

脳における重金属の組織化学的研究

岡山大学医学部第一解剖学教室(指導:大塚長康教授)

桜田 寛海

(昭和52年9月8日受稿)

緒言

組織化学的方法で脳組織の中に重金属が存在することがはじめて Spatz (1922) によって報告された。すなわち、この研究では脳の各部位の中で錐体外路系に属する線状体、黒質、赤核などが鉄反応で陽性を呈することが明らかにされた。しかしその後、脳における重金属に関する研究は進歩がなかった。

近年になって Maske (1955) がジチゾンによる生体染色により脳の中の海馬領域の一定領域が赤染されることが報告され、これが、組織内に存在する亜鉛との反応により起されるものであろうと推察した。この研究により再び脳に存在する重金属が注目をあびるにいたった。次いで Fleischhauer ほか (1957) はジチゾン生体染色法により、Timm (1958), McLardy (1960, 1962, 1963, 1964), Otsuka ほか (1962) らは硫化銀法により、海馬領域の一定部位にその陽性反応を呈する領域を観察した。さらに電子顕微鏡用に改良された硫化銀法を用いて、この反応陽性物質は齒状回の顆粒細胞の神経突起により構成された苔状神経線維終末部内に存在することが明らかにされた (Haug, 1967, Iyata & Otsuka 1968, 1969)。さらにこの方面の研究は進められ、上記の反応により陽性を呈する物質は光学顕微鏡のオートラジオグラフ (von Euler 1962, Otsuka ほか 1967) により、また電子顕微鏡のオートラジオグラフ (Otsuka ほか 1975) により亜鉛であることが確認された。その結果、この亜鉛はシナプスにおける神経伝達に関係する物質であろうと推察されている。

上記のように脳の中で海馬領域に存在する亜鉛に関する研究はかなり詳細に検索されているが、脳他の部位における重金属の分布状態やその作用機序

などに関してはほとんど研究が進められていない。

そこで本研究においてラットの脳を硫化銀法で検索し、脳内における重金属の分布状態を組織化学的に証明するためにこの研究を行なった。

材料と方法

I. 光学顕微鏡的組織化学

光学顕微鏡的組織化学による検索のためにラット10例の脳を用いた。これらの実験に用いたラットはエーテル麻酔ののち、ただちに開頭し、脳を取り出し、その5例の脳はそのまま、視神経交叉を通る面と、中脳の後端部を通る面とで横断を行ない、脳を3つのブロックに分けた。その後、下記の硫化銀法により標本を作製し、検索した。また、5例の脳は、脳を取り出した後、脳全体をそのまま、正中矢状断を加えて左半脳と右半脳に分けた。その後、両半脳を別々に上記のような横断を行なった。右半脳から得た3つのブロックは Carnoy 固定液に固定後、連続パラフィン切片を作製し、Nissl 染色とヘマトキシリン・エオジン染色を行なった。また、左半脳から得た3つのブロックは硫化銀法にて標本を作製した。

硫化銀法 (Timm 1958)

- 1) 脳を硫化水素飽和アルコール溶液に12時間固定。
- 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で包埋し、嗅脳の前端から延髄の後端までを10 μ の厚さで連続切片を作製した。
- 4) 脱パラフィン後の切片を蒸留水でよく洗う。

5) 下記の溶液で30分～1時間反応させる。

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	2gr
		クエン酸	5gr
		蒸留水	100cc

A液全量にB液2ccを加えて混合したのち、ただちに使用する。

- 6) 蒸留水でよく水洗する。
- 7) ヘマトキシリンで核を染める。
- 8) 脱水、透徹、封入。

II 電子顕微鏡的組織化学

電子顕微鏡的組織化学による検索のためにラット5例の脳が使用された。この研究に使用したラットはエーテルで麻酔ののち、次の方法で検索した。

- 1) 麻酔したラットの心臓から、3%グルタルアルデヒド・Millonig 緩衝液を硫化水素ガスで飽和した液で灌流固定した。その後、開頭し、脳を取り出し、さらに海馬領域を摘出し、その組織片を細切する。
- 2) 試料を上記の固定液に入れてさらに2時間固定する。
- 3) Millonig 緩衝液で12～24時間洗う。液は数回とりかえる。
- 4) 試料をカミソリの刃で、できるだけ薄切する。
- 5) 薄切片を次の液に30～60分入れる

A液	{	20%アラビアゴム水溶液	100cc
		1Mの硝酸銀水溶液	1cc
B液	{	ハイドロキノン	2gr
		クエン酸	5gr
		蒸留水	100cc

A液全量にB液20ccを加える(使用直前)

- 6) 緩衝液で切片を短時間洗った後、1%四酸化オスミウム溶液(PH7.3)で0.5～1時間固定する。
- 7) 試料を脱水、エポキシ包埋、電子染色を行ない電子顕微鏡で観察する。

結 果

I) 硫化銀法に関する検討

硫化銀法の原理は組織片を硫化物の入った固定液で固定し、同時に組織を硫化し、組織の中に含まれている重金属の硫化物を作り、さらにこれを銀を含んだ現像液で銀とおき換えて硫化銀の状態を観察するものである。したがって、写真の現像に際して、

