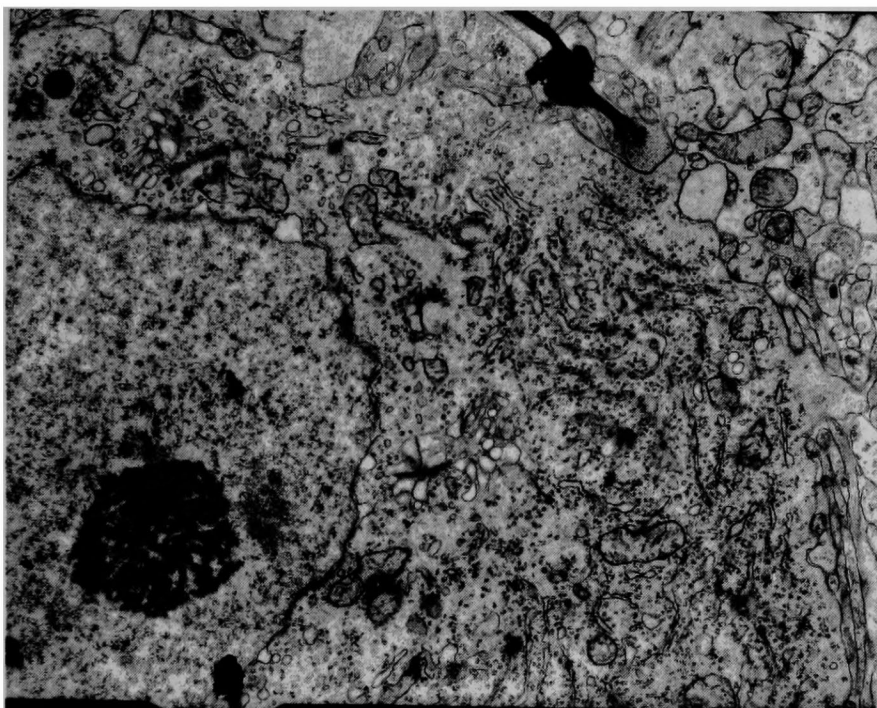


写真 9

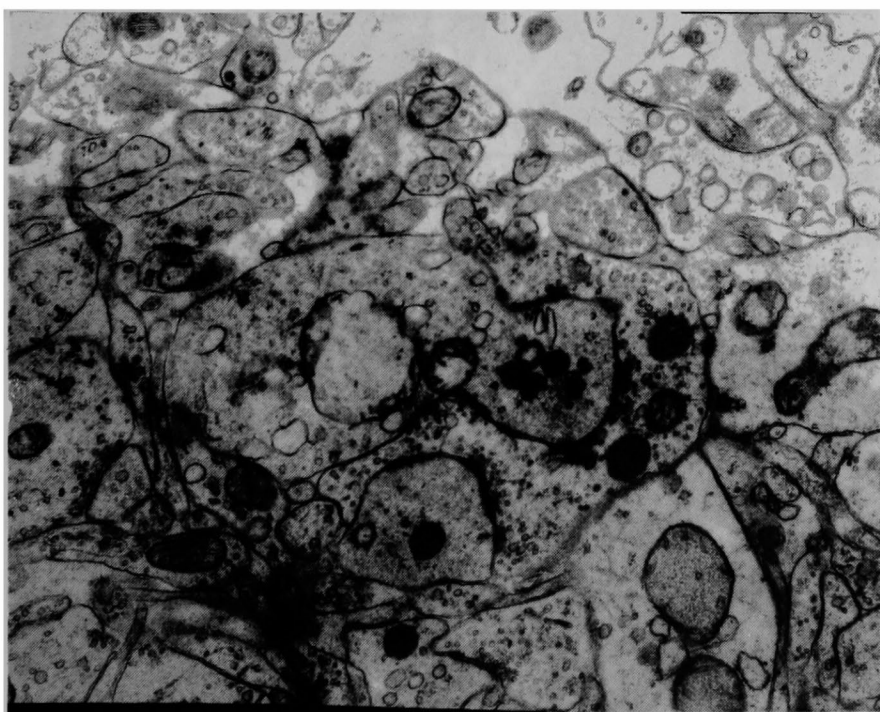


写真 10

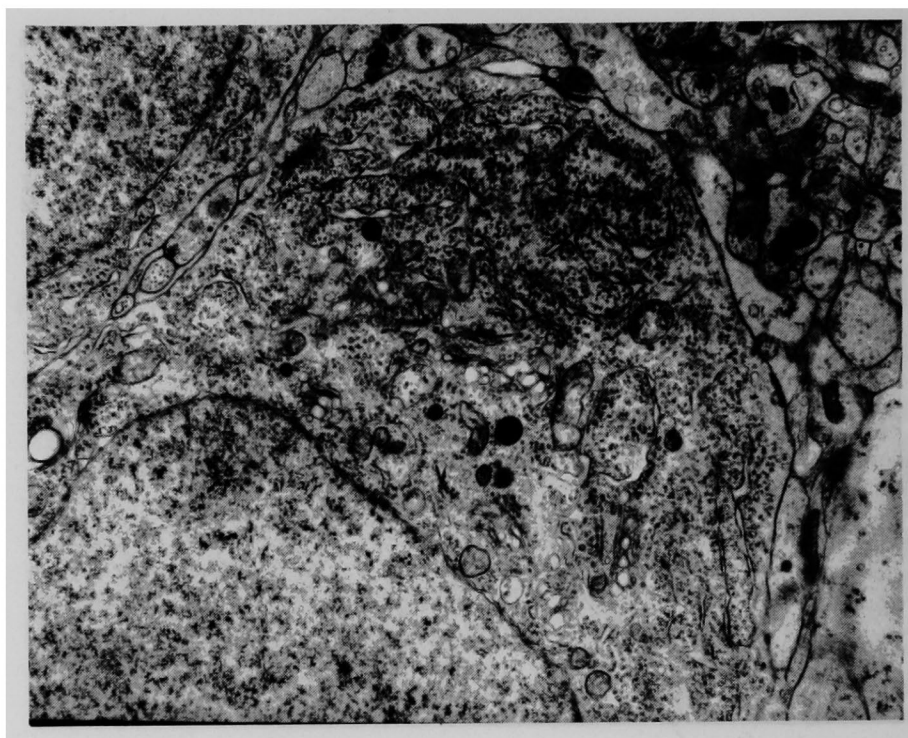


写真 11

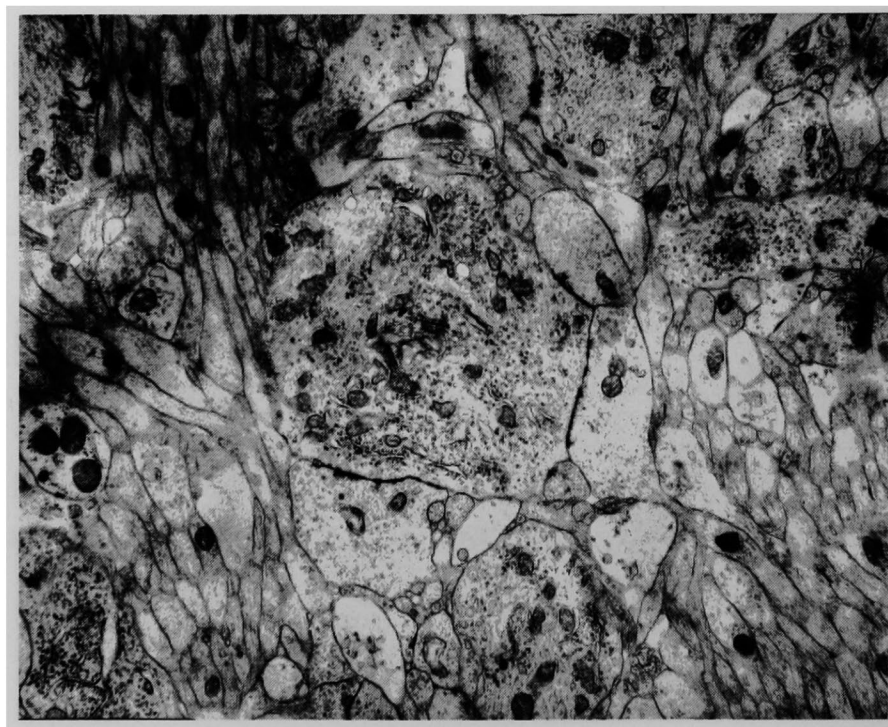


写真 12

**Embryological and electron microscopic studies of pyramidal cells
in the hippocampus of rats**

Shunji FUGIMOTO

Department of Anatomy, Okayama University Medical School

(Director : prof. N. Otsuka)

Embryological and electron microscopic studies were conducted on pyramidal cells in the CA₁ area of the hippocampus of rats. In rats 1-3 days after birth, a few mitochondria and poorly developed Golgi apparatus were noted in the cytoplasm of pyramidal cells. In rats 5 days after birth, a few mitochondria, moderately developed Golgi apparatus and a small amount of rER were noted in the cytoplasm of pyramidal cells. At 7 days after birth, mitochondria, Golgi apparatus and rER were slightly better developed than those 5 days after birth. From this stage on, it became possible to observe a structure similar to the apical dendritic process of pyramidal cells. On the ninth day after birth, mitochondria and Golgi apparatus were not very well-developed, but rER was considerably well-developed within the cytoplasm near the two poles of the nucleus. At this stage, apical dendritic processes, with synapses on the surface was noted. On the 12th day after birth, mitochondria were distributed throughout the cells. Golgi apparatus were also well-developed. The number of apical dendritic processes had increased, and 2-3 large synapses were noted on the surface of these cell membranes. On the 14th day after birth, the distribution of mitochondria, degree of development of Golgi apparatus and distribution of rER became similar to those in pyramidal cells of mature rats.