Original

マイクロスライス切片アリザリン染色による小脳石灰化の検討 —チオフェン中毒ラット—

森 文秋, 高屋豪瑩

弘前大学医学部附属脳・神経疾患研究施設神経病理部門

CEREBELLAR CALCIFICATION DETECTED BY ALIZARIN RED S STAINING IN THIOPHENE-EXPOSED RATS

Fumiaki Mori and Goyo Koya

Department of Neuropathology, Institute for Neuroscience, Hirosaki University School of Medicine

Abstract: Repeated injections of thiophene induce vasogenic cerebellar degeneration and local calcium deposits in the cerebellar granule cell layer in rats. Using light and electron microscopy, we investigated the formation of cerebellar calcification between 1 hour and 40 days after thiophene administration. Alizarin red S staining was used on microslizer sections to demonstrate early pathological calcium deposition.

In the cerebellum of rats that developed truncal ataxia and/or seizure,

1) pathological calcium deposits appeared in the granule cell layer and the deep cerebellar nucleus from the early stage,

2) the calcium deposits were lamellated like the annual growth rings of trees in the granule cell layer but had disappeared in the deep cerebellar nucleus at 40 days after thiophene administration, and

3) ultrastructurally, needle-like crystal deposits of calcium were found in the postsynaptic endings of the cerebellar glomeruli, perikarya of granule cells, axoplasm of myelinated fibers and presynaptic endings of deep cerebellar nuclei. It is suggested that the cerebellar calcification induced by thiophene is initiated in granule cells through an excitotoxic mechanism and/or disorder of calcium metabolism. (*J Toxicol Pathol* 8: 391~399, 1995)

Key words: Cerebellar calcification, Synaptic ending, Thiophene, Alizarin red S

はじめに

齧歯類の脳組織での石灰化の発生母地は、血管由来と非血管由来とに区分されている。血管由来には自然発生性の加齢性の石灰化¹⁻³が、非血管由来には、脊髄損傷⁴やラットの線条体や黒質などへの興奮性アミノ酸の投与^{5,6}後の石灰化などが報告されている。

実験的メチル水銀中毒症ラットが長期間生存し

ていると小脳に石灰化を来す⁷⁻⁹。チオフェンは、メチル水銀中毒症と類似する小脳顆粒細胞変性をおこし、長期生存したラットの小脳には石灰化がみられる¹⁰。しかしながら、実験的メチル水銀並びにチオフェン中毒症ラットのいずれでも、急性期病変から石灰化に至る過程については検討されておらず、石灰化が血管由来なのか神経組織由来なのか明確ではない。

チオフェン中毒ラットで、これまで、躯幹振動、痙攣などの症状とともに、血管障害性小脳変性、小脳核・赤核・赤核脊髄路の変性、小脳および大脳の特定位点における Fos 蛋白発現をきたすことなどを報告してきた¹¹⁻¹³。以上の所見は、チオフェンによる小脳顆粒細胞変性過程の中で興奮毒性が

Accepted for publication: April 23, 1995

Mailing address: Fumiaki Mori, Department of Neuropathology, Institute for Neuroscience, Hirosaki University School of Medicine, 5 Zaifu-cho, Hirosaki-shi, Aomori-ken, 036, Japan.

関与することを示しているものと考えられる。近年、 Ca^{2+} の過剰や欠乏による細胞毒性が注目され^{14,15}、生理的状態のカルシウムイオンの動態をみるのに、Oxalate pyroantimonate 法や蛍光色素を用いる方法が採用されている。 Ca^{2+} からカルシウム塩結晶に至る過程について、形態学的に検索した研究は少なく⁵、また、それらの方法は、組織切片中のカルシウム塩の観察には適切といえない。一方、石灰化の組織学的証明である von Kossa 法のような銀置換法では、太陽光を必要とするために、反応産物と人工産物の鑑別が困難であるという欠点がある。今回採用した Alizarin red S は、アントラキノン系ラック性色素で、カルシウムに直接結合するとされている¹⁶。

今回は、チオフェンの継続投与によって軀幹振動ないし痙攣発作などを呈したラットの小脳顆粒細胞層に限局してみられる石灰化に着目し、小脳病変形成からカルシウム塩結晶に至る過程を形態学的に見いだすことにつとめた。

