

海馬領域の実験的・電子顕微鏡的研究

岡山大学医学部第一解剖学教室（指導：大塚長康教授）

岡 野 晴 光

（昭和52年12月26日受稿）

緒 言

海馬領域（海馬と歯状回）は大脳辺縁系の中でも形態学的にも、機能的にも重要な部位とされている。このような部位に組織化学的に亜鉛が含まれていることがMaske¹⁾により初めて報告されて以来、この方面の研究が盛んに行なわれてきた(Fleischhauerほか²⁾、Timm³⁾、Mc Lardy⁴⁾、Otsukaほか⁵⁾、Haug⁶⁾、田村⁷⁾、その他)。その結果、この亜鉛は海馬領域にみられる苔状神経終末部に存在し、さらに電子顕微鏡的、組織化学的研究(Haug⁸⁾、IbataとOtsuka⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾や電子顕微鏡的オートラジオグラフィの研究(Otsukaほか¹²⁾)から亜鉛は終末部内に認められるシナプス小胞内に含まれていることが明らかにされてきた。

一方、脾島のβ細胞に存在する亜鉛と結合して、この細胞に障害を与え、実験的糖尿病を起させるジチゾン投与することにより、海馬領域から一定期間の間、亜鉛が組織化学的に消失し(Otsukaほか、¹³⁾¹⁴⁾ Danscher¹⁵⁾、田村⁷⁾)、また、この期間に一致して、苔状神経線維終末部からシナプス小胞の減少が認められることが明らかにされているがその機能的意義は不明な点が多い(Otsukaほか¹⁶⁾)。そこで本研究においては、ジチゾンのほか、ジチゾンと同様、その投与により実験的糖尿病を起す、アロキサンとオキシンを投与した後の海馬領域の組織化学的变化および形態学的変化を電子顕微鏡により観察し、この部に存在する亜鉛の機能的な意義を明らかにしようと考えた。

材料と方法

この研究のためにラット（100例）の脳を用いた。対照例として4例を、ジチゾン、アロキサン、およびオキシニ投与例として各32例ずつを使用した。ジ

チゾン（ジチゾン（diphenylthiocarbazon）100mgを0.2%アンモニア水溶液 10 mlで溶解した液）を200mg/kg、アロキサン（5%アロキサン（alloxan）水溶液）を200mg/kg、およびオキシニ（オキシニ（oxine）0.2gを純アルコールで溶解した液）を200mg/kgとなるようそれぞれをラットの腹腔内に注射した。注射後、各例とも5分、10分、15分、30分、45分、1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、12時間、24時間の各時間ごとに動物を断頭、ただちに、脳を取り出し、一側の大脳半球から海馬領域を摘出し、3%グルタルアルデヒド・緩衝液で固定、10分後に実体顕微鏡下で苔状線維の分布領域を切り出し、細切したのち、さらに同液で2時間固定した。その後、1%四酸化オスミウム・緩衝液で2時間再固定、以下冷却エタノール系列で脱水、ついでエポン812で包埋した。超薄切片はPorter-Blum I型 ultramicrotomを用いて作成、酢酸ウラニルと酢酸鉛で電子染色を行い、JEM 7型で鏡検した。さらに他側の大脳半球から海馬領域を摘出し、Timmの硫化銀法を行って観察した。

硫化銀法 (Timm³⁾)

- 1) 硫化水素飽和純アルコール溶液に6~12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包埋、切片を作成。
- 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時間反応させる。

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

A液全量にB液2c.cを混合したのち、ただちに使用する。

- 6) 蒸留水で十分水洗。
- 7) ヘマトキシリンで核を染める。
- 8) 脱水、透徹、封入、鏡検。

結 果

A 正常例

Rose¹⁷⁾¹⁸⁾¹⁹⁾らによって海馬領域は細胞ならびに髄鞘構築学的に次のように分類している。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。また、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 (図 1, 2)。このような歯状回と海馬における分野と層はわれわれの研究に使用したラットの海馬領域においても分けることができた。組織化学的に硫化銀法で海馬領域を観察すると歯状回に存在する顆粒細胞の神経突起、すなわち苔状神経線維が海馬の h_3 - h_5 野の錐体細胞の樹状突起に終末する部位である、Stratum radiatum の Stratum pyramidale に接する部位と歯状回の Stratum multiforme に一致して強陽性反応を呈した (図 3)。

一方、電子顕微鏡的に苔状線維は錐体細胞の樹状突起、特にその棘を取り囲むように大きな膨らみとなって終末していた。樹状突起から突出した1つの棘は2, 3の分枝をくりかえし、その分枝した1つの棘に1~2個の苔状線維終末部がこれを取りかこんで終っていた。したがって2, 3の棘の分枝を1つの終末膨大部が含んでいるため、電子顕微鏡像としてはしばしば1つの終末膨大部の内部に島状に遊離した棘の横断像が認められた。また、苔状線維終末は一部において平滑な樹状突起の根幹部ともシナプスを作っていた。この終末膨大部の内部には多数の密集した内部に顆粒をもたない明るいシナプス小胞 (直径約500Å) が観察された。さらにこれらの小胞とは別に内部に顆粒をもったやゝ大型のシナプス小胞 (直径約1000Å) が混在している終末部も認められた。また、これら小胞とは別に比較的多数のミトコンドリアも混在していた。また、棘に終わる終末部のシナプス前膜はやゝ電子密度が高く、シナプ

ス後膜側ではさらに厚い膜として認められた。これら両膜は約200Åの明るい間隙をもって相対していた。樹状突起根幹表面に終るシナプス膜は、ところどころで前、後膜ともやゝ肥厚していたが、両者の間には電子密度の差はほとんどなかった。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った。さらに、棘内部にはミトコンドリアは含まれていたが、いわゆる棘装置は認められなかった (図 4)。

B ジチゾン投与例

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 Stratum multiforme はまだ強陽性反応を呈したが、海馬の h_3 - h_5 野の Stratum radiatum では弱陽性反応を認めた。30分後の例では歯状回の Stratum 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時間目のものでは海馬と歯状回のいずれの部位も全く陰性であった (図 5 a)。投与後3.5時間目では歯状回の Stratum multiforme の部位が硫化銀法で弱陽性を呈するようになった。4時間後では正常例の海馬領域において硫化銀法で強陽性反応を呈する部位はすべて強陽性反応を認めるようになった (図 5 b)。次いで、硫化銀法でその反応が弱く、あるいは消失する時間の苔状線維終末部を電子顕微鏡で観察して次のような所見をえた。すなわち、ジチゾン投与後15分から30分では、苔状線維終末内のシナプス小胞が正常例のようにびまん性に分布しないで、終末部内の数ヶ所にシナプス小胞が凝集している像が観察できた。しかし、終末部内に含まれているミトコンドリアなどには変化は認められなかった (図 6 a)。ジチゾン投与後1時間から1.5時間では苔状線維終末部内のシナプス小胞は減少し、終末部全体に極めて散在性に分布していた。また、含粒小胞も減少していた。シナプス膜の前膜も後膜もその電子密度は低くなり、とくに、シナプス前膜にシナプス小胞が集まっているというような像も認められなかった。さらに、終末部内に存在するミトコンドリアの数はかなり減少していたが、構造の変化は認められなかった。また、この終末部の横断像で正常例ではよく観察できた樹状突起棘がほとんど認められなかった (図 6 b)。ジチゾン投与後3時間から5時間目のものでは苔状線維終末部内のシナプス小胞の数やその分布状態や棘の構造もほとんど正常と変らない状態を呈していた (図 6 c)。上記のいずれの時期におい

