

海馬の実験的、組織化学的研究

岡山大学医学部第一解剖学教室

芳原達也・大塚長康・岡野晴光

(昭和52年11月29日受稿)

I 緒言

Gomori (1948年)¹⁾ がイヌの刺激伝導系を用いて、コリンエステラーゼ(以下 ChE とする)の組織化学的検出法を確立して以来、多くの研究者により、多くの動物の種々の臓器における ChE の分布が研究されてきた。²⁾ 海馬領域では、生体内でも、最も多くのアセチルコリンエステラーゼ(以下 AchE とする)が存在していることが、Mathisen, J. S.,³⁾ Blackstad, T. W.,⁴⁾ Jensen, F. A. G.,⁵⁾ らにより認められている。またこの領域には、多くの亜鉛が存在することも Mask⁶⁾ らにより報告されている。さらに、大塚^{7)~10)} や岡野¹¹⁾ は、動物にジチゾン、アロキサン、オキシンを投与すると、一定時間の間、海馬領域から亜鉛が減少することを報告している。そこで、ジチゾン、アロキサン、オキシンの薬物投与時の亜鉛減少時期における海馬領域の AchE とカテコールアミン(以下 CA とする)の変動を観察したので報告する。

II 材料および方法

体重 200~300 g の Rat 22匹を次の様に群別した。

- ① 無処置の対照例(4匹)
- ② 200 mg/kg のジチゾンを腹腔内投与、1時間後の例(6匹)
- ③ 200 mg/kg のアロキサンを腹腔内投与、1時間後の例(6匹)
- ④ 200 mg/kg のオキシンを腹腔内投与、10時間後の例(6匹)

実験は、低温下(0~4℃)で断頭して、ただちに海馬領域を摘出したものを、AchE 染色法、CA 検出のための蛍光法を行った。

1) AchE 染色法

Karnovskey 法を参考にして、AchE 染色を行った。

a) 組織片を 0.44 M 蔗糖水溶液で、洗滌して血液を除去し、2~4℃の4%緩衝ホルマリン(0.075 M リン酸緩衝液と 0.44 M 蔗糖を含む)にて、2~3時間固定。

b) 組織片を 2~4℃の 0.44 M 蔗糖液で、16時間浸漬。

c) 組織片を 20μ の凍結切片とし、後述の 2~4℃にした反応液に 15~40分間浸漬。

d) 氷冷 0.44 M の蔗糖液で 4 回、ほぼ 10分間水洗後、切片をスライドグラスに乗せ、グリセリンで封入して検鏡する。

反応液の作り方

A 液; 0.1 M マレイン酸塩緩衝液(pH 6.0)

B 液; クエン酸ナトリウム水溶液

C 液; 0.03 M の硫酸銅水溶液

D 液; 5 mM フェリシアン化カリウム水溶液

上記の溶液を作製し、A 液 6.5 cc に沃化アセチルチオコリン 5 mg を溶した後、B 液 0.5 cc、C 液 1 cc、蒸留水 1 cc、D 液 1 cc、蔗糖 1.5 g を順に混合して、浸漬液を作る。

2) CA 検出のための蛍光法

摘出した組織片を、-80℃のイソペンタンードライアイスで瞬間凍結し、Falck-Hillarp 法によって処理し、蛍光顕微鏡で、CA 蛍光を観察する。

III 成績

(1)対照 Rat の海馬領域における AchE 反応と、CA 蛍光線維の分布状態。

大塚らの Rat の海馬領域の模式図を参照して写真

1のごとく海馬領域を海馬と歯状回に分け、さらに海馬は、これを構成する錐体細胞の形、大きさ、その配列状態などから、 h_1 ～ h_5 の分野に分けて、各分野では、第1層(Alveus)、第2層(Stratum multiforme)、第3層(Stratum pyramidale)、第4層(Stratum radiatum)、第5層(Stratum lacunosum)、第6層(Stratum moleculare)の6層に分け、また歯状回は第7層(Stratum moleculare)、第8層(Stratum granulosum)と第9層(Stratum multiforme)の3層に分けた。