光、時間、温度などの条件にきびしい制限があるように、この方法を行なうにあたってはその方の配慮が必要である。

そこでまず、光についてであるが、写真の現像とは異なって硫化銀法では現像液に銀が入れているので、暗室では反応が進まない。したがって写真の露出計で毎回一定の光量がえられる場所で行なう。しかし、直射日光のあたる所はよくない。後述する反応時間が30分から1時間内で終るような場所で行った。反応温度は写真の現像のように20℃とした。次いで、反応時間であるが、これが最も重要である、すなわち、光や温度を一定にしても、必ずしも一定の時間反応したのちに一定の染色標本ができない。そこでわれわれは、次のような方法で、少しでも同条件における像を得ようと考えた。すなわち、われわれの教室でこれまで研究が行なわれてきた海馬領域の切片を1つの反応液の中に必ず1枚入れ、これを対照標本として使った。反応を行なっている間に、この切片を取り出し、後述するように海馬領域において苔状線維終末が、海馬のh₁, h₂野の錐体細胞の樹状突起に終る部位を観察し、その終末部が樹状突起の表面にボタン状に終る状態が明確にみえる時間を至適時間とした。

以上のように反応液に入れる条件を一定にしておかないと、現像が進みすぎた写真のように人工産物ができ、像の判定ができなくなる。たとえば、反応液に入れる時間が長すぎると、反応を起さないと思われる多くの神経細胞やグリア細胞も渡銀されてくる場合がある。このような反応はその細胞が金属イオンを含んでいるためにおこるのではなく、神経細胞の好銀性から銀と結合して陽性反応をおこしたものと考えられる。

また、Haug (1973) は Na₂S と NaH₂PO₄ との水溶液に固定し、クリオスタットで薄切した切片を用いている。この方法では神経細胞やグリア細胞が金属との反応ではなく、渡銀法として染ってくる人が多いので、この研究では硫化水素アルコール溶液で固定し、パラフィン包埋した試料を使用した。

II) 光学顕微鏡的硫化銀法による結果

硫化銀法を用いて脳の各部位を染色すると、暗黒褐色に染まる強陽性反応部位と、黒褐色に染まる陽性反応部位と、さらにやや褐色に染まる弱陽性反応部位とが観察された。この反応の中で弱陽性反応を呈する部位は染色法の少しの変化により弱陽性あるいは陰性の反応を呈するので、これらの部位は金属

による陽性反応部位から除外した。

A) 終脳

a) 大脳皮質 (Cortex cerebri)

大脳皮質は部位によりかなり著しい構造上の差異があるが、一般に大脳皮質には系統発生的に古い古皮質および原始皮質、ならびに新皮質が区別される。したがって、本研究においても各皮質ごとに検索を進めた。

1) 古皮質 (狭義の嗅脳) (Paleocortex)

ラットでは狭義の嗅脳のうち嗅球が硫化銀法で反応を呈した。すなわち、嗅球の最表層にみられる嗅神経の軸索は硫化銀法で陰性であった。その内方にある嗅神経の終末部と僧帽細胞の樹状突起とがシナプスを作る部位である円形の嗅糸球はその全体がびまん性の陽性反応を呈していた。さらにその内方に配列している僧帽細胞の反応は陰性であった。僧帽細胞層の内方には顆粒細胞と neuropil からなる顆粒層が認められるが、この顆粒細胞の細胞体は硫化銀法で反応は陰性であったが、neuropil は強陽性反応を呈していた。僧帽細胞からでた軸索は嗅索となって後走するがこのものは硫化銀反応が陰性であった。

狭義の嗅脳に属する嗅球以外の部位は硫化銀反応で陰性であった。

2) 原始皮質 (Archicortex)

原始皮質に属する部位の中で海馬領域 (海馬と歯状回) と海馬台が硫化銀法で陽性反応を呈する部位であった。

1) 海馬領域 (Hippocampal formation)

海馬領域は海馬と歯状回により構成されており、さらに海馬と歯状回はその細胞ならびに髄鞘構築学的にいくつかの分野と層に分けられている。すなわち、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。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。

海馬領域を硫化銀法で染色すると海馬の h_1 から h_5 野の stratum radiatum の stratum pyramidale に接する領域と、歯状回の stratum multiforme の層が強陽性反応を呈した。この領域は歯状回の顆粒細胞

から出た苔状線維の終末部が認められる部位である。なお h_1 から h_5 野にわたる全野の stratum radiatum, stratum multiforme および歯状回の stratum moleculare において陽性反応を認めた。その他の層は陰性であった。

II) 海馬台 (Subiculum)

この部においては stratum moleculare の内層は硫化銀反応は陽性であったが、その外層と錐体細胞は陰性であった。

III) その他の領域

原始皮質に属するその他の領域では梨状葉が陽性または弱陽性反応を呈するほかは、硫化銀法でその反応は弱陽性か陰性を呈するにすぎなかった。

3) 新皮質 (Neocortex)

大脳皮質の新皮質はその細胞構築から次の 6 層に分けることができる。すなわち、第 1 層 (表在層), 第 2 層 (外顆粒層), 第 3 層 (錐体層), 第 4 層 (内顆粒層), 第 5 層 (神経細胞層), および第 6 層 (多形細胞層) から構成されている。これらの 6 層形成は大脳皮質の部位によりその構造が異なる。

一方、硫化銀法で新皮質を染色すると陽性あるいは弱陽性反応を呈する層と全く反応をみとめない層が区別できた。新皮質の全体において陽性または弱陽性を呈する部位は第 2 層の外顆粒層と第 3 層の錐体層の境界部から外顆粒層にかけてであった。さらに第 4 層の内顆粒層と第 5 層の神経細胞層との境界部から内顆粒層にかけて硫化銀法で陽性または弱陽性反応部位を認めた。