ても、歯状回の顆粒細胞や苔状線維が終わる海馬の錐体細胞およびその樹状突起には形態学的変化は認められなかった。ただ、すでに述べたようにジチゾン投与後1-1.5時間目において錐体細胞の樹状突起棘のみが減少をきたす所見が観察された。

C アロキサン投与例

アロキサンを投与し、その一定期間後にえた材料を硫化銀法で染色し海馬領域を観察した。その結果投与後1時間から3時間にかけてえた標本で強陽性反応を呈する部位がさらにやゝ強い反応を観察したのみで、全時間経過において正常例とほとんど変わらない反応を認めた(図7)。一方、電子顕微鏡による観察においてもアロキサン投与後の各時間経過後の材料において、どの時間も微細構造の変化はほとんど観察できなかった(図8)。

D オキシシン投与例

オキシシン投与(200mg/kg)後5分のラットの海馬領域を硫化銀法で観察すると、正常例で強陽性反応を呈した部位、すなわち、歯状回の Stratum multiforme と海馬の h_3-h_5 野の Stratum radiatum の Stratum pyramidale に接する部位の反応が全体的に弱くなっていた。さらに投与後、10分では、上記の部位の反応がさらに弱くなり、ほとんど陰性に近いところまで反応が減退した(図9a)。投与後30分経過したものでは、反応が回復し始め、投与後1時間で強陽性部位はほとんど完全に正常例と同様な強陽性反応を呈するようになった(図9b)。投与後2時間以上を経過したものでは正常例とその反応部位、反応の強さなどは全く変らなかった。

オキシシン投与後、その時間経過をおってラットの海馬領域の苔状線維終末の微細構造の変化を電子顕微鏡で観察した。すなわち、オキシシン投与後5分経過したものでは正常例で苔状線維終末全体に密集していたシナプス小胞はこの時期では減少し始め、すなわち、シナプス前膜の近くにシナプス小胞が散在性に分布しているもの、終末膨大部の中央部に散在性に分布しているもの、あるいは終末部全体に広く散在性に分布しているものなどのように減少したシナプス小胞の終末部内での分布状態は種々な形を呈していた。含粒小胞も又減少していた。終末部内に見られるミトコンドリアはその分布する数も形態的变化も正常例と変らなかった。シナプス前膜、後膜の肥厚は正常例とほとんど変わらないものと、その電子密度が減少しているものが観察できた。さらに、苔状線維終末部が数個の樹状突起の棘を取り囲む像

はよく認められた。また、ところどころには正常例とほとんど変わらないシナプス小胞の分布状態を呈する苔状線維終末も少数ではあるが混在していた(図10a)。オキシシン投与後10分経過したものでは苔状線維終末内のシナプス小胞が投与後5分のものよりさらに減少した終末が多数認められた。すなわち、この時期のこの部位における大部分の終末は終末部内全体に少数のシナプス小胞が散在性に分布している形を呈するものが多かった。終末部内の含粒小胞やミトコンドリアもその数の減少がよく観察できた。また、投与後5分経過の例ではあまり認められなかったシナプス前膜および後膜の肥厚の減少がこの例ではよく認められた。すなわち、この時期では前膜も後膜も明らかにその電子密度は低下していた。さらにこの例では苔状線維終末部がいくつもの棘を取りかこむ像がほとんど観察できなかった。しかし、この時期の苔状線維終末の大部分のものが上記のような所見を呈したが、一部のものは正常例に近い像を呈するものも認められた(図10b)。次いでオキシシン投与後15分目のものでは投与後10分目のものとその微細構造を比較すると苔状線維終末部内のシナプス小胞が増加してきた。すなわち、終末部内のシナプス小胞の分布密度が高くなっていったが、正常例にみられるようなシナプス小胞が密集している終末部は比較的少なかった。また、錐体細胞の樹状突起棘を終末部が取りかこむ状態もよく観察でき、そのシナプスを構成する部の横断像においても棘の構造を認めることができた。オキシシン投与後30分経過した例ではほとんど全ての苔状線維終末内のシナプス小胞が正常例と同様に終末内に一様に密に分布していた。また、シナプス前膜や後膜も正常例と変らなかった。さらに錐体細胞の樹状突起棘と苔状線維終末との関係も正常例とほとんど変化はなかった(図10c)。オキシシン投与後1時間以後のものでは苔状線維終末内のシナプス小胞の分布状態は全く正常例と同様の所見を呈していた。また、ミトコンドリアの分布状態も、その形態も正常例と変化がなかった。さらに、樹状突起棘も形態学的に正常例と同様の構造を呈していた。オキシシン投与後のどの時間経過でえたラットの海馬領域において、歯状回の顆粒細胞、海馬の h_3-h_5 野における錐体細胞の樹状突起、および海馬領域の中の苔状線維終末以外のシナプスなどにはその微細構造は全く正常例と変化がなかった。

考 察

海馬領域（海馬と齒状回）は形態学的に特異な細胞構築を呈する部位であり、その構成にあずかる神経細胞の形態、大きさおよび配列状態により、この領域を多くの分野と層に分けることができた (Rose¹⁷⁾¹⁸⁾¹⁹⁾。すでに Schaffer,²⁰⁾ Cajal²¹⁾ 以来、Rose の分類による h_3-h_5 野にあたる領域に、渡銀像の上から小脳皮質の苔状線維に類似の構造をもつ線維が終末していることが明らかにされている。海馬領域の苔状線維は、齒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線維である。この海馬領域にみられる苔状線維終末の電子顕微鏡による微細構造に関する研究はこれまでに多数の報告がある (Hamlyn,²²⁾²³⁾ Blackstad,²⁴⁾ Niklomit,²⁵⁾ Iбата,²⁾ Otsuka ほか¹²⁾ その他)。われわれのこの研究から得た苔状線維終末の微細構造は上記の報告によるものとほとんど大差がなかった。