海馬での AchE の分布は、海馬の全野では、第2層と第3層の境界領域から第3層にかけて、AchE 反応が最も強く、次いで、第3層と第4層の境界領域から第4層にかけてと第2層が強く、第6層は、中等度の AchE 反応が認められ、第1層、第4層の第5層寄りの層と第5層では、AchE 反応は陰性であった。また歯状回では、第7層と第8層が強く、第7層と第8層の境界領域と第9層では、陰性であった。

海馬の CA 蛍光線維の分布状態をみると、海馬の h_1 野から h_4 野までにおいては、第5層と第6層に最も多く認められ、第4層と第2層では少なく、第1層と第3層では、ほとんど観察されなかった。 h_5 野では、その全野に多くの CA 蛍光線維が認められた。歯状回では、第9層に最も多く、第7層では、中等度に CA 蛍光線維が認められたが、第8層には、ほとんど認められなかった。

(2)薬物投与時における AchE 反応と CA 蛍光線維の分布状態。

①ジチゾン 200 mg/kg 投与 1 時間後における所見

AchE 反応は、 h_1 野から h_4 野では、第2層および第6層において、増強されていることが認められたが、第1層、第3層、第4層、第5層では、それほどの増強は認められなかった。 h_5 野では、全層の反応が、やや増強した。歯状回では、第7層と第9層において、増強が認められたが、第8層においては、反応の減少が認められた。

CA 蛍光線維は、海馬では、 h_1 野から h_4 野までは、第5層および第6層でやや増強し、 h_5 野では、全層で増強し、歯状回では、第9層と第7層において増強していた。

②アロキサン 200 mg/kg 投与 1 時間後における所見

AchE 反応は、海馬領域のすべてにおいて、対照 Rat と比較して、変化は、ほとんど認められなかつ

た。また CA 蛍光線維も、変化は、ほとんど認められなかった。

③オキシシン 200 mg/kg 投与 10 分間後における所見

海馬の h_1 野から h_4 野では、第2層と第6層において、AchE 反応が強く認められ、第1層、第3層、第4層と第5層においては、ほとんど AchE 反応の増強が認められなかった。 h_5 野では、全層において、やや増強されていた。一方、歯状回では、第7層と第9層において、増強され、第8層では反対に減弱していた。

CA 蛍光線維は、歯状回においては、第9層と第7層で、増強が認められた。また海馬においては、 h_1 野から h_4 野までは、第5層および第6層でやや増強していたし、 h_5 野では、全般にやや増強していた

IV 考 察

正常 Rat の海馬領域における AchE 反応は、Mathison, J. S¹¹⁾ の報告とおおよそ同一の結果を得た。CA 蛍光線維の分布は、Blackstad¹²⁾ の報告とも、大体一致していた。

ジチゾン、アロキサン、オキシシン投与時における、AchE 反応を比較検討すると、ジチゾンおよびオキシシン投与時には、海馬の h_1 野から h_4 野までは、第2層と第6層において、中等度の増強が認められ、 h_5 野では、全層でやや増強が認められた。また歯状回では、第7層と第9層で増強が認められたが、第8層では減少が認められた。しかし、アロキサン投与時には、対照との差は、ほとんど認められなかった。また、CA 蛍光線維は、ジチゾン、オキシシン投与時には、海馬の h_1 野から h_4 野で第5層と第6層でやや増強し、 h_5 野では全層で、歯状回では、第7層と第9層で増強していた。アロキサン投与時には、CA 蛍光線維は、対照と比較して、ほとんど変化がなかった。

