

## マウス体性感覚野スライス標本における 視床刺激によるフラビン蛋白蛍光応答

鎌谷 大樹

新潟大学大学院医歯学総合研究科生体機能調節医学専攻

脳研究所システム脳生理学分野

(主任：澁木克栄教授)

### Flavoprotein Fluorescence Responses Elicited by Thalamic Stimulation in Slices Obtained from the Mouse Somatosensory Cortex

Daiki KAMATANI

*Department of Neurophysiology,*

*Brain Research Institute, Niigata University*

*(Director: Prof. Katsuei SHIBUKI)*

#### 要 旨

齧歯類の脳皮質一次体性感覚野には、ヒゲの一本一本に対応したバレルとよばれる構造がある。齧歯類にとってヒゲからの情報は重要なものであり、神経活動依存的回路発達のモデル系としてバレル構造は注目されている。一般に感覚情報は視床を経て感覚野のIV層へ投射されるが、視床から皮質への情報伝達の特徴をスライス標本で選択的に解析することは難しい。今回私はマウスの視床と皮質の両方を含むスライスを調製し、視床を刺激したときの皮質神経活動をフラビン蛋白蛍光イメージング法で可視化した。神経活動が起こると、細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の上昇に伴いミトコンドリア内でエネルギー代謝が活発になり、電子伝達系に含まれるフラビン蛋白が酸化型になる。フラビン蛋白は、青色励起光を照射すると酸化型のみ緑色蛍光を発するという性質を持つ。従って神経活動亢進に伴う緑色蛍光上昇を記録することで神経活動を可視化することができる。実験は8-10週齢のC57BL/6マウスの雄を用いて行った。まず体性感覚野の皮質だけのスライスを作成し、神経活動がフラビン蛋白蛍光の増強として可視化できることを示した。刺激電極はバレル野のIV層に置き、連発パルス刺激を用いて神経活動を起こした。次に視床と一次体性感覚野を含むスライスを作成し、視床の連発パルス刺激によって亢進させた皮質神経活動をフラビン蛋白蛍光の増強反応として可視化した。1辺がマウスのバレル構造の直径に相当する  $250\mu m$  のウィンドウを設定し、定量的な評価を行った。またフラビン蛋白蛍光応答が見られた部位に記録電極を刺入し、視床刺激による皮質反応の電場電位も記録した。刺激強度を  $100\mu A$  から  $500\mu A$  まで変化させるとフラビン蛋白蛍光応答も電場電位応答も刺激強度に良く相関した変化を示した。さらにグルタミン酸受容体の阻害剤を用いることで、この神経活動が抑えられることを確認した。以上からマウス脳スライス標本を用いると、視

Reprint requests to: Daiki KAMATANI  
Department of Neurophysiology  
Brain research institute  
Niigata University  
1-757 Asahimachi-dori,  
Niigata 951-8585 Japan

別刷請求先： 〒951-8585 新潟市旭町通り1-757  
新潟大学脳研究所システム脳生理学分野  
鎌谷大樹

床からの感覚入力による皮質応答を選択的に可視化できることが判った。

キーワード：視床, 体性感覚野, フラビン蛋白蛍光, マウス, スライス

## 緒 言

マウスなどの夜行性の齧歯類は、暗闇で役に立たない視覚系より、むしろヒゲなどの体性感覚入力によって身近な空間を認識している。マウスは探索行動において、ヒゲを活発に動かし、そのヒゲからの入力によってヒゲが届く範囲の環境を探っている。実際、マウスの大脳皮質では、ヒゲからの体性感覚入力を処理する領域が大きな割合を占めており、一次体性感覚野内でヒゲの一本一本に対応したバレルとよばれる構造が確認される<sup>1)</sup>。

ヒゲからの入力は、脳幹三叉神経核、視床の中継ニューロンを経由して、視床から皮質へ投射する神経線維によって1次体性感覚野IV層へと伝達される。個々のヒゲからの入力は一群のIV層の神経細胞へと特異的に伝達され、このような一本のヒゲからの入力に対応する皮質構造がバレルとなる。このバレル構造とその機能は、齧歯類を用いた皮質での情報処理過程やシナプス回路の研究において興味深いものであり、多くの研究者によってその詳細な構造や受容野の特性などが調べられてきた<sup>2)–4)</sup>。

ヒゲからの入力はマウスにとって非常に重要であるが、視床を介する皮質応答を通常のスライス標本を用いて選択的に解析することは非常に困難である。何故ならば、大脳皮質は非常に多くの入出力経路を持ち、視床からの入力線維だけを選択的に刺激することが非常に難しいからである。1991年、AgmonとConnorsによってマウス脳においてバレル野と視床、及び視床—皮質投射経路を一枚のスライス標本に含むスライス作製法が開発された<sup>5)</sup>。これによって視床と皮質を結ぶ神経回路の生理学的特徴についてたくさんの知見が得られたが、そのほとんどはたかだか数本の電極を用いて解析する電気生理学的手法によるものであった<sup>6)</sup>。興奮伝播の時間空間パターンについて詳細な検討を行うためには二次元的な反応の広がり