一方、数種のは乳類（イヌ、ネコ、ウサギ、モルモット、ラット、マウス）にアルカリ性にしたジチゾンアルコール溶液を静脈内に注射すると海馬領域の一定部位が紅染することを Maske¹⁾ がはじめて報告した。そうして、さらに Maske¹⁾ 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。つづいて Fleischhauer ほか²⁶⁾ は Maske の研究を追試し、やはり数種のは乳類で同様な所見をえた。しかし、上記の2つの研究に使用されたジチゾン法では反応物質の組織学的な局在性を知らることができなかった。その後、Timm³⁾ により開発された硫化銀法は光学顕微鏡レベルにおいて組織学的に重金属の局在を検索できるようになった。この硫化銀法を使用して海馬領域を検索した研究が、その後、多数報告された (Timm,³⁾ Mc Lardy,⁴⁾ Otsuka ほか⁵⁾ Haug,⁶⁾ 田村,⁷⁾ その他)。その結果、硫化銀法によって黒褐色に反応する物質は主として海馬の h_3-h_5 野の Stratum radiatum の Stratum pyramidale に接する帯状の領域と齒状回の Stratum multiforme に局在してもっとも強く存在することが認められた。この強陽性反応を呈する部位は齒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 (Otsuka ほか²⁷⁾)。しかし、海馬における錐体細胞

や、齒状回における顆粒細胞の細胞体にはほとんど反応物質は認められなかった。

上記の研究やわれわれの研究に使用されたジチゾン法や硫化銀法はいずれも重金属に対する組織化学的反應であって、これらの方法のみでは、その反応する物質がいかなる重金属であるかということを確認できなかった。そこで、まず Maske¹⁾ は分光計測による研究からジチゾン反応は海馬領域に存在する亜鉛と結合して発現してくるものと推測した。また、Haug⁶⁾ や Otsuka ほか¹⁴⁾ は電子顕微鏡用に改良された硫化銀法でラットとウサギの海馬領域を検索している。その結果、 h_3 , h_4 および h_5 野や齒状回の光学顕微鏡で強陽性反応を呈した部位において電子顕微鏡的に陽性反応物質の認められたのは苔状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のみ一致して、陽性物質の存在することが認められた。また、Otsuka ほか²⁸⁾ は光学顕微鏡による Zn⁶⁵ 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数の亜鉛が含まれているのが明らかにされた。さらに、Otsuka ほか¹²⁾ の電子顕微鏡による Zn⁶⁵ 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。

こ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不明な点が多い。Fleischhauer ほか²⁹⁾ は亜鉛の分布状態が Carbonhydrase の分布と、Mc Lardy⁴⁾ は酸性フォスファターゼの分布とがよく一致することから、亜鉛はこれらの酵素類と関係があるのではないかと考えている。また von Euler²⁹⁾ 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したリンゲル液を使用するとその伝達がしゃ断されると報告しているが、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に変化を起し、伝達をしゃ断したものと推測できる。このような実験結果と前述のように電子顕微鏡の組織化学やオートラジオグラフィによって亜鉛が、シナプス小胞と密接な関係があることから、Haug,³⁰⁾ Iбата と Otsuka³¹⁾³²⁾ は亜鉛はなにかこ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。

膀胱のランゲルハンス島の β 細胞に存在する亜鉛と結合し、この細胞に障害を与えて、実験的糖尿病を起させるジチゾン、アロキサン、およびオキシシ

を投与することにより海馬領域の亜鉛を含んだ領域にどのような変化を生ずるかを初めてOtsukaほか¹⁴⁾が報告している。この検索により明らかにされたことはジチゾン投与されたラットの海馬領域の亜鉛は投与後一定期間(1~3時間)の間、硫化銀法で一過性に証明できなくなり、その後、再び反応が陽性になることであった。また、アロキサンやオキシンの投与後にはジチゾン投与後に見られたような変化は認められなかった。さらにOtsukaほか¹⁵⁾らはジチゾン投与後約30分で苔状線維終末のシナプス小胞は減少しはじめ、投与後1~3時間後にはもっとも減少することを認めた。その後、4~5時間目のものでは、終末内で減少していたシナプス小胞の分布状態もほとんど正常例に近い像を呈していたと報告している。本研究においてもジチゾン投与後にみられる組織化学的な亜鉛の分布状態や電子顕微鏡による微細構造の変化などの所見はOtsukaほか¹⁵⁾田村⁷⁾らの研究結果とよく一致していた。

アロキサン投与後のラットの海馬領域の組織化学的検索による亜鉛の分布状態はOtsukaほか¹⁴⁾らにより観察されているが、その結果は、本研究と同様にほとんど変化が認められなかった。したがってその微細構造もほとんど正常とは変らなかった。

オキシン投与後の海馬領域の亜鉛の分布状態は正常例とほとんど変化ないとこれまで考えられてきたが(Otsukaほか¹⁴⁾)、本研究ではオキシン投与後短期間の間に硫化銀法や電子顕微鏡により海馬領域に変化が生じていることが明らかにされた。すなわち、投与後5分から硫化銀法により、海馬領域の強陽性反応部位が反応が低下しはじめ、10分後には、その反応が消失し、15分後にはまた回復しはじめ、投与後30分で正常例に近い状態になった。苔状線維終末内のシナプス小胞も、投与5分後からその数の減少が認められるようになり、10分後には小胞の数はきわめて少なくなった。しかし、15分を過ぎると再び終末内のシナプス小胞は増加し、30分後には終末内におけるシナプス小胞の分布状態は正常例に近い所見を呈した。このように、オキシン投与後短期間のうちに苔状線維終末にジチゾン投与例と極めて類似した変化を起していることが本研究により認められた。

上記の検索からもわかるように、ジチゾンやオキシン投与後における苔状線維終末の亜鉛の減少とシナプス小胞の数の減少はいずれも一過性的変化であって、しかも、苔状線維終末部だけに選択的に変化を起し、他の組織には全く変化を与えないというこ

とは重要なことである。また、ジチゾン投与後の中枢神経系の変化についてはFleischhauerほか²⁾らは、長期投与を行っても光顕的にはほとんど変化をみないと報告している。ジチゾンやオキシンがいかなる作用機序でもって苔状線維終末部のみに変化を与えるのかということは明らかでない。しかし、上記の所見からその作用機序を推察すると、苔状線維終末部のシナプス小胞内には亜鉛と結合した神経伝達物質が含まれており、その亜鉛にジチゾンやオキシンが作用して、一過性にこの伝達物質の減少を来たし、シナプス小胞の減少という微細構造の変化を起してくるのではないかと考えられるが今後さらにこれらの作用機序を明らかにするためには生理学的あるいは生化学的実験を加味した研究が必要である。

結 語

ラットにジチゾン、アロキサン、オキシンを投与した後、一定時間ごとに海馬領域を硫化銀法で検索した。また、同時間にえた海馬領域を電子顕微鏡でも観察した。

正常例の海馬領域において硫化銀法で強陽性反応を呈する部位は海馬のh₃、h₄およびh₅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)に一致していた。