一方、大塚らは、ジチゾンやオキシシン投与後、一定時間内に海馬領域の苔状線維終末内の亜鉛が減少することを認めた。さらに、その時間内において、その神経線維終末を観察すると、その中に含まれているシナプス小胞が減少していることが明らかにされている。また、本研究に使用した、ジチゾン投与後 1 時間目、あるいは、オキシシン投与後 10 分間目の AchE 反応を行った切片では、苔状線維終末部において、強い反応を呈したが、対照 Rat と比較すると、第9層が増強した程度で、その他の領域では、ほとんど変化がなかった。そこで、苔状線維終末に

におけるシナプス小胞と亜鉛と AchE との関係を考察してみると次の様なことが考えられる。

亜鉛を含んでいる苔状線維終末が存在する部位である海馬の h_3 野から h_5 野にかけての第 4 層の第 3 層寄りの領域と、歯状回の第 9 層では、正常例でも、AchE 反応は陽性を呈する。しかし、ジチゾンやオキシンを投与すると、歯状回の第 9 層のみ増強し、他の苔状線維終末では、正常例と大差なかった。一方、この終末の正常例の微細構造で、この終末部内にはシナプス小胞が密集し、ジチゾンやオキシンの投与により、亜鉛がこの終末部から減少すると、シナプス小胞の数も減少していることが認められている。

これらの結果から、苔状線維終末内の亜鉛は、そこに存在するシナプス小胞の放出を抑制する作用をもっているものと思われる。そして、ジチゾン、オキシンを投与すると、終末内の亜鉛が減少し、そのため、シナプス小胞が放出されるものと考えられる。一方、本研究で、ジチゾン、オキシンの投与時に、AchE 反応が、苔状線維終末分布領域において、ある部位では増強し、ある部位では、正常とほとんど変らなかつた。このことは、苔状線維終末内のシナプス小胞の中に、アセチルコリンをあまり含まないか、または、苔状線維終末の分布領域でも、その部位により、シナプス小胞の中に、アセチルコリンを多く含んだ部位と、そうでない部位があることを示している。

これについては、今後、さらに詳しい組織化学的、生化学的研究が必要である。

また、CA 神経線維の海馬領域における分布に関しては、組織化学的な研究と同時に、電子顕微鏡による含粒小胞との関係を明らかにしなくてはならない。

V 結 論

ジチゾン、アロキサン、オキシンの投与時の Rat の

海馬領域における AchE 反応と CA 神経線維の分布状態を観察し、次の様な結論を得た。

①正常例

AchE 反応は、海馬の $h_1 \sim h_4$ 野では、第 2 層、第 3 層と第 4 層が陽性で、第 6 層は、軽度の陽性で、他の層は陰性であった。また h_5 野では全層が陽性であり、歯状回では、第 7 層と第 8 層に於て陽性で、第 9 層には、軽度の陽性であった。一方、CA 蛍光線維は、海馬の $h_1 \sim h_4$ 野では、第 5 層と第 6 層で強く認められ、 h_5 野では全層的に強く、歯状回では、第 9 層と第 7 層に強く認められた。

②ジチゾン投与時

AchE 反応は、海馬の $h_1 \sim h_4$ 野では、第 2 層と第 6 層で増強され、 h_5 野では、全層でやや増加し、歯状回では、第 7 層と第 9 層で増加したが、第 8 層では減弱した。CA 蛍光線維は、海馬で、第 5 層と第 6 層でやや増強し、歯状回では、第 7 層と第 9 層で増強した。

③アロキサン投与時

AchE 反応も、CA 蛍光線維も、対照とほとんど差はなかつた。

④オキシンの投与時

AchE 反応は、海馬の $h_1 \sim h_4$ 野では第 2 層と第 6 層で増加し、 h_5 野では、全層でやや増加し、歯状回では、第 9 層と第 7 層で増加し、第 8 層ではやや減弱していた。CA 蛍光線維は、海馬の $h_1 \sim h_4$ 野で、第 5 層と第 6 層で、 h_5 野では、全層で、歯状回では、第 9 層と第 7 層で増強していた。