を直接光学的に捉えるイメージング法を用いた解析が必要とされる。

細胞のミトコンドリア内に多く存在するフラビン蛋白は、青色励起光を照射すると酸化型のみが緑色自家蛍光を発するという特徴を持つ<sup>7)8)</sup>。神経細胞の活動に伴い、細胞内カルシウム濃度が上昇し、酸素代謝が亢進する。このとき、神経酸素代謝の亢進に伴ってミトコンドリア内に存在するフラビン蛋白が酸化型に変換されるので、緑色自家蛍光強度が増加する<sup>7)9)</sup>(図1A)。このフラビン蛋白蛍光は最近齧歯類における脳機能イメージングの方法として非常に有効であることが示された<sup>10)–13)</sup>。このイメージング法によって体性感覚野における活動依存的な皮質の可塑性<sup>14)</sup>、学習による体性感覚野の可塑性<sup>15)</sup>、環境音に依存した聴覚野の可塑性<sup>16)</sup>、聴原性てんかん発作における皮質焦点の同定<sup>17)</sup>などの研究が次々となされている。

今回私は視床からの入力による選択的な皮質応答をマウス脳スライス標本において可視化することに成功したので報告する。

## 方 法

本研究は動物実験に関する新潟大学倫理委員会の承認を得て行われた。

### スライスの調製

マウスは日本チャールズリバーより購入した系統C57BL/6の雄を使用した(8–10週齢)。マウスをエーテルで麻酔した後、0℃の氷水に鼻先以外を1分30秒浸して脳温を下げた。その後素早く断頭し、脳組織を摘出した。視床を含むスライスの作成はAgmon and Connors (1991)の方法を参考にした。厚さは500μmで右半球の視床と1次体性感覚野を含むスライスを作成した。また通常の前頭断スライス標本も作製した。スライス

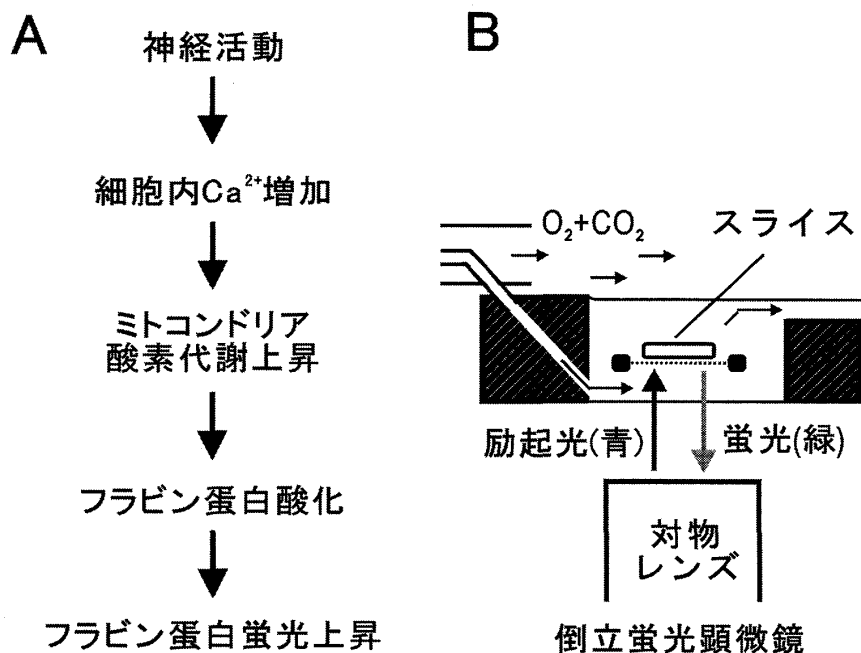


図1 フラビン蛋白蛍光イメージングの原理と実験方法

A, フラビン蛋白蛍光イメージングの原理. B, 実験手法. 倒立顕微鏡で得られた蛍光反応を CCD カメラで捉え, 画像化する.

は室温 (24 ± 1 °C) のメディウム中で1時間以上インキュベートした. (メディウムの組成: NaCl 124, KCl 5, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.24, MgSO<sub>4</sub> 1.3, CaCl<sub>2</sub> 2.4, NaHCO<sub>3</sub> 26, and glucose 10 (ミリモル単位), 95% O<sub>2</sub> と 5% CO<sub>2</sub> の混合ガスでバブリング) インキュベーション後, スライスを記録チェンバー内に移し, 溶液中で透明化する polytetrafluoroethylene からなるメンブレンフィルター (H100A, アドバンテック) の上に静置し, 測定を行った. チェンバー内をメディウムで灌流し (流速: 1 ml/min), チェンバーから酸素が抜けないように表面に 95% O<sub>2</sub> と 5% CO<sub>2</sub> の混合ガスを流した (図 1B). タングステンランプ (1.25 W) にて, 垂直方向より 5 °C の方向からスライスを照らすことでスライスの内部構造がよく見える透過光像を得た.

#### フラビン蛋白イメージング

スライスに青色励起光 (波長: 472 - 488 nm)

を照射し, 励起される緑色自家蛍光 ( $\lambda = 520 - 560$  nm) を倒立顕微鏡 (TE2000-U, ニコン) で記録し (倍率: × 2.0), 冷却 CCD カメラシステム (AQUACOSMOS/Ratio with ORCA-ER, 浜松ホトニクス) を用いて撮影した (図 1B). 蛍光イメージ (128 × 128 ピクセル) は毎秒 2 フレームの頻度で記録した. 刺激にはテフロンでコーティングされた白金電極 (直径 125 μm) を用い, 刺激電流は二相性 (各相の長さ: 200 μs) とした. 1 分毎に繰り返して得られた画像データを 5 回試行分加算平均し, 刺激前の 10 フレームの平均に対する各フレームの蛍光強度変化 ( $\Delta F/F_0$ ) を算出し, グレースケールで表示した.