材料と方法

当施設で継代維持してきた自然発症高血圧ラット SHR・SR、雌、150 日齢の 91 頭にチオフェン 0.15 ml を 1 日 1 回、1-14 回にわたり継続投与した。石灰化までの最短期間の確認のために実施したチオフェン投与 1-4 回の 27 頭では、急激な体重減少や Grooming はみられたが、軀幹振動、間代性痙攣発作はみられなかった。5 回以上の 64 頭は、症状の出現までチオフェン投与を続け、急激な体重減少、Grooming、軀幹振動、間代性痙攣発作などの症状を確認できた。投与終了後 1 時間から 40 日に、経心的に 4% パラホルムアルデヒドで灌流固定し、1 時間後に、脳および脊髄を取り出し、同一固定液に 1 晩以上浸漬固定した。

小脳の左側の半球をマイクロスライサー (DTK-3000, 堂坂 EM, 京都) を用いて直接、50 μm の厚さに薄切し、ゼラチン塗布スライドガラスに貼り付け、37°C の乾燥機内で乾燥させた後、Alizarin Red S (pH 6.4) 染色¹⁷を行った。小脳半球各小葉における石灰化の点数化 (Calcification Score) マイクロスライサー薄切の小脳半球をア

リザリンにて染色した標本を、顕微鏡写真撮影装置 (NIKON) を用いて、ネガカラーフィルム (FUJI COLOR) に対物レンズ 2 倍、接眼レンズ 2.5 倍で撮影し、さらに、3 倍に引き延ばして (最終 15 倍)、カラー印画紙に焼き付けた。この写真と標本の顕微鏡観察から、各小葉のアリザリン陽性顆粒の分布を点数化した。小葉の分類は、Voogd (1985) ら¹⁸ の記載に従い、さらに、各小葉を、先端から、山頂、山腹、谷部に三等分して、各区分内のアリザリン陽性顆粒の程度により点数化した。すなわち 0.5: わずかのアリザリン陽性顆粒の散在が、顕微鏡下で確認できるが、写真では、確認できない。1: 少数のアリザリン陽性顆粒の散在が写真下で観察できる。2: アリザリン陽性顆粒が、顆粒細胞層を中心に瀰漫性に密集して出現している。3: アリザリン陽性の粗大顆粒が顆粒細胞層内に出現し、粗大顆粒の間に隙間がある。囊胞性病変を形成していたり、標本作製時に組織が欠落した部分は、点数をつけず、検討から除外した。

中枢神経系および一般臓器については、既報¹³ のとおり切り出して、アルコール脱水、パラフィン包埋後、4 μm の厚さで薄切した後、中枢神経系については、HE, KB, PAS, GFAP の各染色を、小脳の右側の虫部と半球にはさらにアリザリン染色を施した。一般臓器については HE, PAS の各染色を施し鏡検した。

電顕的検索: マイクロスライサー切片の小脳半球の Alizarin Red S 染色で石灰化を確認できた例の残存した小脳部分 (厚さ約 1 mm) を、3% グルタルアルデヒドで固定した。投与終了から 40 日以上経過した例では EDTA 脱灰法¹⁹ で脱灰した後、また投与終了から 40 日未満の例では脱灰せずに、 OsO_4 で後固定し、樹脂包埋した。準超薄切標本を観察後、適切な部分を選択し、超薄切したのち、電顕観察を行った。

結 果

[光顕的検索]

中枢神経系および一般臓器の病変は、これまでの報告¹¹⁻¹³ とほぼ同様であった。検索した 91 頭中、顆粒細胞変性などの変性が 63 頭にみられた。最初

の小脳顆粒細胞変性は3回投与終了後2日からみられた。投与終了直後の急性期には、小脳顆粒細胞層の水腫および顆粒細胞の変性、下丘および大脳皮質の孤立性神経細胞壊死、小脳、下丘、大脳の病変部位にほぼ一致して神経網におけるPAS

陽性微細顆粒の出現、肝臓の小葉中心性肝細胞壊死などがみられた。10日以上経過した例では、小脳以外の病変は、若干の反応性変化を残して、ほとんど修復していた。投与回数による相違は顕著ではなかった。小脳では、顆粒細胞の変性脱落、ト

Fig. 1. Rostral part of cerebellar hemisphere. Microslizer section ($50\text{ }\mu\text{m}$ -thickness). Alizarin red S stain. Bar (A-C)= $250\text{ }\mu\text{m}$.

A. 1 hour after thiophene administration (6 times). A few granules (arrowheads) are scattered in granule cell layer of the hillside of lobules.