一方、電子顕微鏡で正常例の苔状線維終末をみると、大きな終末内にシナプス小胞が全体に密集している像が認められた。また、その終末は樹状突起棘に終るものが多かった。

ジチゾンを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、硫化銀法で一過性に反応を呈しなくなった。また、この時期に苔状線維終末内のシナプス小胞が減少し、棘も平滑化し、認めにくくなった。

アロキサンを投与した場合はラットの海馬領域の亜鉛の減少も、苔状線維終末内のシナプス小胞の減少も認められなかった。

オキシン投与例では投与後5分から15分の間に海馬領域の亜鉛の減少と苔状線維終末の中のシナプス小胞が一過性に減少する所見をえた。

上記のことから苔状線維終末内の亜鉛とシナプス小胞との関係とジチゾン、アロキサン、オキシンなどの亜鉛やシナプス小胞に対する作用機序などが討議された。

稿を終るにあたり、大塚長康教授の御指導と御援助に深甚の謝意を表します。

文 献

- 1) Maske, H.: Über den topochemischen Nachweis von Zink in Ammonshorn verschiedener Säugtiere. *Naturwissenschaften*, **42**, 424, 1955.
- 2) Fleischhauer, K. und Ohnesorge, F.-K.: Zur Pharmakologie des Dithizone. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Exp. Path. Pharmac.*, **235**, 63, 1958.
- 3) Timm, F.: Zur Histochemie des Ammonshorngebietes. *Z. Zellforsch.*, **48**, 548, 1958.
- 4) McLardy, T.: Zinc enzymes and the hippocampal mossy fiber system. *Nature*, **194**, 300, 1962.
- 5) Otsuka, N. and Umetani, M.: Chemocytoarchitectonics of ammon's formation. *Proc. Jap. Histochem. Ass.*, **3**, 231, 1962.
- 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, 1973.
- 7) 田村 仁: 海馬領域における亜鉛の組織化学的研究 岡山医会誌 **89**, 551, 1977.
- 8) 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.
- 9) Ibata, Y.: Electron microscopy of the hippocampal formation of the rabbit. *J. f. Hirnforsch.* **10**, 451, 1968.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) Otsuka, N. and Ibata, Y.: Über die quantitativen Veränderungen des Zinkgehaltes in der Hippocampusformation nach der Dithizon-Zufuhr. *Arch. Histol. Jap.*, **27**, 419, 1966.
- 14) Otsuka, N. and Ibata, Y.: Über die Veränderungen des Zinkgehaltes in der Hippocampusformation der Ratte nach Dithizon-, Alloxan- und Oxinzufuhr. *Histochemie*, **12**, 357, 1968.
- 15) 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.
- 16) 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.
- 17) Rose, M.: Der Allocortex bei Menschen und Tier. I. Teil. *J. Psychol. Neurol.*, **34**, 1, 1926.
- 18) Rose, M.: Die sog. Riechrinde beim Menschen und beim Affen. II. Teil des "Allocortex bei Tier und Menschen" *J. Psychol. Neurol.*, **34**, 262, 1927.
- 19) Rose, M.: Cytoarchitektonischer Atlas der Gehirnrinde des Kaninchens. *J. Psychol. Neurol.*, **43**, 354, 1931.
- 20) Schaffer, K.: Beitrag zur Histologie der Ammonshornformation. *Arch. Mikr. Anat.*, **39**, 611, 1892.
- 21) Cajal, S.R.Y.: Beiträge zur feineren Anatomie des großen Hirns. I. Über die feinere Struktur des Ammonshornes. *Z. Wiss. Zool.*, **56**, 645, 1893.
- 22) Hamlyn, L.H.: Electron microscopy of mossy fiber endings in Ammon's Horn. *Nature* **190**,

- 645, 1961.
- 23) Hamlyn, L. H.: The fine structure of the mossy fiber endings in the hippocampus of the rabbit. *J. Anat.*, **96**, 112, 1962.
 - 24) Blackstad, T. W. and Kjaerheim, Å.: Special axo-dendritic synapses in the hippocampal cortex. Electron and light microscopic studies on the layer of mossy fibers. *J. Comp. Neurol.*, **117**, 133, 1961.
 - 25) Niklowitz, W.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen am Ammonshorn. III. Vergleichende phasenkontrast- und elektronmikroskopische Darstellung der Moosfaserschicht. *Z. Zellforsch.*, **75**, 485, 1966.
 - 26) Fleischhauer, K. und Horstmann, E.: Intravitale Dithizonfärbung homologer Felder der Ammonsformation von Säugern. *Z. Zellforsch.*, **46**, 598, 1957.
 - 27) 大塚長康, 朝子恭, 片岡昭: 各種ほ乳類の海馬領域における亜鉛について *解剖誌*, **40**, 267, 1965.
 - 28) Otsuka, N. and Kawamoto, M.: Histochemische und autoradiographische Untersuchungen der Hippocampusformation der Maus. *Histochemie*, **6**, 267, 1967.
 - 29) Euler, C. von.: On the significance of the high zinc content in the hippocampal formation. In *physiologie de L'hippocampe*. Edition du Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, 1962.
 - 30) Haug, F. M. S.: Effect of intravital dithizone treatment of the Timm sulfide silver pattern of rat brain. *Histochemie*, **27**, 290, 1971.

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.

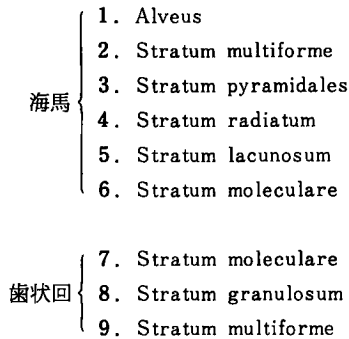


図2 海馬領域の前頭断像.

ヘマトキシリン・エオジン染色法. $\times 30$

図3 海馬領域の前頭断像. 硫化銀法 $\times 30$ 図4 海馬領域における苔状線維終末 (E) の正常像. SP: 錐体細胞の樹状突起棘 $\times 27,000$

図5 ジチゾン投与後における海馬領域の硫化銀法による像.

a : ジチゾン投与後2時間目. 反応は陰性. $\times 30$

b : ジチゾン投与後4時間目. 正常像と同部位が反応陽性. $\times 30$

図6 ジチゾン投与後における苔状線維終末部の電顕像.

a : ジチゾン投与後15分目. 終末部 (E) 内に局所的にシナプス小胞が密集している像が認められる. $\times 29,000$

b : ジチゾン投与後1時間目. 苔状線維終末 (E) 内のシナプス小胞が減少している. $\times 20,000$

c : ジチゾン投与後5時間目. 苔状線維終末 (E) 内のシナプス小胞の分布状態が正常例と同程度まで回復している. $\times 23,000$

図7 アロキサン投与後1時間目の硫化銀法による像. $\times 30$ 図8 アロキサン投与後2時間目の苔状線維終末像 (E). $\times 27,000$ 図9 オキシシン投与後における海馬領域の硫化銀法による像. $\times 30$

a : オキシシン投与後10分目. 反応はほとんど陰性.

b : オキシシン投与後30分目. 反応は正常例と変らない陽性反応を呈す.