#### 電場電位の測定

視床を刺激したときの一次体性感覚野 IV 層における電場電位を記録した. 記録には, 先端 60 μm を残してポリ塩化ビニルでコーティングしたタングステン電極 (< 30 k Ω) を用いた. シグナル

は増幅器にて 100 倍に増幅し、バンドパスフィルター (0.1Hz, 10kHz) を通した後、コンピュータに記録した。

## 試薬

6-Cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX) と D-2-amino-5-phosphonovalerate (APV) は Tocris Cookson (Bristol, UK) から購入した。これらの試薬はそれぞれ  $10\ \mu\text{M}$ ,  $50\ \mu\text{M}$  の濃度で灌流メディウムに加えることでスライスに作用させた。

## 結 果

### フラビン蛋白蛍光イメージングで捉えた前頭断スライス標本における神経活動

まず視床を含まない通常の皮質のみのスライスにおいて神経活動をフラビン蛋白蛍光イメージング法で可視化した。バレル皮質の IV 層に電極 (直径  $50\ \mu\text{m}$ ) を置き、連続刺激 ( $100\ \mu\text{A}$ , 20Hz,  $250\ \mu\text{sec}$ ) を加えると II/III 層での水平方向の興奮伝播が観察された (図 2A)。蛍光の経時変化を II/III 層に設定したウィンドウにおいて測定すると、刺激開始後 2.0 秒後にピークをとり、最大変化率は  $3.6 \pm 0.2\%$  (mean  $\pm$  S.E.M.,  $n=12$ ) であった (図 2B)。さらに II/III 層, V 層を刺激したときの反応を測定し同様の結果を得た (それぞれの振幅:  $4.6 \pm 0.3\%$ ,  $3.8 \pm 0.2\%$ ) (図 2C, D)。これらの実験の結果、視床からの入力線維が投射する IV 層だけでなく、どの層を刺激しても同様の反応が得られたので、通常のスライス標本では視床入力の選択的な刺激による応答を捉えることは困難であると思われる。

### 視床-皮質投射線維を残したスライスの作成

皮質のスライスでは、皮質内の局所的な回路を調べることはできるが、感覚情報の重要な中継点である視床からの入力線維による選択的応答の解析はできない。そのため視床-皮質投射線維を残したスライスを Agmon and Connors (1991) の方法を参考に作成した。スライスはタングステン

ランプを用いて照射し、冷却 CCD カメラで透過像を観察した (図 3A)。このような透過像においては有髄線維が光を強く反射するので暗く見える<sup>18)</sup>。この性質を利用し、皮質にみられる水平方向に伸びた 2 本の暗いバンドは、それぞれ IV 層と V 層に相当すると同定した<sup>19)20)</sup>。また皮質 IV 層において、濃度にむらのある部分がバレル野であると同定した<sup>1)</sup>。

### フラビン蛋白蛍光イメージング法で捉えた視床刺激による皮質反応

視床を刺激したときの神経活動を、フラビン蛋白蛍光イメージング法を用いて可視化した。視床を 20 Hz, 1 秒間連続電気刺激したとき、刺激部位である視床とバレル皮質 IV 層でフラビン蛋白蛍光の上昇が観察された (図 3B)。このとき、バレル皮質 IV 層に設定した  $9 \times 9$  ピクセル (約  $250\ \mu\text{m}$  平方) のウィンドウ内での蛍光変化を測定した。反応は刺激開始後約 2.5 秒後にピークに達し、その振幅は  $0.6 \pm 0.1\%$  ( $n=9$ ) であった (図 3C)。また刺激部位である視床に設定したウィンドウにおいて計測した蛍光反応は刺激開始後 1.5 秒後にはピークに達し、最大振幅は  $1.1 \pm 0.1\%$  ( $n=9$ ) であった (図 3D)。視床の反応部位と皮質の反応部位の間には無反応の領域が存在すること (図 3B)、皮質の応答が視床の応答に遅れて出現すること (図 3C, D) から、この実験で観察された皮質の応答は視床入力の選択的刺激によるものであると思われる。

### 蛍光応答と電場電位で記録した応答との比較

視床を刺激したときの体性感覚野における反応を電場電位として測定した。フラビン蛋白蛍光を測定した後、刺激電極はそのままにし、フラビン蛋白蛍光変化が最も大きく観察された皮質部位に記録電極を刺した。 $300\ \mu\text{A}$  で刺激したときのサンプルトレースを示す (図 4A)。脱分極の大きさは平均  $0.43 \pm 0.05\ \text{mV}$  ( $n=8$ ) であった。刺激強度を  $100\ \mu\text{A}$  から  $500\ \mu\text{A}$  まで変化させたとき、それに伴う反応の変化が観察された皮質の蛍光応答 (図 4B) も、電場電位 (図 4C) も、刺激強度