新皮質において、第 1 層の表在層、第 3 層の錐体層の内層と第 4 層の内顆粒層の外層との部位、および第 5 層の神経細胞層の内層は反応がほとんど、または全く陰性であった。さらに第 6 層の多形細胞層は弱陽性を呈する場合が多かった。新皮質は部位によって 6 層形成の層の発達状態が異なるため、硫化銀法で陽性、または弱陽性反応を呈する層の領域も部位により変化した。これらの反応陽性部位をさらに詳細に検索すると、錐体細胞の一部のものが、その細胞体に陽性反応を認めるだけで大部分のものが陰性であった。内、外の顆粒層を形成する細胞はすべて反応は陰性であった。それに反して、神経細胞間の neuropil は陽性または弱陽性反応を呈した。しかし、新皮質においては硫化銀法で海馬領域でみられたような強陽性反応部位は全く認めることができなかった。

b) 大脳髄質 (Substantia medullaris cerebri)

大部分が有髄線維の集団である大脳髄質は、ほとんどすべての領域が硫化銀法でその反応は陰性を呈した。

c) 大脳核 (Nuclei cerebri)

大脳核に属する核としては、尾状核、レンズ核(被殻と淡蒼球)、前障、扁桃核がある。これらの核のうち前障は硫化銀法でその反応は陰性であったが、その他の核はすべて陽性反応を呈した。

1) 尾状核とレンズ核(被殻と淡蒼球) (Nucleus caudatus と Nucleus lentiformis)

尾状核と被殻はその組織学的な構造はまったく同様で、両核を形成する神経細胞は小型のものが大部分で、その中に大型の細胞が少し混在していた。これらの神経細胞はいずれも硫化銀法で反応は陰性であった。また、両核内には有髄神経線維の小束が多数みとめられるが、これらもすべて反応は陰性であった。しかしこれらの神経細胞の間を構成する neuropil は陽性反応を呈した。このような陽性反応の、核内における部位差はなかった。一方、淡蒼球は尾状核や被殻とその構造はほぼ同一であり、反応陽性部位は neuropil のみであった。しかも、陽性反応は尾状核などに比較するとかなり弱かった。

2) 扁桃核 (corpus amygdaloideum)

扁桃核は主核と亜核から構成されている核である。すなわち、外側核、基底核、中心核、皮質核、内側核に分けられた。これらの核の中で硫化銀法で強い陽性反応を呈する部位として外側核の外側縁、外側核の腹内側部、基底核の小細胞性部、中心核の外側部、および皮質核などが観察できた。扁桃核のその他の部位は弱陽性か、まったく陰性を呈した。

B) 間脳 (Diencephalon)

間脳は大きく視床脳と視床下部に分けられる。

a) 視床脳 (Thalamencephalon)

視床脳に属する部位としては視床上部、背側視床および腹側視床があるが、これらの部位はいずれも硫化銀法では陽性反応部位をみとめることができなかった。

b) 視床下部 (Hypothalamus)

この部位は多数の神経核により構成されているが、硫化銀法で染めると才3脳室の前部の脳室にそって強陽性反応部位がみとめられた。この部は室傍核、腹内側核、背内側核により作られたものである。これらの核では、その神経細胞はごく少しの細胞が陽性反応を呈しているが、ほかの大部分の細胞は陰性であった。したがって陽性反応がみられる組織は、neuropil であった。上記の核以外の核はすべて弱陽

性反応か陰性であった。

また下垂体もすべて反応は陰性であった。

c) 才3脳室 (Ventriculus tertius)

才3脳室壁には脳室周囲器官群(終板器官、脳弓下器官、松果体、交連下器官、傍室器、最後野など)が存在するが、これらの器官は硫化銀法ですべて反応は陰性であった。ただ才3脳室脈絡叢の一部が強陽性反応を呈していた。

C) 中脳 (Mesencephalon)

中脳において硫化銀法で陽性反応がみとめられる部位は赤核と黒質であった。赤核ではこれを構成する神経細胞は一部のもの陽性反応を呈する以外の大部分の神経細胞は反応が陰性であった。この細胞の間に存在する neuropil が弱陽性反応を呈していた。一方、黒質は緻密部と網様部に分けられるが、緻密部ではこれを構成する神経細胞のほとんどすべてが硫化銀法で陰性であった。細胞の間にある neuropil のみが弱陽性反応を呈していた。網様部はそのすべてにおいて反応が陰性であった。中脳のその他の部位は、反応が陰性であった。

D) 小脳 (Cerebellum)

小脳においては小脳皮質、髄質、および小脳核のいずれの部位も硫化銀法で反応は陰性であった。

E) 橋と延髄 (Pons と Medulla oblongata)

橋や延髄には脳神経に属する核が多数存在するが、いずれの核も硫化銀法では反応が陰性であった。これらの核以外の部位もすべてにおいて反応を呈しなかった。

III) 電子顕微鏡的硫化銀法による結果

光学顕微鏡的組織化学において重金属の証明のために使用されている硫化銀法を電子顕微鏡レベルに利用できるように改良された方法(Ibata と Otsuka 1968, 1969)によりラットの海馬領域にみられる苔状線維終末を観察した。