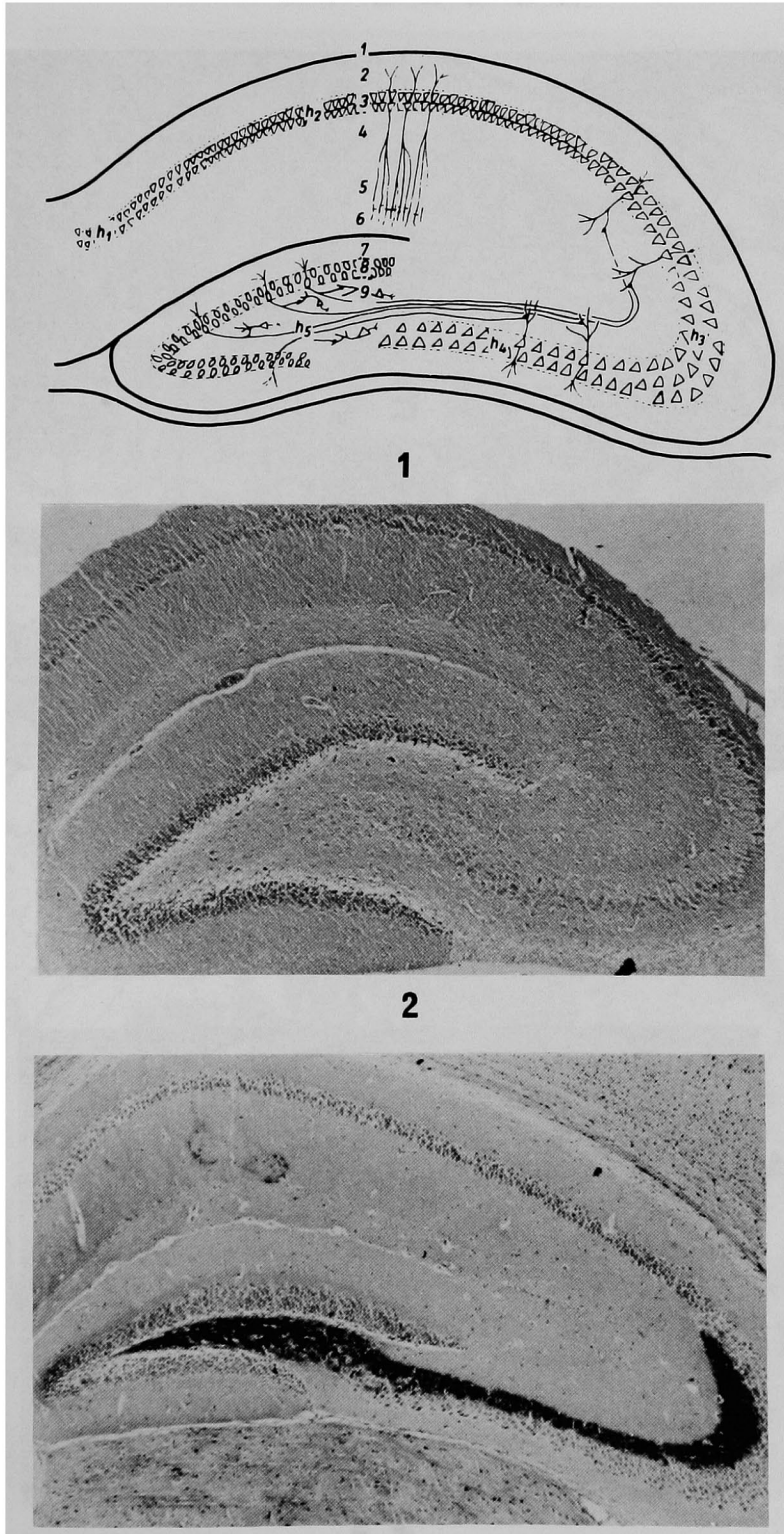
図10 オキシシン投与後における海馬領域の電顕像.