B. 10 days after thiophene administration (6 times). Numerous fine granules (arrowheads) diffusely distributed in the granule cell layer of the hillside and valley of lobules. Several fine granules are also scattered in the deep cerebellar nucleus encircled by a dashed line.

C. 40 days after thiophene administration (6 times). Many fine granules (arrowheads) are diffusely distributed in the granule cell layer of the summit of lobules and several larger granules (arrows) are seen in the hillside and valley.

Fig. 2. Changes of the calcification score in each lobule of cerebellar hemispheres.

Fig. 3. A cerebellar glomerulus. Two days after thiophene administration (6 times). Degenerating dendritic processes (postsynapse) contain condensed mitochondria and a clump of dense crystal material (arrow). Bar=500 nm.
Inset. Higher magnification of the clump of dense crystal material. Bar=200 nm.

ルペドー形成、グリオースシス、嚢胞形成などがみられた。パラフィン切片のHE染色標本では、石灰化は、投与終了後、40日のラットの小脳顆粒細胞層（嚢胞性病変形成例では、神経組織が脱落していない部分および嚢胞病巣周囲の顆粒細胞層）内に確認できた。明らかな石灰小体は、これまでの報告と一致し、ヘマトキシリンに濃染し、濃青色で、最大径が2-25 μm 以上の、大小不同、不整形ないし類円形で、内部には染色性の濃淡による年輪状の層構造を示した。まれに、中心部分に核崩壊した顆粒細胞を思わせる変性産物がみられた。この石灰小体とは別に、ヘマトキシリンに淡

染する最大径1-2 μm の類円形の顆粒状小体が、病巣内にみられたKB染色でも、石灰小体は、投与終了後、40日のラットの小脳顆粒細胞層内に確認でき、濃青色に染色されていた。石灰小体は、GFAP陰性であったが、対比染色のヘマトキシリンに淡く染色された。顆粒細胞変性部分では、GFAP陽性のグリア突起の増生があり、しばしば、石灰小体を取り囲む像がみられた。

今回採用した石灰化染色法では、顆粒細胞変性のみられた63頭の中で、最も高頻度に石灰化を検出できたのは、アイクロスライサー切片のアリザリン染色標本（59頭、93.7%）でついでパラフィン

Fig. 4. Degenerating granule cell layer 10 days after thiophene administration (6 times).

- A. A few granule cells show karyolysis and one of them contains four clumps of dense crystal material in the condensed cytoplasm. A slightly swollen granule cell (left) and proliferating astrocytic processes (arrowhead) with glial fibrils can be seen. Bar=2 μm .
 B. Higher magnification of the squared area of A. Bar=200 nm.

切片のアリザリン染色標本 (18 頭, 28.6%), パラフィン切片の HE 染色標本 (6 頭, 9.5%) であった。顆粒細胞変性のみられなかった 28 頭にはどの方法でも石灰化を見いだすことはできなかった。

マイクロスライス切片のアリザリン染色で陽性を示したラット (59 頭) の染色性は、投与回数および投与後期間により違いがみられた (Fig. 1)。投与回数 3 回の 2 日後 (2 頭), 4 回 7 日後 (2 頭), 5, 6 回の投与後 1 日未満 (15 頭) では、数個の赤橙色の微細顆粒が、吻側の 2-5 小葉あるいは単小葉の顆粒細胞層内に散見された (Fig. 1A, 2)。5, 6 回の 2-30 日後 (13 頭), 7 回以上の 1-30 日後 (19 頭) では、吻側の 2-5 小葉, 単小葉, さらに、尾側の第 1, 2 脚, 正中旁小葉において、顆粒細胞層を主に、プルキンエ細胞層, 分子層, 白質並びに深部小脳核で、ほぼ瀰漫性に多数の赤橙色の微細顆粒が染色されていた (Fig. 1B)。各小葉では、先端部の顆粒細胞層よりも、小脳核に近い深部の方でより多数の顆粒がみられた。6 回以上の 40 日後 (8 頭) では、各小葉のより先端部でも多数のアリザリン染色顆粒がみられた (Fig. 1C)。各小葉の深部では、アリザリン染色顆粒の数は減るものの、その大きさが増した。小脳核では、アリザリン染色顆粒はみられなかった。

以上の所見は、各小葉ごとのアリザリン染色性の点数化 (Calcification score) により裏付けられ

た。石灰化のみられた小脳では、2-3, 4-5 の吻側の小葉で、スコアが高かった。投与後期間別では、1-6 日に増加し始め、10-30 日でピークとなり、40 日では、若干下がった (Fig. 2)。いずれの投与後期間でも、山腹ないし谷部でアリザリン染色性の点数が高かった。