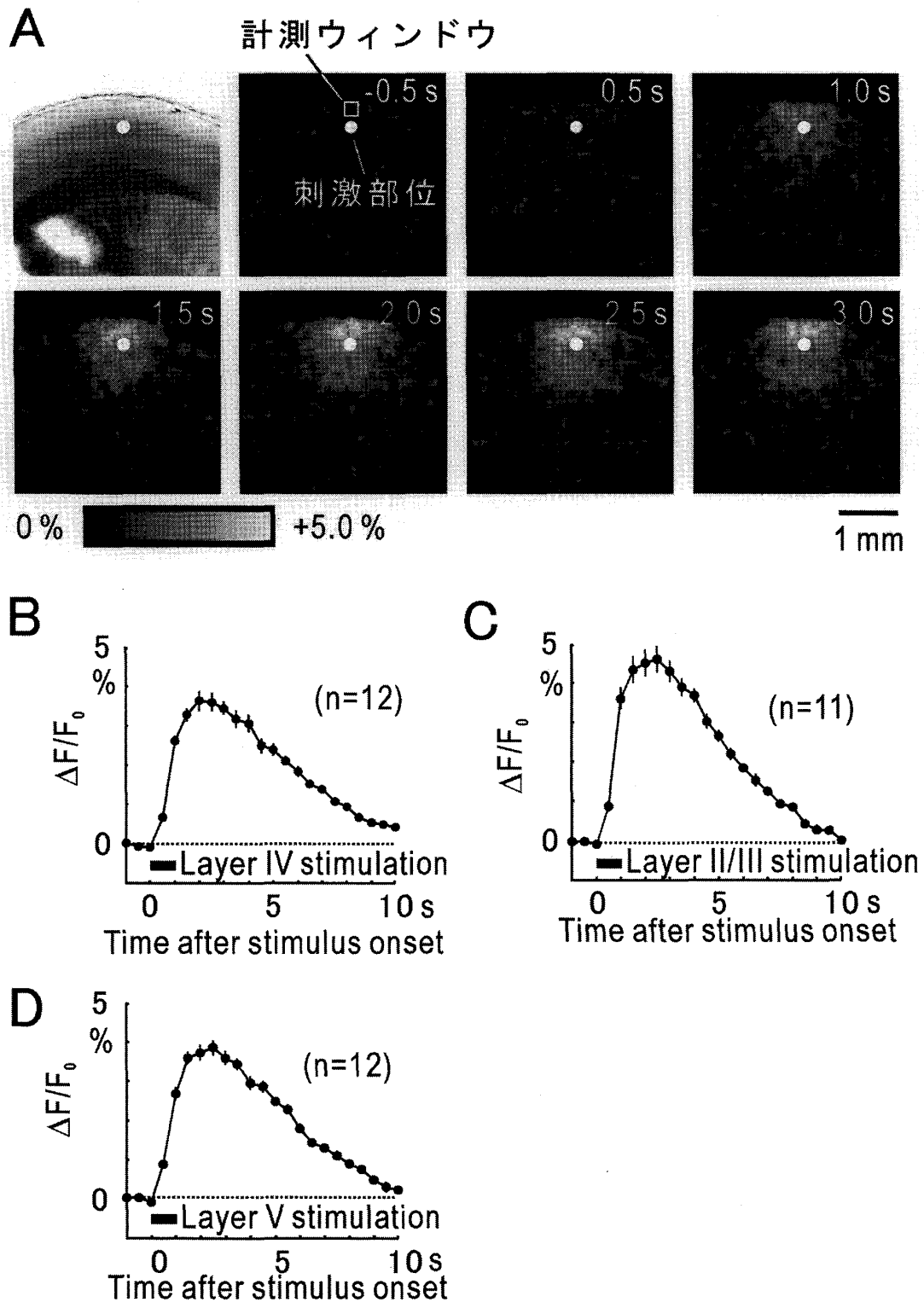


図2 通常の前頭断スライスにおけるフラビン蛋白蛍光反応

A, パレル皮質IV層を電気刺激したときの反応の広がり. 興奮はII/III層に伝わり, 水平方向へ伝播していく. B, IV層を刺激したときのII/III層に設定したウィンドウにおける蛍光の経時変化. フラビン蛋白蛍光は刺激開始後から上昇し, 2.0か2.5秒後にピークをとった. C, II/IIIを刺激したときのII/III層における蛍光の経時変化. D, V層を刺激したときのII/III層における蛍光の経時変化.