a : オキシシン投与後5分目. 苔状線維終末 (E) 内にシナプス小胞が散在性に集合している. $\times 23,000$

b : オキシシン投与後10分目. 苔状線維終末 (E) 内に少数のシナプス小胞が散在性に分布している. $\times 24,000$

c : オキシシン投与後30分目. 苔状線維終末 (E) 内のシナプス小胞の分布状態は正常例に近い像を呈している. $\times 30,000$

岡野晴光論文附図

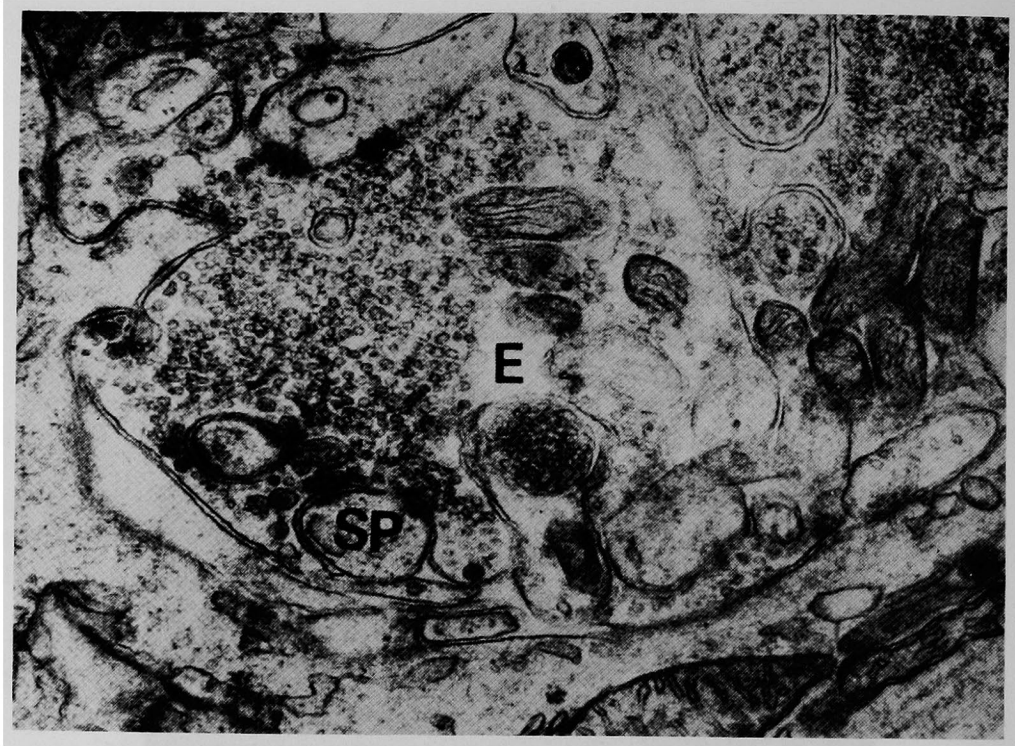


1

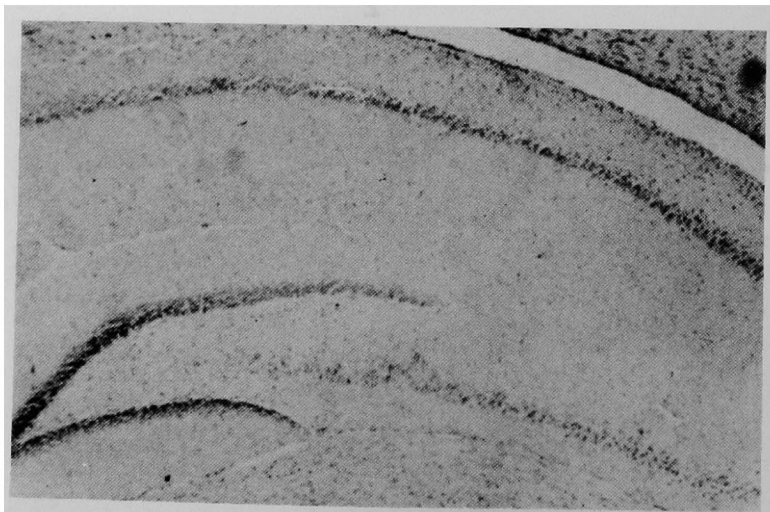
2

3

岡野晴光論文附圖

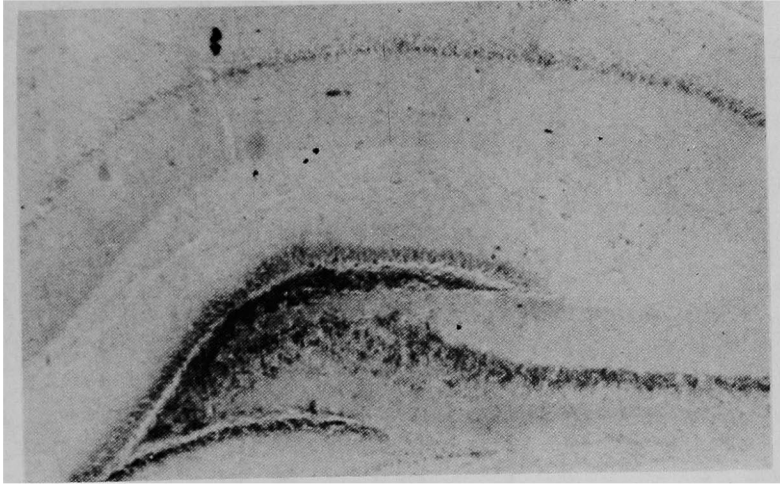


4

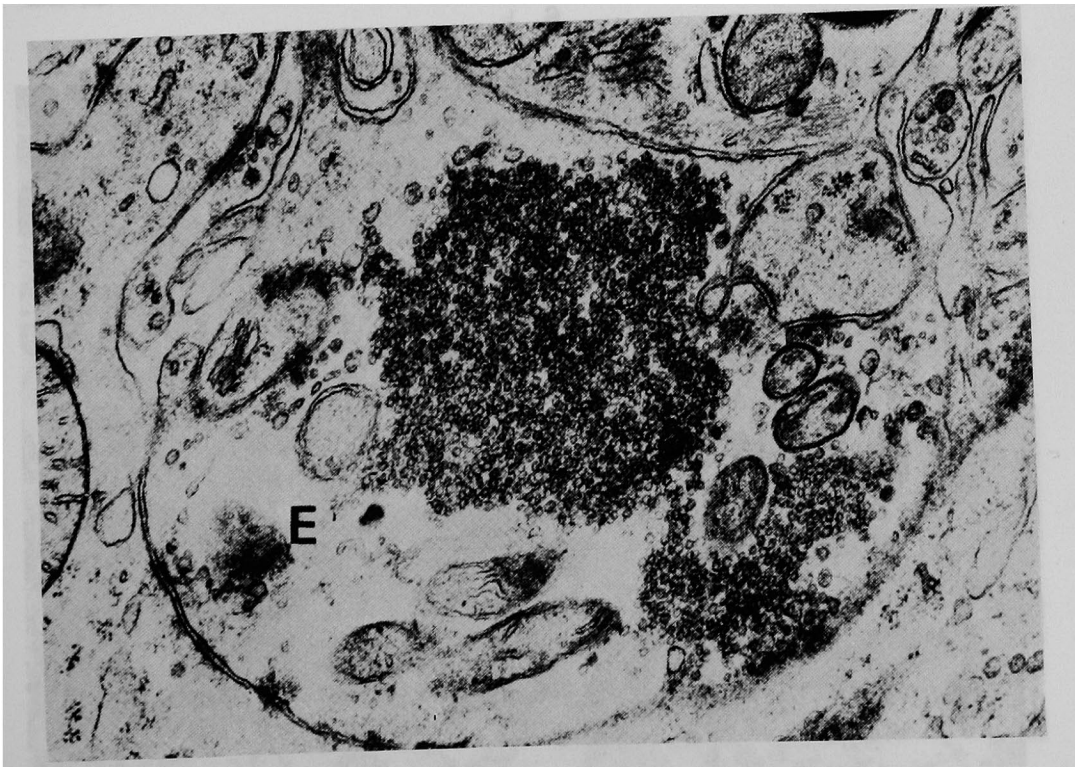


5 a

岡野晴光論文附図

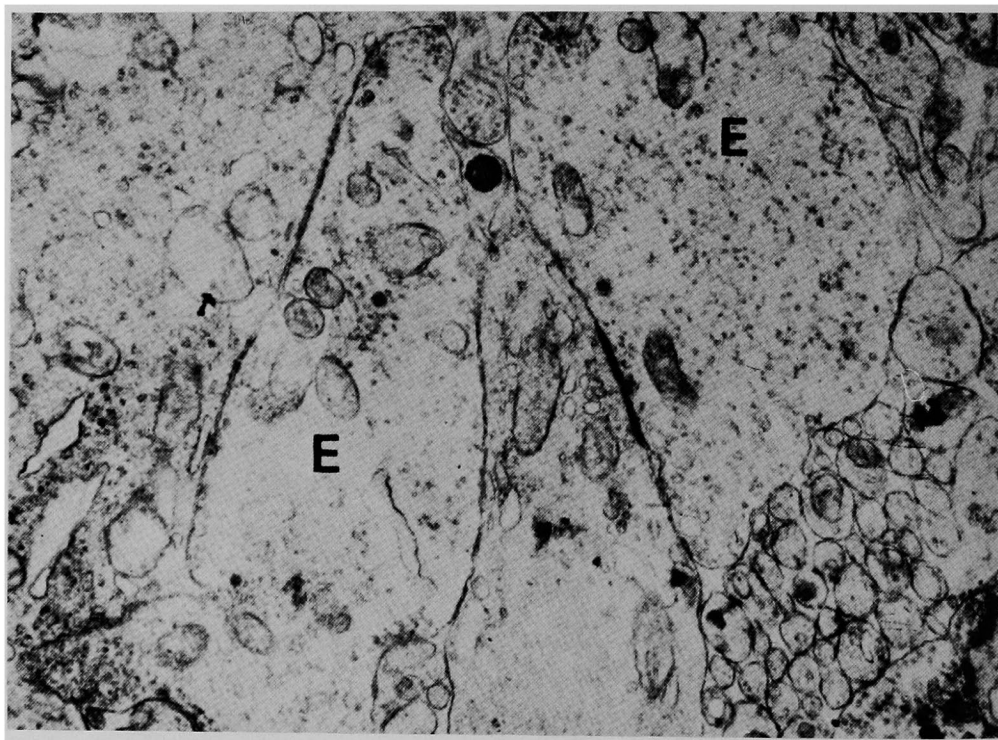


5 b

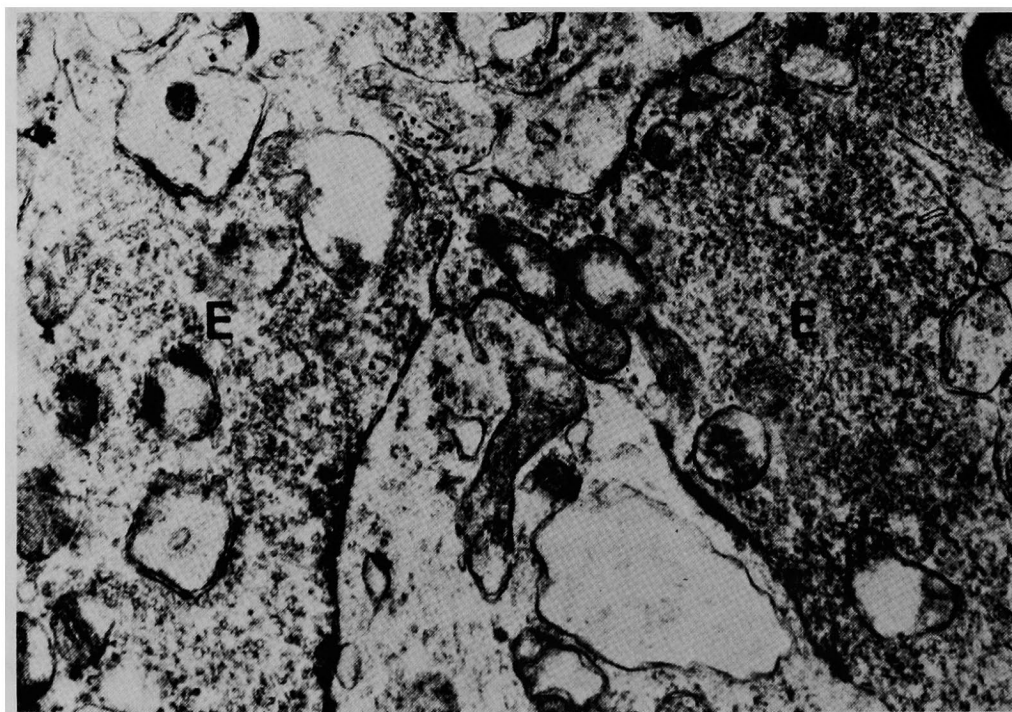


6 a

岡野晴光論文附圖

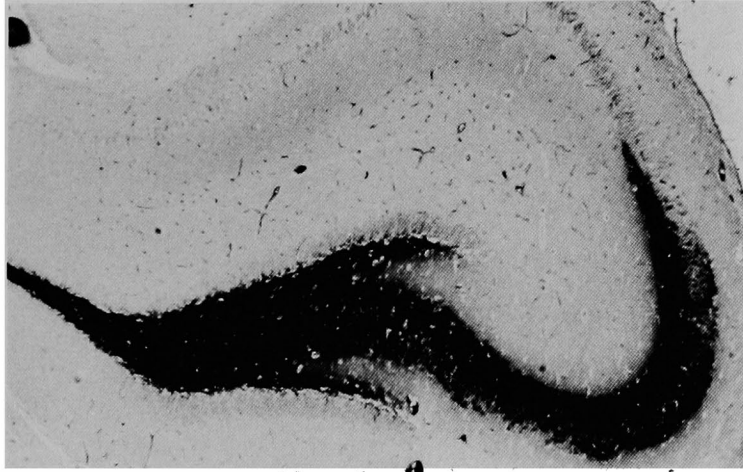


6 b



6 c

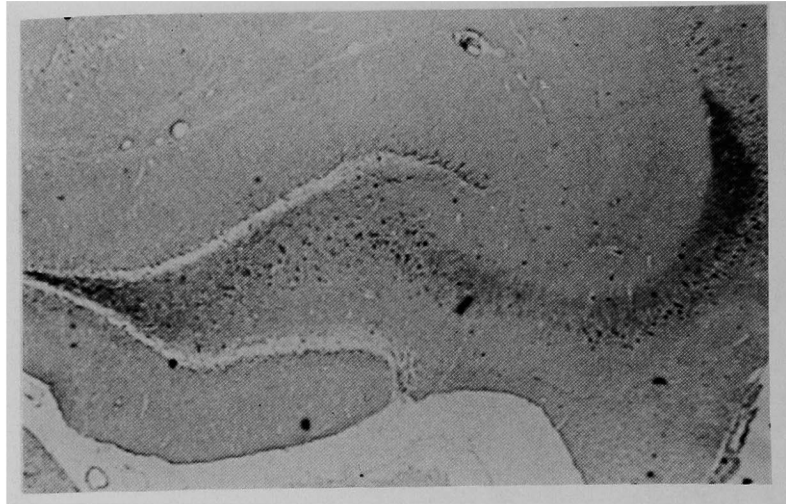
岡野晴光論文附図



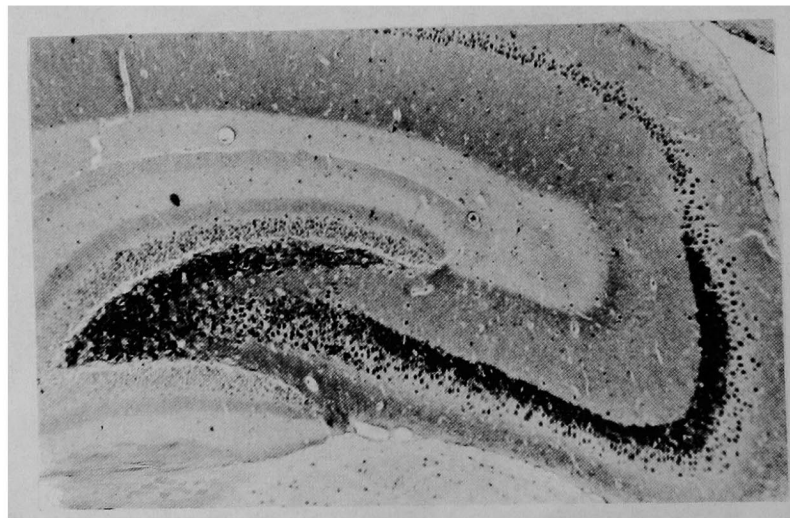
7



8

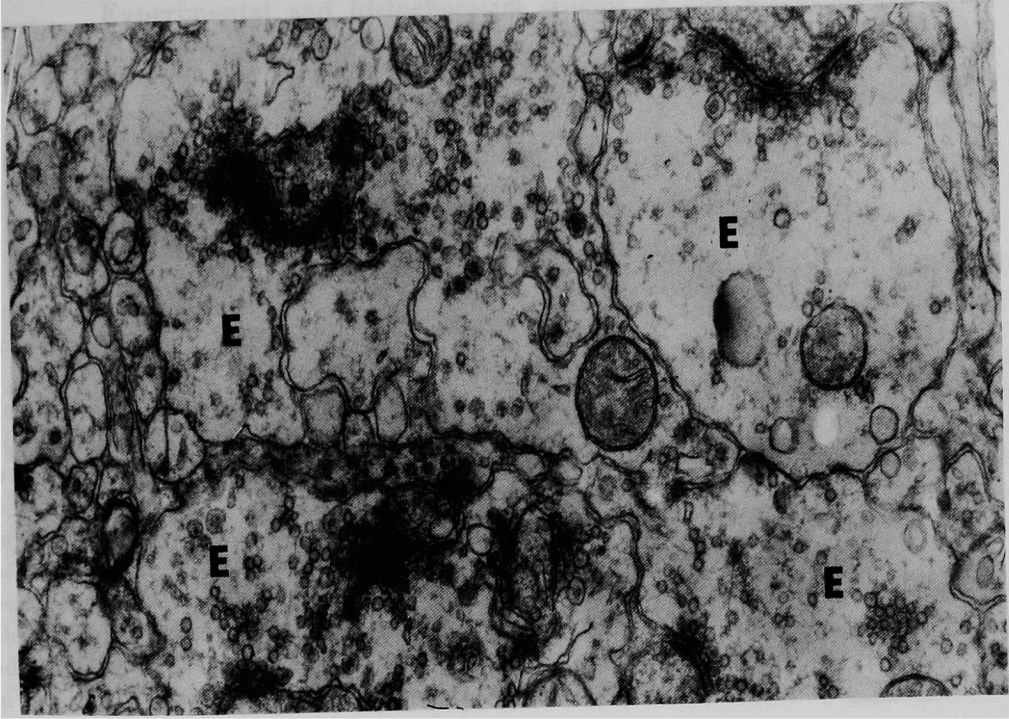


9 a