まず、硫化銀反応を行わない正常の苔状線維終末を電子顕微鏡でみた。苔状線維終末は海馬の h₁-h₂野の錐体細胞の樹状突起、とくにその棘を取り囲み大きな膨みとなって終末していた。樹状突起から突出した一つの棘は二、三の分岐を繰り返す、この分岐した一つの棘に1~2個の苔状線維終末部がこれを取り囲んで終っていた。また苔状線維終末は一部では平滑な樹状突起の根幹ともシナプスを作っていた。この大きな終末部の中にはきわめて多数の密集したシナプス小胞(直径約500Å)が含まれ、ほぼその全体を満たしていた。また、このシナプス小胞

にまじって、小量ではあるが電子密度の高い小顆粒を含んだ含粒小胞(直径約1000Å)が観察された。さらにこれらの小胞とは別個に比較的多数のミトコンドリアが混在していた。シナプス膜の状態は、棘に終わる場合には、シナプス前膜はやや電子密度が高く、シナプス後膜側ではさらに濃い太い線として認められた。両膜は約200Åの明るい間隙をもって相対していた。樹状突起根幹部の表面に終るシナプス膜はところどころで前、後膜ともやや肥厚するが両者の間には電子密度の差はなかった。また、いずれの場合も、シナプス前膜に接近してシナプス小胞が集積している像はほとんど観察できなかつた。さらに棘内部には、いわゆる棘装置を認めることができなかった。

次いで、電子顕微鏡用に改良された硫化銀法で海馬領域の苔状線維終末を中心に観察を行なった。硫化銀法で染色し、エポキシ包埋された切片をトルイジン青で染色した光学顕微鏡用標本においても、すでに錐体細胞の樹状突起表面に黒褐色の銀粒子の沈着が認められた。これを電子顕微鏡で観察すると銀粒子は苔状線維終末部内のみ沈着し、それ以外の錐体細胞、顆粒細胞、神経膠細胞、苔状線維終末以外の神経終末、neuropil には全く沈着が認められなかった。このような反応陽性の神経終末においては銀粒子はシナプス小胞上に局在し、ミトコンドリアやシナプス膜上には観察できなかった。

考 察

この研究に使用した硫化銀法は Timm (1958) や、Voigt (1951, 1959) らにより開発された重金属を検出するための組織化学的な方法である。この方法はこれまでに開発された組織化学的に重金属を証明するための方法としては最も良い方法である。(Haug 1973) また、この方法は重金属を硫化物として組織内に沈着させ、これを銀と反応させ硫化銀を生ぜしめ、この銀粒子を顕微鏡で観察するものである。すなわち、この方法は理論的には写真の現象の原理を利用したものである。

この方法において、組織の固定と反応液に作用させる時間が問題となる。組織の固定にはわれわれは硫化水素で飽和されたアルコール溶液を使用し、パラフィン包埋したものをを用いたが Haug (1973) らは硫化ナトリウム水溶液で固定しクリオスタット切片を使用した。大塚ら(未発表)は、この両方の方法を検討した。その結果、水溶液の固定液では水溶性

の物質が流出しやすく、またクリオスタットでは連続切片が作りにくいなどの点から硫化水素アルコール溶液で固定し、パラフィン包埋の方法を用いた。また反応液で反応させる場合、光、温度、反応時間が問題となる。この問題に関してはすでに結果の項でのべたごとく、非特異性の反応が起り特異的な反応との判定が困難となる。特に Haug (1973) が報告しているような硫化銀法陽性の神経細胞やグリア細胞の多くのは重金属のための特異的な反応ではなく、神経組織の好銀性の性質から起った非特異性の反応により生じたものと考えられる。

Spatz (1922) により脳の中にも重金属、特に鉄が存在していることが始めて報告されたが、その後、これに関する研究はそれほど発展をみなかつた。近年になってジチゾンを生体的に注射すると、生体内に存在する重金属と反応し、組織を紅染させるジチゾン法を使用し、Maske (1955) が海馬領域の一定部位に重金属が含まれていることが明らかにした。その後、緒言で記載したごとく、この部位が組織化学的に、また、電子顕微鏡的に詳細に研究され、現在ではこの部に存在する重金属は亜鉛であることが明らかにされている(Otsuka ほか 1975)。

一方、海馬領域以外の部位における重金属を組織化学的に研究した報告は Haug (1973) のものだけである。しかし、この研究と本研究では硫化銀法の方法が異なるためか、かなりの所見のちがいがみとめられた。われわれの研究では硫化銀反応で強陽性あるいは陽性反応を呈する部位の中に存在する神経細胞やグリア細胞はごく一部のものが、反応が陽性であるにすぎなかつた。一方、Haug (1973) の報告によると陽性反応を呈する部位の他に、周囲の組織は陰性であっても神経細胞やグリア細胞のみが陽性を呈する部位が、かなり記載されている。これは先にも述べたように硫化銀法による非特異性反応をも反応陽性部位としているためだと思われる。

本研究によって脳における硫化銀法の強陽性反応あるいは陽性反応部位として認められたものは嗅球海馬領域、海馬台、尾状核、レンズ核、扁桃核、室傍核、第3脳室脈絡叢、などがあり、また、陽性反応あるいは弱陽性反応部位としては、大脳の新皮質赤核、黒質などであった。これらの部位の中で嗅球、海馬領域、海馬台、扁桃核などの部位は、いわゆる大脳辺縁系に属するか、あるいは辺縁系に近い働きをしていると考えられる部位である。しかも、これらの各部位で陽性反応物質の存在する組織はすべて