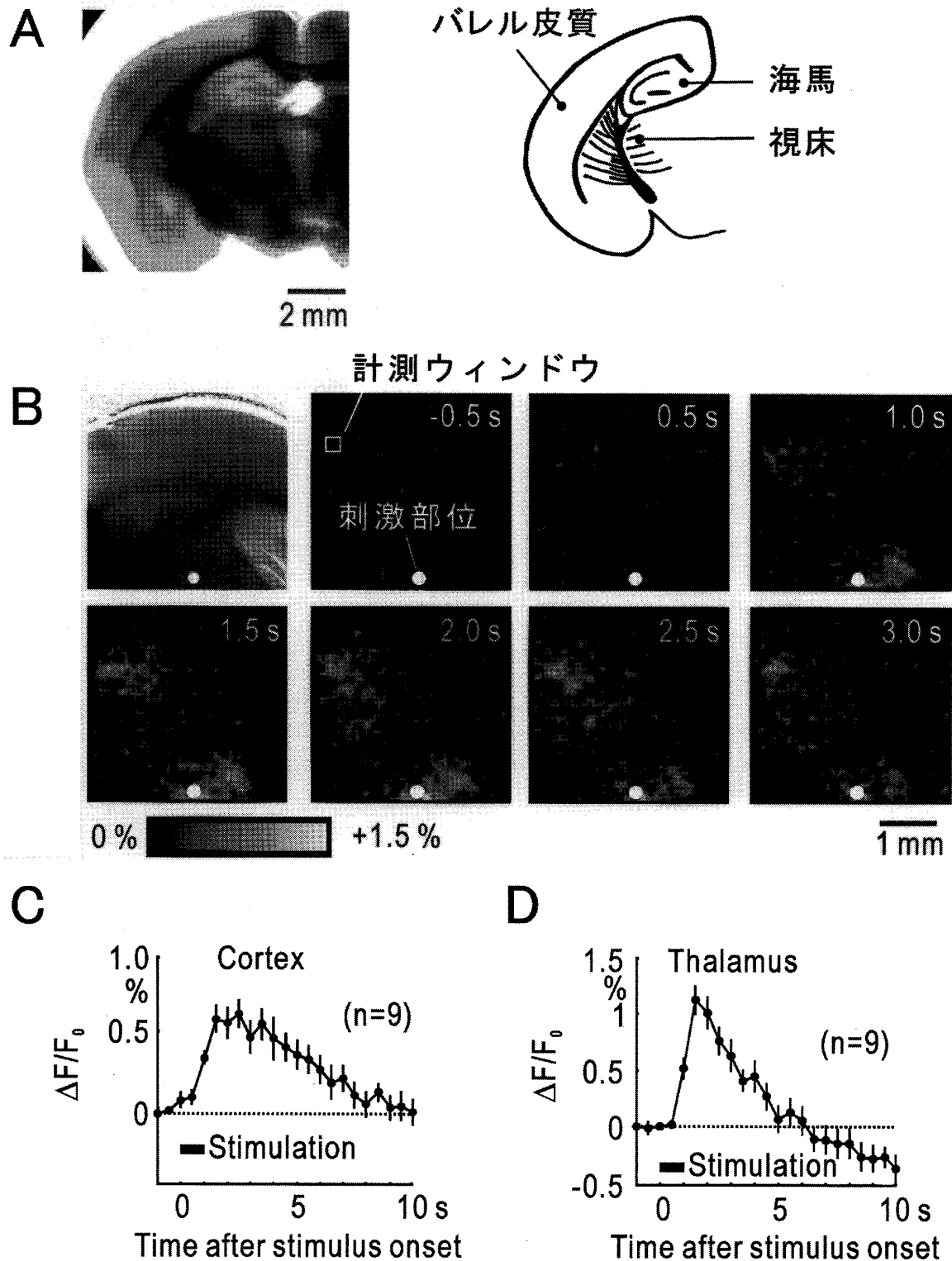


図3 皮質-視床投射線維を残したスライスにおけるフラビン蛋白蛍光反応

A, 視床-皮質投射線維が保存されたスライスの透過光像。視床と皮質を連絡する線維が観察できる。  
 B, 視床を電気刺激したときの反応の広がり。刺激部位の興奮と、バレル皮質IV層の選択的な興奮が確認できる。  
 C, D, 皮質IV層に設定したウィンドウ (C) と、刺激部位に設定したウィンドウ (D) における蛍光の経時変化。