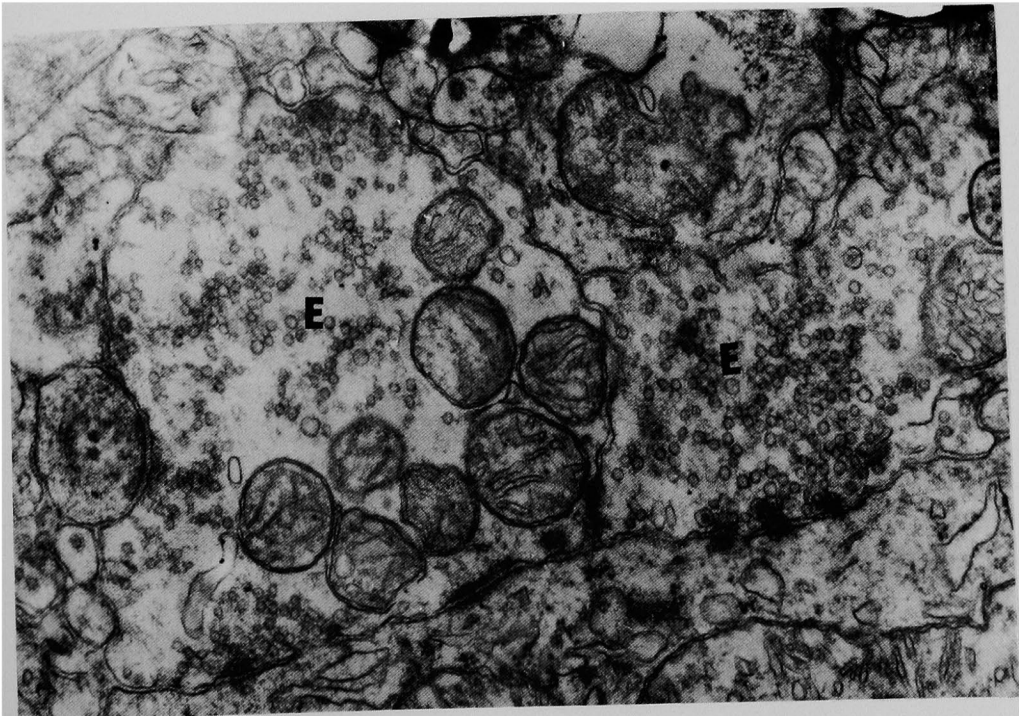


9 b

岡野晴光論文附图



10 a



10 b

岡野晴光論文附圖



10 c

**Experimental and histochemical studies of the hippocampal
formation**

by Harumitsu OKANO

Department of Anatomy, Okayama University Medical School

(Director :Prof. Nagayasu Otsuka)

The hippocampal formation of rat brain was studied by the silver sulfide method and was also observed by electron microscopy after the administration of dithizone, alloxan and oxine, respectively.

In normal rat, the reaction products were found in the mossy fibers of granular cells of gyrus dentatus which ended to the dendrites of pyramidal cells present in h3, h4 and h5 area of the hippocampus. By electron microscopic observation, the mossy fiber endings of normal brain were filled with synaptic vesicles, and most of them ended to the dendritic spines of pyramidal cells. Zinc shown by silver sulfide method were not detected in the hippocampal formation from 1 to 3 hours after the administration of dithizone, and at the same time, the number of synaptic vesicles of the mossy fiber endings was decreased and the dendritic spines became to be smooth. Alloxan did not any effects of the amount of zinc and the number of synaptic vesicles in mossy fibers, while both of them decreased temporarily at 5 to 15 minutes after the administration of oxine. From these results, the correlation between zinc and synaptic vesicles in mossy fibers, and the mechanism of these drugs' action to zinc content and synaptic vesicles were discussed.