神経細胞ではなく、いわゆる、neuropilといわれる組織構造を呈する部位であった。Neuropilとは脳組織の中で神経細胞をのぞいた組織をいうのであるから、ここには多くの神経線維、シナプス、グリア細胞などが存在する。

一方、電子顕微鏡用に改良された硫化銀法で海馬領域の苔状線維終末部を観察すると、すでに Haug (1967) や Iyata と Otsuka (1968, 1969) らが発表していると同様に苔状線維終末部内のシナプス小胞上に陽性物質である銀粒子の沈着が証明できた。海馬領域の部位以外はまた電子顕微鏡による組織化学では観察を行っていないので確定はできないが、光学顕微鏡による観察でみられた大脳辺縁系における硫化銀法で陽性反応部位は、いわゆる neuropil であって、しかも神経終末が多数みとめられる組織構造をもっているため、おそらく、この反応陽性物質はシナプスを形成するシナプス前線維の終末部にあるのではないかと考えられる。

さらに、硫化銀法により陽性、または弱陽性反応を呈する部位として、尾状核、レンズ核、赤核、黒質などがあつた。これらの核はいずれも錐体外路系に属する核である。これらの部位においても陽性反応が認められるのはこれらの核を構成している神経細胞ではなく、neuropil であつた。したがって、大脳辺縁系の場合と同様、に反応陽性物質はこれらの neuropil を構成するシナプス前線維の終末部に含まれているのではないかと推察できる。

また、大脳皮質の新皮質も硫化銀法で、陽性あるいは弱陽性反応を呈する部位があつた。それは新皮質の6層形成の中の外顆粒層と錐体層の境界部と、内顆粒層と神経細胞層の境界部の部位であつた。この2つの陽性反応部位はいずれも錐体細胞の樹状突起の根部で構成されており、この樹状突起の表面には多数の神経終末が認められた。したがって、反応陽性物質はここでもシナプス前線維の終末部に含まれているのではないと思われる。

さらに、室傍核とその周辺部も硫化銀法で陽性反応を呈した。この核でも反応陽性物質は神経細胞ではなく neuropil に認められ、ここでもシナプスに存在するものと考えられる。

このように、脳にみられる重金属は、その大部分のものがシナプス、特にシナプス前線維終末部に含まれていると考えられることから、これらの物質は神経伝達物質か、あるいは、伝達に関係する酵素類に含まれているものと思われる。

一方、脳に存在し、上記のような働きを考えると考える重金属はいかなる金属であるかということとは不明な点が多い。古くから錐体外路系に属する神経核には鉄が含まれていることが報告されて来た (Spatz 1922)。したがって、本研究において錐体外路系に係する尾状核、レンズ核、赤核、黒質にみとめられた硫化銀法による陽性反応物質は鉄を含む物質であろうと考えられる。

また、海馬領域にみられる硫化銀法による陽性物質は分光計測 (Maske 1955) やオートラジオグラフィによる研究 (von Euler 1961, Otsuka ほか, 1967, Otsuka ほか1975) から亜鉛であると考えられている。しかし、その他の大脳辺縁系の中の硫化銀反応陽性を呈する部位はいかなる重金属を含んでいるかということはまだ全く不明である。ただ、本研究においても明らかなように、海馬領域以外の大脳辺縁系の陽性反応部位は、海馬領域と同様にシナプスが強く認められるところであるので、これらの部位にも重金属として亜鉛が含まれているのではないかと推察できる。しかも、これらの重金属を含んだ物質は大脳辺縁系の特有な機能に関係した働きをしていることも考えられる。今後、さらに多方面からの詳細な検索が必要である。

また、室傍核は神経分泌機能を有しており、下垂体後葉ホルモンを生産する細胞であるので、この部に存在する重金属も神経分泌物に含まれているのではないかと考えられるがしかし、この核と同様な働きをもつ視索上核には硫化銀法で陽性を呈する物質をみとめることができないことや、室傍核内においても、神経分泌細胞は反応が陰性であるところからこの重金属は神経分泌物には関係がないように思われる。それよりもむしろ、この重金属がいかなる金属かということとは不明であるが、先にも述べたように神経分泌細胞に終るシナプス前線維の終末部内に含まれて、神経伝達機能に係するものと考えられる。

結 語

硫化銀法を用いてラットの脳における重金属の分布状態を光学顕微鏡と電子顕微鏡で観察した。

光学顕微鏡による観察から、硫化銀法による反応陽性物質は大脳辺縁系に属する嗅球、海馬領域、海馬台、および扁桃体に認められた。また、錐体外路系に属する尾状核、レンズ核、赤核、および黒質にも反応陽性物質が証明された。さらにまた、大脳皮

質の新皮質や室傍核にも反応陽性物質が観察された。

これらの各部位で、反応陽性物質はどの部位においても、その部を構成する神経細胞内にはほとんど認められず、多数のシナプスがみとめられる neuro-opil に見出された。さらに海馬領域の電子顕微鏡による硫化銀法の観察から反応陽性物質は苔状線維終末内のシナプス小胞に一致して分布していることがわかった。