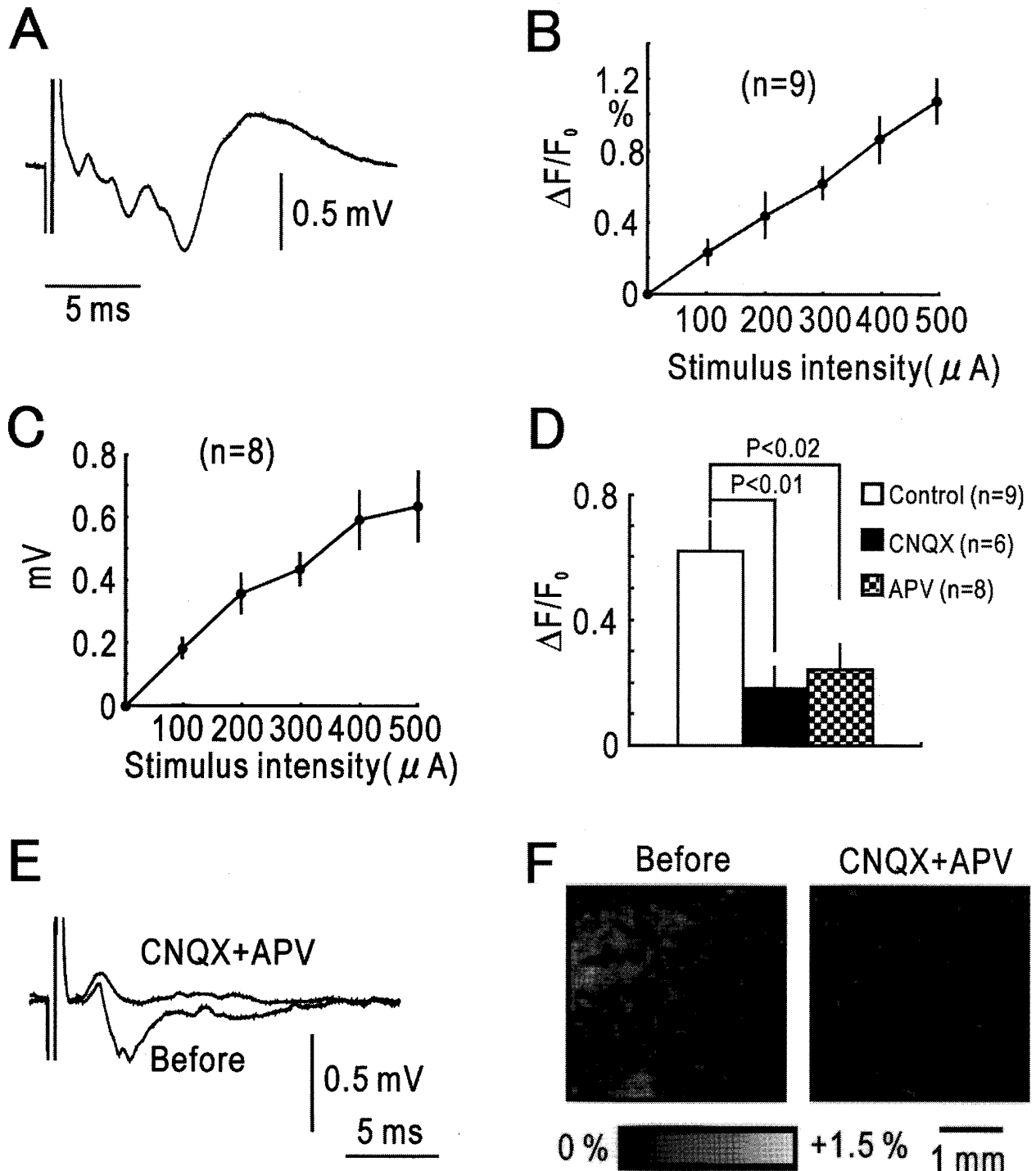


図4 電場電位との比較, 薬理学実験

A, 視床を電気刺激したときの皮質IV層における電場電位のサンプルトレース. B, 刺激強度を変化させたときのフラビン蛋白蛍光応答の変化. C, 刺激強度を変化させたときの電場電位応答の変化. 刺激強度によく相関した変化が見られた. D, 10 $\mu$ M CNQX, 50 $\mu$ M APVによるフラビン蛍光反応の減少. グルタミン酸受容体の阻害によって蛍光反応が有意に抑えられた. E, CNQXとAPVを同時に作用させたときの電場電位の変化. F, CNQXとAPVを同時に作用させたときのフラビン蛋白蛍光反応の変化. CNQXとAPVの同時投与によって神経活動は完全に阻害された.

を上げるとほぼそれに比例するように振幅が増大し、両者の間には良い相関関係が見られた。

### 薬理学実験

視床から皮質への神経伝達はグルタミン酸作動性シナプスによるとされているが、この点について確認するため、グルタミン酸受容体の阻害剤の作用を解析した。10  $\mu$ M の CNQX (非 NMDA 型グルタミン酸受容体阻害剤) によって蛍光変化率は  $0.2 \pm 0.1\%$  ( $n = 6$ ) まで有意に低下した ( $P < 0.01$ , Mann-Whitney の U 検定, 図 4D)。また 50  $\mu$ M の APV (NMDA 型グルタミン酸受容体阻害剤) の存在下でも反応は  $0.2 \pm 0.1\%$  ( $n = 8$ ) まで有意に低下した ( $P < 0.02$ )。さらに CNQX と APV を同時投与すると、電場電位記録 (図 4E) においてもフラビン蛋白蛍光イメージングにおいても (図 4F)、神経活動がほぼ完全に阻害されることが確認された。従って視床刺激による皮質応答はほぼ完全にグルタミン酸作動性シナプスに依存すると思われる。

## 考 察

### 視床入力による皮質応答

本研究では、視床刺激による皮質における反応を、スライス標本に対してフラビン蛋白蛍光イメージング法を用いることで可視化した。視床は末梢の感覚入力が大脳皮質体性感覚野へと至る、主たる経路である。そのため視床と皮質の間での機能結合を調べることは、体性感覚野における情報処理のメカニズムを研究する上で重要である。しかし、感覚入力の皮質への入り口は IV 層であるが、通常の皮質のみのスライスで IV 層を刺激しただけでは、そこを通過する線維も同時に刺激されるため、視床からの選択的入力応答を捉えていることにはならない (図 2)。さらに逆行性の興奮が含まれるため解析が複雑になる。今回用いたスライス標本には皮質から視床までが含まれており、その中での線維連絡が保存されているため、視床を刺激したときの皮質への興奮伝播を観察することができる。得られたスライスは有髄線維構造の違い

によって、特別な染色なしに透過光像でその組織を同定できた (図 3A)。視床を電気刺激したときの神経活動をフラビン蛋白蛍光イメージング法によって可視化すると、刺激部位である視床とパレル皮質 IV 層での神経活動亢進が観察された。これによって視床から皮質 IV 層への特異的な情報の伝播が確認できた。齧歯類の皮質から視床へ向かう遠心性線維は V, VI 層からのものであることが知られており<sup>21)</sup>、ここで見られた反応は逆行性の興奮とは考えられない。本研究の薬理学実験においても、CNQX と APV の同時投与によって神経活動が完全に阻害されたことにより、逆行性の興奮の存在を否定した (図 4E, F)。逆行性の興奮は生じて不思議ではないが、視床刺激によって直接錐体細胞体を刺激するわけではないため、閾値が順行性の応答より高く、今回の実験条件ではほとんど観察されなかったと考えられる。蛍光強度の経時変化を皮質 IV 層と視床の刺激部位において測定すると、皮質における潜時が視床のものよりも長い。これは、皮質 IV 層神経細胞が他のニューロンと結合して皮質内回路を形成するので、IV 層神経細胞を起点とする多シナプス性神経回路が駆動されるまで時間がかかるためであると思われる。フラビン蛋白蛍光イメージング法で測定した結果と電場電位測定との比較を行った。フラビン蛋白蛍光は、刺激強度を 100  $\mu$ A から 500  $\mu$ A まで変化させると、それに応じて蛍光変化も大きくなった。視床を刺激してパレル皮質 IV 層で電場電位を記録すると、同様の相関が得られ、フラビン蛋白蛍光が神経活動を反映していることが確認された。