パラフィン切片のアリザリン染色の観察できる石灰化は、5 回投与終了後 18 時間の例が最短期間で、病変部分の顆粒細胞層の神経網, 白質にみられ、淡い橙色で、うっすらと染まっていた。5 回投与以上で、投与終了後 7 日以上経過した例では、顆粒細胞層を中心に、プルキンエ細胞層, 分子層および白質にかけて、赤橙色に染色された微細顆粒および小体が連なっていた。小脳半球の方で、虫部よりも、多くの石灰小体があった。

[電顕的検索]

6 回投与の終了 2 日以降の例では、顆粒細胞は胞体内の空胞が大きくなって淡明化したり、核濃縮ないし崩壊し、細胞体の電子密度が高くなり、濃縮していた。個々の細胞内小器官の像ははっきりしなかった。また、ライソゾームなどは殆どなかった。小脳糸球の後シナプス終末 (Fig. 3) および変性し膨化した有髄線維の中に、針状結晶の集積があった。

投与終了 10 日 (投与開始後 15 日) で、核融解し濃縮した顆粒細胞の胞体内 (Fig. 4) および後

Fig. 5. A deep cerebellar nucleus 10 days after thiophene administration (6 times).

- A. A condensed presynaptic ending attaches to a slightly swollen neuronal cell body. Bar=2 μ m.
- B. Higher magnification of the squared area of A. The ending contains a clump of needle-like material. Bar=200 nm.

Fig. 6. Cerebellar granule cell layer 30 days (A) and 40 days (B) after thiophene administration (6 times). Bar (A & B)=2 μ m.

A. A degenerating granule cell with karyolytic nucleus, several clumps of dense crystal material, and condensed cytoplasm is surrounded by a membranous thin layer.

B. A concentric lamellated body-like annual growth rings of trees. Remnants of a degenerated granule cell are surrounded by several layers of fibrillar materials. Glial processes with proliferating glial fibrils surround this deposition.

シナプス終末内に球状のミトコンドリア様小体表面に針状結晶の集積があった。針状線維の間には、電子密度の低い均一性の物質がみられた。アリザリン染色で、微細顆粒の沈着であった小脳核では、神経細胞の胞体に接合する前シナプス終末に針状結晶の集積がみられた (Fig. 5)。

投与終了から 40 日経過した例では、EDTA 脱灰が必要であった。核融解し濃縮した細胞体の顆粒細胞を中心に、膜状構造が包囲したり (Fig. 6A)、微細針状結晶が同心円状に層盤構造をとって包囲する像がみられた (Fig. 6B)。この構造は、周囲をグリア細線維に富むグリア細胞に取り囲まれていた。この時期の例の小脳核では、神経細胞の胞体に接合する前シナプス終末に針状結晶の集積はなかった。

考 察

本研究は、躯幹振動や痙攣様発作などの症状のあったチオフェン中毒ラットの変性小脳内では、1) 病変形成の早期に、マイクロスライス切片のアリザリン染色で染まるカルシウム塩の形成があること、2) カルシウム塩形成が持続的で次第に大きくなっていく部位 (顆粒細胞層) とカルシウム

塩形成が一過性に消失する部位 (特に深部小脳核) とに分けられること、3) 2) の変化は電顕的に、顆粒細胞層では、小脳糸球の後シナプス終末、有髄線維内、顆粒細胞の細胞体内に、小脳核では、前シナプス終末内に針状結晶集積がみられること、4) チオフェン中毒時にみられる石灰化は、血管にはみられず、小脳顆粒細胞 (神経細胞) にみられること、などを示した。

病理組織検査で石灰化を検出するには、von Kossa 法が繁用され、実験的脊髄損傷で早期の石灰化を追跡した Balentine (1977)⁴ も、この方法で、損傷 30 分後に石灰化を見だしている。しかし、この von Kossa 法は、太陽光を用いリン酸基や炭酸基に銀を結合させるため、中枢神経系ではしばしば人工産物が生じやすく不安定要素が多いことから、今回は、炭酸カルシウムやシュウ酸カルシウムなどを検出するアリザリン染色を採用した。さらにマイクロスライサー切片のアリザリン染色は、パラフィン切片のそれと比べ、はるかに石灰化を検出する感度が高かった。