これらの検索結果から、脳内にみとめられる硫化

銀法による反応陽性物質(ここでは重金属)とシナプス、特に、シナプス前線維の終末部との形態学的なまたは機能的な関係が検討された。

稿を終えるにあたり、ご懇篤なるご指導とご校閲を賜った大塚長康教授に深く感謝いたします。また、終始ご助言とご指導をいただいた佐々木順造博士、荻田成人技官内藤由美子女史のご援助に心から感謝いたします。

(本論文の要旨は第18回日本組織細胞化学会に発表した)

文 献

- 1) Euler, C. von : On the significance of the high zinc content in the hippocampal formation. In *physiologie de l'hippampe*. Editions du Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, P. 135, 1962.
- 2) Fleischhauer, K. und Horstmann, E. : Intravitale Dithizonfärbung homologer Felder der Ammonsformation von Säugern. *Z. Zellforsch.*, **46**, 598, 1957.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) Iyata, 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.
- 6) Iyata, 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.
- 7) Maske, H. : Über den topochemischen Nachweis von Zink in Ammonshorn verschiedener Säugtiere. *Naturwissenschaften*, **42**, 424, 1955.
- 8) McLardy, T. : Neurosyncytial aspects of the hippocampal mossy fibre system. *Confin. neuropol.* **20**, 1, 1960.
- 9) McLardy, T. : Zinc enzymes and the hippocampal mossy fibre system. *Nature*, **194**, 300, 1962.
- 10) McLardy, T. : Some cell and fibre peculiarities of uncal hippocampus. In: *The rhinencephalon and related structures*. Progress in brain research, vol. 3. P. 70. Amsterdam: Elsevier. 1963.
- 11) McLardy, T. : Second hippocampal zinc-rich synaptic system. *Nature*, **201**, 92, 1964.
- 12) Otsuka, N. and Kawamoto, M. : Histochemische und autoradiographische Untersuchungen der Hippocampus-formation der Maus. *Histochemie*, **6**, 267, 1967.
- 13) Otsuka, N. und Umetani, M. : Chemocytoarchitectonics of ammon's formation. *Proc. Jap. Histochem. Ass.*, **3**, 231, 1962.
- 14) 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.

- 15) Spatz, H. : Über den Eisennachweis im Gehirn, besonders im Zentren des extrapyramidal-motorischen System. Virchows Arch. path. Anat., **77**, 261, 1922.
- 16) Timm, F. : Zur Histochemie des Ammonshorngebietes. Z. Zellforsch., **48**, 548, 1956.
- 17) Voigt, G. R. : Histologische Versilberungen. Habil.-Schr. Jena, 1951.
- 18) Voigt, G. R. : Untersuchungen mit der Sulfidsilbermethode an menschlichen und tierischen Bauchspeicheldrüsen (unter besonderer Berücksichtigung des Diabetes mellitus und experimenteller Metalvergiftungen) Virchows Arch. path. Anat., **332**, 295, 1959.

写 真 の 説 明

- 写真1. 嗅脳, 硫化銀法×40
- 写真2. 嗅球を中心とした拡大像, 同上×60
- 写真3. 海馬領域, 同上×20
- 写真4. 新皮質, 同上×30
- 写真5. 尾状核, 同上×17
- 写真6. 扁桃体, 同上×27
- 写真7. 視床下部, 陽性反応を呈する室傍核が認められる. 同上×20
- 写真8. 視床下部, 室傍核を中心とした反応陽性部位が観察される. 同上×20
- 写真9. 視床下部, 反応が陰性の視索上核が認められる. 同上×20
- 写真10. 第3脳室周囲器官群に属する交連下器官, 反応は陰性である. 同上×18
- 写真11. 第3脳室脈絡組織, その一部分が反応陽性である. 同上×17
- 写真12. 小脳と延髄, 両部位とも反応は陰性である. 同上×13
- 写真13. 苔状線維終末部の電子顕微鏡像, 終末内に多数のシナプス小胞が認められる. ×38,000.
- 写真14. 電子顕微鏡用硫化銀法による苔状線維終末像, 終末内のシナプス小胞に一致して反応陽性物質(銀粒子)が分布している像が認められる. ×32,000.