上記の所見より海馬領域における亜鉛と AchE や CA との関係が討論された。

稿を終るにあたり、本研究について有益な御助言を下さいました東邦大学医学部森忠繁教授ならびに、岡山大学第一生理学教室村上哲英助教授に謝意を表します。

参 考 文 献

- 1) Gomori, G.: Histochemical demonstration of sites of cholinesterase activity. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **68**: 354, 1948.
- 2) Barrnet, R. J.: The fine structural localization of acetylcholinesterase at the myoneural junction. *J. Cell. Biol.*, **12**: 247, 1962.
- 3) Koelle, G. B.: The histochemical localization of cholinesterase in the central nervous system of the rat. *J. Comp. Neurol.*, **100**: 211, 1954.
- 4) Mathisen, J. S.: Quantitative histochemistry of acetylcholinesterase in rat hippocampal region correlated to histochemical staining. *J. Neurochem.*, **17**: 739, 1970.
- 5) Blackstad, T. W.: Cholinesterase in the hippocampal region. Distribution and relation to architectonics and afferent system. *Acta. anat. (Basel)* **56**: 216, 1964.
- 6) Jensen, F. A. G. and Blackstad, T. W.: Distribution of acetylcholinesterase in the hippocampal region of guinea pig. I. Entorhinal area, parasubiculum and presubiculum. *Z. Zellforsch.*, **114**: 460, 1971.
- 7) Maske, H.: Über den topochemischen Nachweis von Zink im Ammonshorn verschiedener Säugetiere. *Naturwissenschaften*, **42**: 424, 1955.
- 8) 大塚長康, 朝子恭, 片岡昭: 各種哺乳動物の海馬領域における亜鉛について, *解剖学雑誌*, **40**: 267, 1965.
- 9) 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**: 2. 91, 1975.
- 10) 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**. 3 : 175, 1975.
- 11) 岡野晴光: 海馬の実験的, 電子顕微鏡的研究, 岡山医学会雑誌に投稿中
- 12) Blackstad, T. W, and Fuxe, K.: Noradrenaline nerve terminals in the rat and guinea pig. *Zeitschrift für Zellforschung*, **78**: 463, 1967.

写 真 説 明

写真1 Ratの海馬領域の模式図

- 海 馬 第1層 Alveus
- 第2層 Stratum multiforme
- 第3層 Stratum pyramidale
- 第4層 Stratum radiatum
- 第5層 Stratum lacunosum
- 第6層 Stratum moleculare
- 歯状回 第7層 Stratum moleculare
- 第8層 Stratum granulosum
- 第9層 Stratum multiform