アリザリン染色は、パラフィン切片の中で、完成された石灰化を証明できることを、Dahl (1952)¹⁷ によって推奨されたが、その後 McGee-Russel (1957)¹⁶ が、染色時の pH によって染色性

に違いのあることを指摘している。しかし、いずれの報告も、灌流固定が行われていない材料を、ホルマリンないしホルマリナルコールを用いて浸漬固定を行い、その後パラフィン切片にこの染色を行っている。我々は、4% PFA による灌流固定を行った例に、マイクロスライス切片、pH6.4 の染色液を使用し、痙攣のみられなかったチオフェン 3 回投与 2 日後の早期に石灰化を見いだしている。ラットの黒質へのイボテン酸の単回投与後の石灰化を検索した Nitsch (1992)⁶ は、Dahl (1952)¹⁷ の方法に準拠して、同様の切片を用いて、アリザリン染色を行い投与後 4 日目で石灰化を検出している。彼らとは投与薬物および方法は異なるが、神経組織の傷害後かなり早期に石灰化が出現するという点で、我々の結果と同様であった。マイクロスライス切片のアリザリン染色は、カルシウム塩に対する特異性および感度が非常に高いことを示している。

電顕的に観察された顆粒細胞胞体内の針状結晶の集積は、Herndon (1968)¹⁰ が hydroxyapatite として報告した構造物と同様であったが、それ以外の糸球の後シナプス終末や小脳核での石灰化についての記載はない。石灰化としての針状結晶は、ラットの線条体や黒質への興奮性アミノ酸投与でみられた軸索や樹状突起終末にみられる石灰化^{5,6} と同様に、興奮性に基づく可能性を示唆している。躯幹振動や痙攣を呈したチオフェン中毒ラットでは、小脳内に血管障害性病巣形成¹¹、小脳核・赤核・赤核脊髄路の変性並びに Fos 蛋白の発現¹³ がみられている。特に、Fos 蛋白は、さまざまな物理化学的刺激によって、神経細胞の核内に発現するとされ、興奮性アミノ酸受容体を介するカルシウムイオンの流入が、その発現の引き金になるとされている²⁰。小脳顆粒細胞は、神経伝達物質として興奮性アミノ酸であるグルタミン酸を含有し、またカルシウムイオンチャネルであるグルタミン酸受容体を発現している²¹。カイニン酸を線条体や小脳に投与した場合、カルシウムが 1 時間以内に上昇し始め、8 週間以上増加し続け、10 倍以上に達する⁵。これらの報告は、チオフェン中毒ラット小脳顆粒細胞の変性過程における興奮毒性発現に関連して、カルシウムの集積が生じていることを示唆している。

また、実験的チオフェン中毒の急性期の小脳には、小脳虫部顆粒細胞層内の小血管壁を中心に亢進したアルカリホスファターゼ (ALP) の活性がみられている。

また、一部には、酸ホスファターゼまでみられるが、ライソゾームの所見を認めていない^{9,22}。これらの脱リン酸化酵素もカルシウム塩形成に特定の役割を果たしているのかもしれない。

ヒト鉛中毒²³ および担癌ラット³ の小脳石灰化は、石灰化が血管に由来するとされている。これらの結果は、我々の結果とは、一見異なるようである。しかし、いずれの報告の検索も石灰小体の形成がかなり進んだ時期に行われており、このような完成された石灰小体からその由来を推定するのは困難であろう。石灰化が転移性および異栄養性に全身各所に起こりうる²⁴ ことからすれば、神経系における石灰化に神経細胞由来のものが存在することも否定できず、そのような由来の可能性を認識する必要もあるものと考えたい。さらに、細胞内情報伝達系や神経細胞の興奮毒性におけるカルシウムイオンの関与を考えると、これらの生理学的カルシウムイオン動態と病理学的現象としての石灰化との関連性を探求していく上で、今回報告したチオフェン中毒ラット小脳の石灰化は良いモデルとなる可能性がある。

小脳内石灰化は、かなり早期に、これまで言われてきた梗塞巣にみられた壊死性過程とは相違した虚血状況下で発生しているものと考えられる。このことは、今回のマイクロスライス切片をアリザリンで染色した結果みられた変性細胞が、可逆性の可能性の期待できない初期の段階で既に石灰化が開始して非可逆性状態を示していた。このことを超微形態像の中で、細胞膜直下に集積しながら、年輪状に内方に向かって積み重ねることが細胞機能を低下させて死に至らせる。この像を示す過程では、異常興奮を促す状況下で発生することを明らかにした。