桜田寛海論文附图



写真1

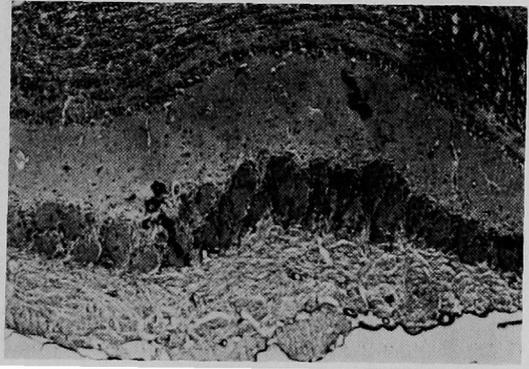


写真2

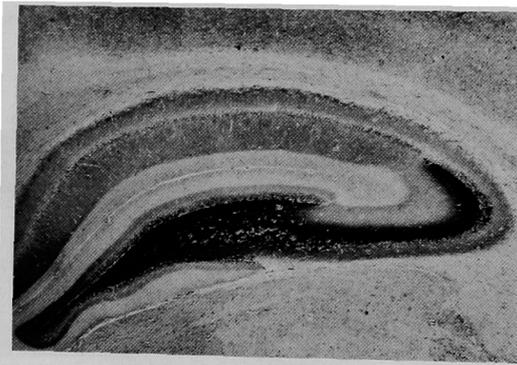


写真3

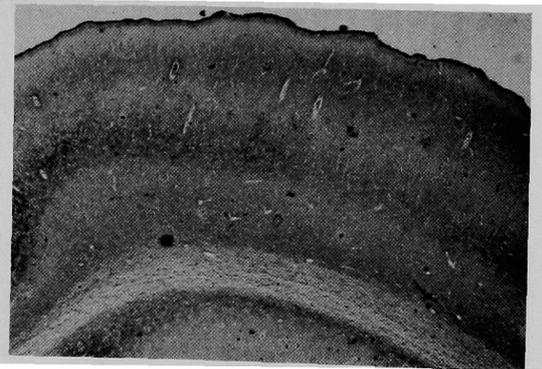


写真4

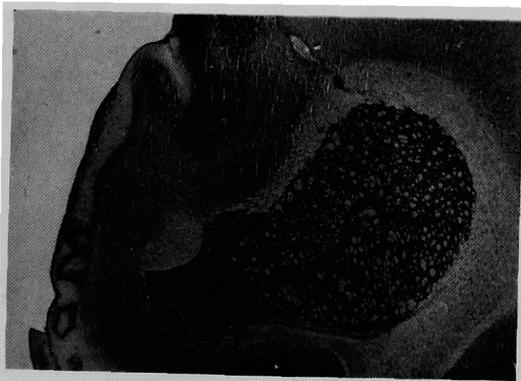


写真5



写真6

桜田寛海論文附図

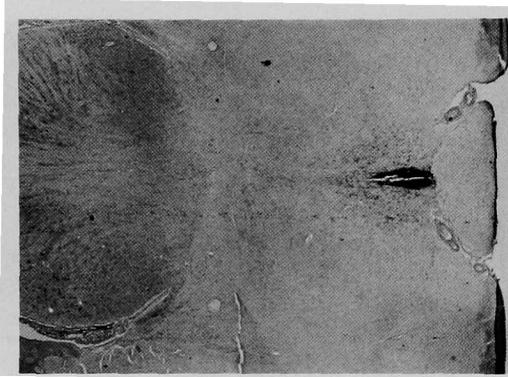


写真7

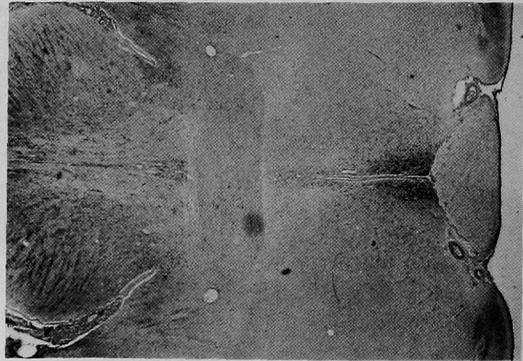


写真8

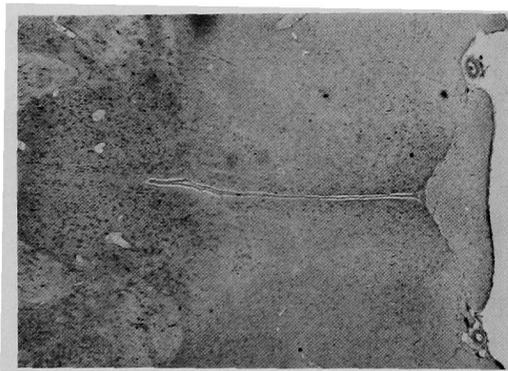


写真9

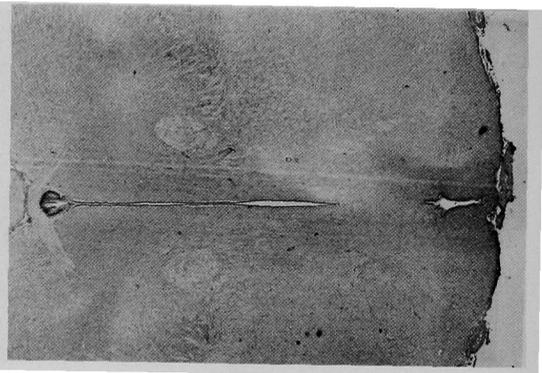


写真10

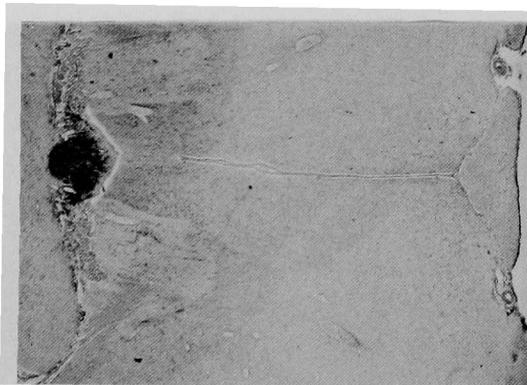


写真11

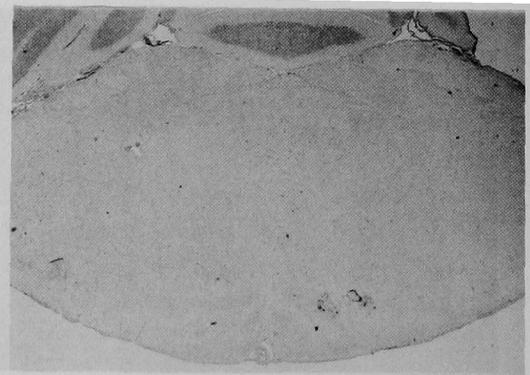


写真12

桜田寛海論文附図

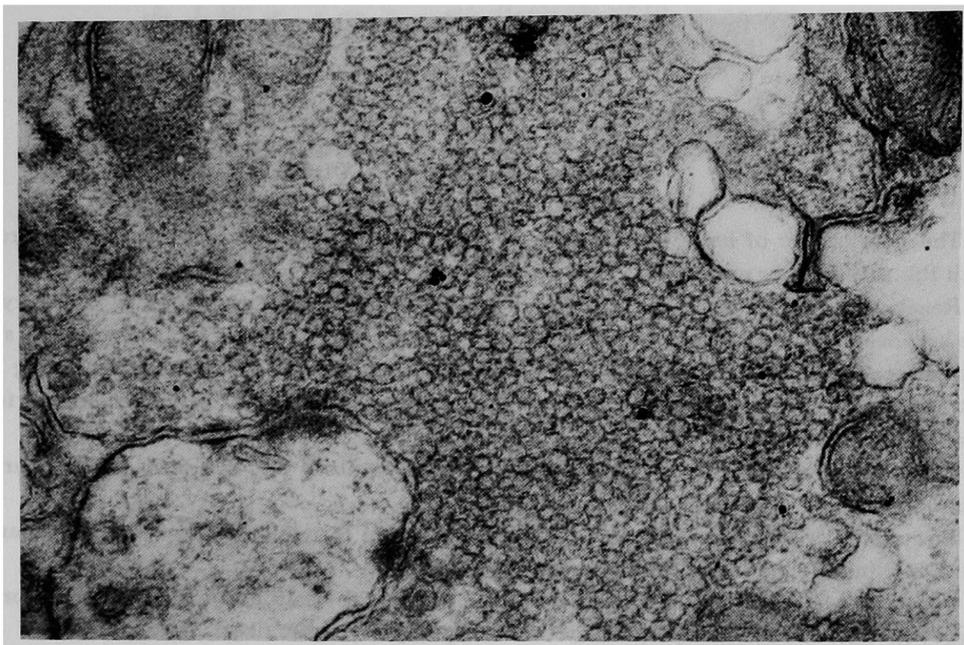


写真13

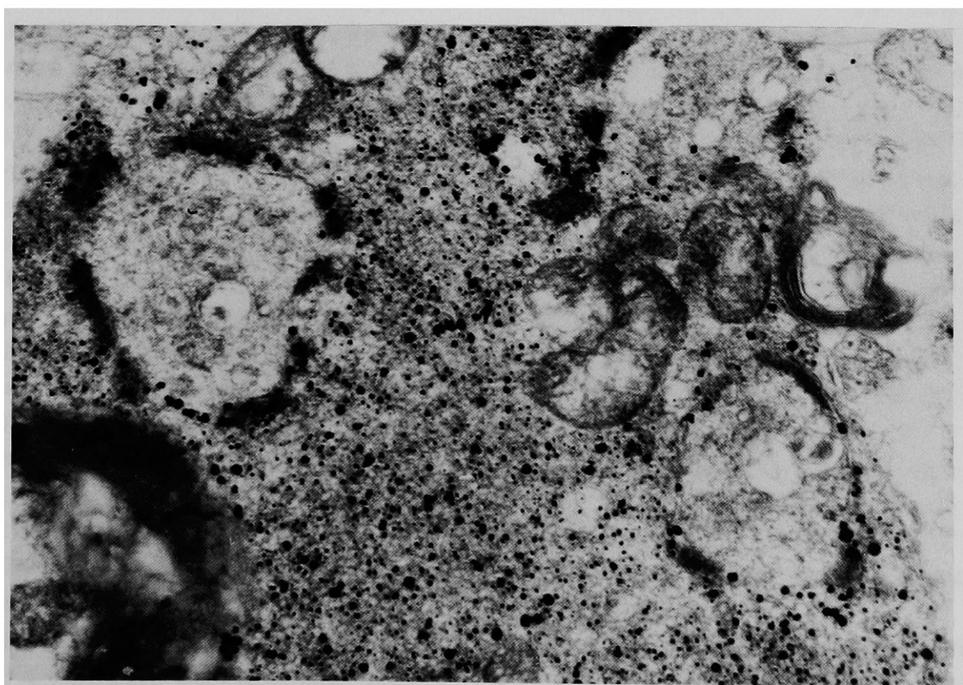


写真14

Histochemical study of heavy metals in the brain

by

Hiromi SAKURADA

Department of Anatomy, Okayama University Medical School

(Director : Prof. Nagayasu Otsuka)

The distribution of heavy metals were studied in rat brain by light and electron microscopy with the sulfide silver method.

Reaction products by this method were found under light microscopy in olfactory bulb, the hippocampal formation, subiculum, and amygdaloid nucleus belonging to the limbic system, and in caudate nucleus, lenticular nucleus, red nucleus and substantia nigra belonging to the extrapyramidal tracts. These products were also observed in neocortex of cerebral cortex and paraventricular nucleus.

These reaction positive-materials were not found in nerve cell bodies in all these area but found in neuropil containing many synapses.

Electron microscopic observation of the hippocampal formation showed that these materials were distributed in synaptic vesicles of the mossy fibers.

From these results the morphological and functional relationship between these products (heavy metals) and synapses, especially the ending of presynaptic fibers, were discussed.