皮質内での興奮神経伝達物質としてグルタミン酸は一般的である。Tamura らは、視床を刺激したとき  $Ca^{2+}$  依存的に皮質内でグルタミン酸が放出されることを報告した<sup>22)</sup>。また Kaneko らは免疫化学的手法で、視床-皮質ニューロンにグルタミンナーゼが豊富に存在することをしめした<sup>23)</sup>。すべての 1 次感覚野において視床から皮質へ投射する神経にはグルタミン酸が多く含まれていることも調べられている<sup>24)</sup>。今回我々は CNQX と APV を用いてグルタミン酸受容体を阻害し、その反応が阻害されることを確認した。AMPA 型グル



タミン酸受容体は視床から皮質へのシナプスにおける興奮伝播に主要な役割を担っている。アンタゴニストの投与によってほとんどの視床を刺激したときの皮質での反応<sup>25)</sup>や、皮質内での興奮性<sup>26)</sup>が失われることが報告されている。またAMPA型グルタミン酸受容体が経験依存的な可塑性に重要な役割を担っていることも報告されている<sup>27)</sup>。今回の我々のフラビン蛋白蛍光イメージングの実験でもAMPA型受容体の関与が確かめられた。NMDA受容体は大腦皮質に顕著に存在するが、その密度や受容体のサブタイプは領野によって大きく異なることが知られている<sup>28)</sup>。ラットのバレル皮質では、上顆粒細胞層、V層、そして視床からの投射を受ける、IV層のバレル領域にNMDA受容体の局在が見られる<sup>29)</sup>。またNMDA受容体はバレル皮質のパターン形成に重要な役割を担っていることも知られている<sup>30)</sup>。今回の実験ではNMDA受容体の阻害実験により、NMDA受容体が実際にバレル野における神経伝達に関与することが確認された。これはNMDA受容体も視床から皮質への情報伝播に重要であることを示したGilらの結果と適合するが<sup>6)</sup>、NMDA受容体はむしろ多シナプス性の皮質内回路において重要な役割を果たすという可能性もある。

#### スライス標本とフラビン蛋白蛍光イメージング法を用いて皮質応答を研究する利点

視床は感覚情報が皮質へ到達するまでの大きな中継点のひとつであるが、*in vivo*の測定でその反応を解析することは難しい。そのため皮質で可塑的变化が起こったとき、それが皮質レベルのものであるのか、あるいはより下位のレベルのものであるかが、しばしば議論される。従って視床-皮質スライスは、感覚野における可塑的变化を解析するためには非常に有益な情報をもたらすと期待される。また、スライス実験では薬品の投与が非常に容易であり、本研究で行ったような薬物の効果を調べるための実験系として適している。

本研究ではフラビン蛋白蛍光イメージング法を用いて神経活動を可視化した。このイメージング法は複雑な手技を必要とせず、電気生理学的な

手法では得られにくい空間情報を容易に得ることができる。しかも色素を必要としないため、染めムラや発現のムラがなく、またシグナルも強く、結果の再現性や安定性も高い<sup>10)</sup>。そのため視床-皮質スライスの解析において非常に強力な研究手法であると思われる。

#### 結 語

神経活動依存的なフラビン蛋白蛍光変化を利用したイメージング法でマウス体性感覚野の応答を記録した。特に視床から皮質に投射する経路を保存したスライス標本を用いて視床からの入力による皮質の選択的応答を可視化することに成功した。このイメージング方法は複雑な手技を必要とせず、結果の再現性や安定性も高いので、視床と皮質を結ぶ神経回路の解析において強力な手法となるとと思われる。

#### 謝 辞

本研究についてご指導と助言をいただきました湊木克栄教授、工藤雅治先生、菱田竜一先生に深く感謝します。

#### 引用文献

- 1) Woolsey TA and Van der Loos H: The structural organization of layer IV in the somatosensory region (SI) of mouse cerebral cortex. The description of a cortical field composed of discrete cytoarchitectonic units. *Brain Res* 17: 205-242, 1970.
- 2) Armstrong-James M and Fox K: Spatiotemporal convergence and divergence in the rat SI "barrel" cortex. *J comp Neurol* 263: 265-281, 1987.
- 3) Chapin JK: Laminar differences in sizes, shapes and response profiles of cutaneous receptive fields in the rat SI cortex. *Exp Brain Res* 62: 549-559, 1986.
- 4) Simons DJ: Temporal and spatial integration in the rat SI vibrissa cortex. *J Neurophysiol* 54: 615-635, 1985.