写真2 正常(AchE反応)海馬領域×100

写真3 ジチゾン投与時(AchE反応)歯状回×200

写真4 アロキサン投与時(AchE反応)海馬領域×100

写真5 オキシシン投与時(AchE反応)海馬領域×200

写真6 正常(CA蛍光線維)歯状回×70

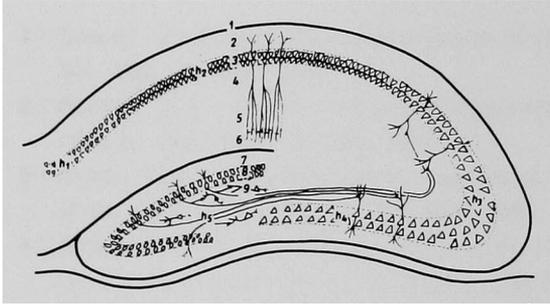
写真7 ジチゾン投与時(CA蛍光線維)歯状回×70

写真8 アロキサン投与時(CA蛍光線維)歯状回×70

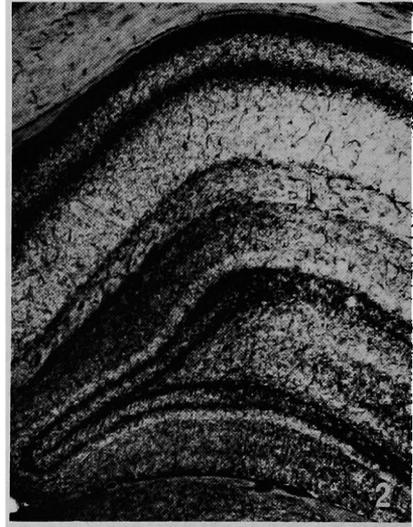
写真9 オキシシン投与時(CA蛍光線維)歯状回×70

写真10 ジチゾン投与時(AchE反応)歯状回×400

芳原達也論文附圖



1



3

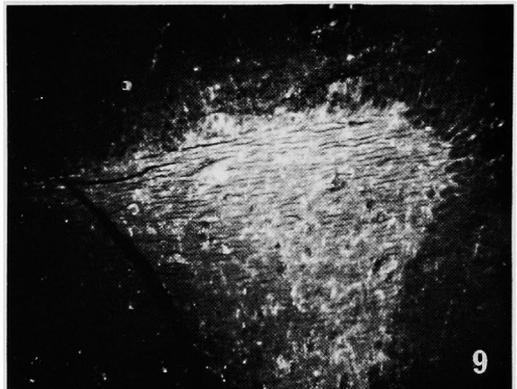
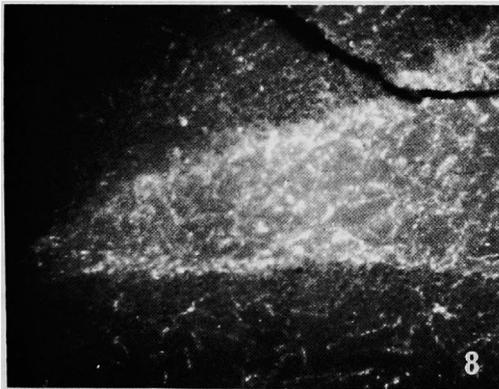
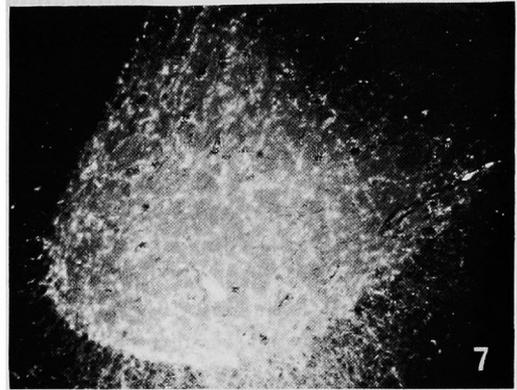
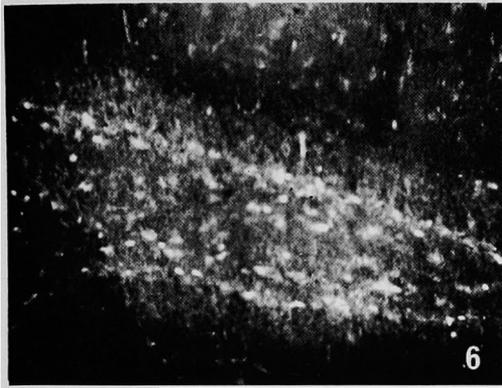


4



5

芳原達也論文附図



**The experimental and histochemical study in the rat
hippocampal formation.**

by

Tatsuya HOBARA, Nagayasu OTSUKA and Harumitsu OKANO.

Department of Anatomy Okayama University Medical School.

The hippocampal formation of the rat brain was studied by the Falck-Hillarp method and Karnovsky method after administration of dithizone, alloxan, and oxine.

The purpose of this experiment was to clear the relation between cholinergic, adrenergic terminals and zinc in the mossy fiber synaps.

The acetylcholinesterase and catecholamine reaction increased in oxine and dithizone administration.

On the other hand, when dithizone and oxine were administrated, zinc decreased in the mossy fiber synaps.

From this result, the relation between zinc in mossy fiber synaps and acetylcholinesterase, catecholamine in the hippocampus were discussed.