文 献

1. Fraser, H: Bilateral thalamic calcification in ageing mice. *J Pathol Bacteriol* 96: 220-222, 1968.
2. Morgan, KT, Johnson, BP, Frith, CH, and Townsend, J: An ultrastructural study of spontaneous

- mineralization in the brains of aging mice. *Acta Neuropathol* **58**: 120-124, 1982.
3. Yanai, T, Masegi, T, Ueda, K, Manabe, J, Teranishi, M, Takaoka, M, Matsunuma, N, Fukuda, K, and Goto, N: Spontaneous globoid mineralization in the cerebellum of rats. *J Comp Pathol* **109**: 447-451, 1993.
 4. Balentine, JD and Spector, M: Calcification of axons in experimental spinal cord trauma. *Ann Neurol* **2**: 520-523, 1977.
 5. Korf, J and Postema, F: Regional calcium accumulation and cation shifts in rat brain by kainate. *J Neurochem* **43**: 1052-1060, 1984.
 6. Nitsch, C and Scotti, AL: Ibotenic acid-induced calcium deposits in rat substantia nigra. Ultrastructure of their time-dependent formation. *Acta Neuropathol* **85**: 55-70, 1992.
 7. Hunter, D, Bomford, R, and Russell, DS: Poisoning by methyl mercury compounds. *Quart J Med (N.S.)* **9**: 193-219, 1940.
 8. Chou, SM and Fukuhara, N: EM studies on calcospherites induced in cerebellar granular layers of rats by chronic methyl mercury poisoning. *J Neuropathol Exp Neurol* **32**: 175-176, 1973.
 9. Koya, G: Personal communication to R.M. Herndon. 1968.
 10. Herndon, RM: Thiophen induced granule cell necrosis in the rat cerebellum an electron microscopic study. *Exp Brain Res* **6**: 49-68, 1968.
 11. 森 文秋, 高屋豪瑩, 吉田泰二, 玉山公基, 西岡孝浩: チオフェンによって惹起されたラット小脳血管障害. *J Toxicol Pathol* **5**: 21-28, 1992.
 12. 森 文秋, 高屋豪瑩, 吉田泰二, 玉山公基: 高齢 SHR にチオフェン投与を行なった後小脳顆粒細胞層内血管に出現したオスミウム好性物質. *J Toxicol Pathol* **5**: 167-177, 1992.
 13. 森 文秋, 高屋豪瑩: チオフェン中毒ラットにおける Fos 蛋白発現. *J of Toxic Pathol* **7**: 489-499, 1994.
 14. Farber, JL: The role of calcium in cell death. *Life Sci* **29**: 1289-1295, 1981.
 15. Choi, DW: Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends Neurosci* **11**: 465-469, 1988.
 16. McGee-Russel, SM: Histochemical methods for calcium. *J Histochem Cytochem* **6**: 22-42, 1957.
 17. Dahl, LK: A simple and sensitive histochemical method for calcium. *Proc Soc Exp Biol Med* **80**: 474-479, 1952.
 18. Voogd, J, Gerrits, NM, and Marani, E.: Cerebellum. *In*: The rat nervous system. Volume 2. Hindbrain and spinal cord, Paxinos, G. ed., Academic Press Australia, Sydney, pp. 251-291, 1985.
 19. 花岡英弥: 病理技術マニュアル 5 病理学領域における電顕応用 (日本病理学会編), 医歯薬出版, 東京, 330-345 頁, 1985.
 20. Lerea, LS, Butler, LS, and McNamara, JO: NMDA and non-NMDA receptor-mediated increase of c-fos mRNA in dentate gyrus neurons involves calcium influx via different routes. *J Neurosci* **12**: 2973-2981, 1992.
 21. 遠藤正彌, 高辻功一: 脳の神経活性物質・受容体アトラス., 医学書院, 東京, 323-333 頁, 1993.
 22. Albrechtsen, R and Jensen, H: Histochemical investigation of thiophen necrosis in the cerebellum of the rats. *Acta Neuropathol* **26**: 217-223, 1973.
 23. Saal, JR, Coombe, IF, Thomas, BW, Tonge, JI, and Burry, AF: Cerebellar calcification-ultrastructure and histochemistry. *Pathology* **10**: 351-363, 1978.
 24. Anderson, HC: Calcific diseases. *Arch Pathol Lab Med* **107**: 341-348, 1983.