- 5) Agmon A and Connors BW: Thalamocortical responses of mouse somatosensory (barrel) cortex in vitro. *Neuroscience* 41: 365 - 379, 1991.
- 6) Gil Z and Amitai Y: Adult thalamocortical transmission involves both NMDA and non-NMDA receptors. *J Neurophysiol* 76: 2547 - 2554, 1996.
- 7) Chance B, Cohen P, Jobsis F and Schoener B: Intracellular oxidation - reduction states in vivo. *Science* 137: 499 - 508, 1962.
- 8) Benson RC, Meyer RA, Zaruba ME and McKhann GM: Cellular autofluorescence - is it due to flavins? *J Histochem Cytochem* 27: 44 - 48, 1979.
- 9) Shuttleworth CW, Brennan AM and Connor JA: NAD (P) H fluorescence imaging of postsynaptic neuronal activation in murine hippocampal slices. *J Neurosci* 23: 3196 - 3208, 2003.
- 10) Shibuki K, Hishida R, Murakami H, Kudoh M, Kawaguchi T, Watanabe M, Watanabe S, Kouuchi T and Tanaka R: Dynamic imaging of somatosensory cortical activities in the rat visualized by flavoprotein autofluorescence. *J Physiol (Lond)* 549: 919 - 927, 2003.
- 11) Reinert KC, Dunbar RL, Gao W, Chen G and Ebner TJ: Flavoprotein autofluorescence imaging of neuronal activation in the cerebellar cortex in vivo. *J Neurophysiol* 92: 199 - 211, 2004.
- 12) Coutinho V, Mutoh H and Knöpfel T: Functional topology of the mossy fibre - granule cell - Purkinje cell system revealed by imaging of intrinsic fluorescence in mouse cerebellum. *Eur J Neurosci* 20: 740 - 748, 2004.
- 13) Weber B, Burger C, Wyss MT, von Schulthess GK, Scheffold F and Buck A: Optical imaging of the spatiotemporal dynamics of cerebral blood flow and oxidative metabolism in the rat barrel cortex. *Eur J Neurosci* 20: 2664 - 2670, 2004.
- 14) Murakami H, Kamatani D, Hishida R, Takao T, Kudoh M, Kawaguchi T, Tanaka R and Shibuki K: Short - term plasticity visualized with flavoprotein autofluorescence in the somatosensory cortex of anaesthetized rats. *Eur J Neurosci* 19: 1352 - 1360, 2004.
- 15) Shibuki K, Ono K, Hishida R and Kudoh M: Endogenous fluorescence imaging of somatosensory cortical activities after discrimination learning in rats. *Neuroimage* (in press), 2005.
- 16) Takahashi K, Hishida R, Kubota Y, Kudoh M, Takahashi S and Shibuki K: Transcranial fluorescence imaging of auditory cortical plasticity regulated by acoustic environments in mice. *Eur J Neurosci* (in press), 2006.
- 17) Takao T, Murakami H, Fukuda M, Kawaguchi T, Kakita A, Takahashi H, Kudoh M, Tanaka R and Shibuki K: Transcranial imaging of audiogenic epileptic foci in the cortex of DBA/2J mice. *Neuroreport* (in press), 2006.
- 18) Hishida R, Hoshino K, Kudoh M, Norita M and Shibuki K: Anisotropic functional connections between the auditory cortex and area 18a in rat cerebral slices. *Neurosci Res* 46: 171 - 182, 2003.
- 19) Krieg WJS: Connections of the cerebral cortex. I. The albino rat. B. Structure of the cortical areas. *J Comp Neurol* 84: 277 - 323, 1946.
- 20) Zilles K and Wree A: Cortex: areal and laminar structure. In: *The rat nervous system* (Paxinos G, ed), Vol 1, Academic Press, New York, pp375 - 416, 1985.
- 21) Wise SP and Jones EG: Cells of origin and terminal distribution of descending projections of the rat somatic sensory cortex. *J comp Neurol* 175: 129 - 158, 1977.
- 22) Tamura H, Hicks TP, Hata Y, Tsumoto T and Yamatodani A: Release of glutamate and aspartate from the visual cortex of the cat following activation of afferent pathways. *Exp Brain Res* 80: 447 - 455, 1990.
- 23) Kaneko T and Mizuno N: Immunohistochemical study of glutaminase containing neurons in the cerebral cortex and thalamus of the rat. *J Comp Neurol* 267: 590 - 602, 1988.
- 24) Kharazia VN and Weinberg RJ: Glutamate in thalamic fibers terminating in layer IV of primary sensory cortex. *J Neurosci* 14: 6021 - 6032, 1994.
- 25) Armstrong - James M, Welker E and Callahan CA: The contribution of NMDA and non - NMDA receptors to fast and slow transmission of sensory

- information in the rat SI barrel cortex. *J Neurosci* 13: 2149 - 2160, 1993.
- 26) Jones KA and Baughman RW: NMDA and non - NMDA receptor components of excitatory synaptic potentials recorded from cells in layer V of rat visual cortex. *J Neurosci* 8: 3522 - 3534, 1988.
- 27) Takahashi T, Svoboda K and Malinow R: Experience strengthening transmission by driving AMPA receptors into synapses. *Science* 299: 1585 - 1588, 2003.
- 28) Huntley GW, Vickers JC and Morrison JH: Cellular and synaptic localization of NMDA and non - NMDA receptor subunits in neocortex: organizational features related to cortical circuitry, function and disease. *Trends Neurosci* 17: 536 - 543, 1994.
- 29) Jaasma D, Sebens JB and Korf J: Localization of NMDA and AMPA receptors in rat barrel field. *Neurosci Litt* 133: 233 - 236, 1991.
- 30) Iwasato T, Datwani A, Wolf MA, Nishiyama H, Taguchi Y, Tonegawa S, Knopfel T, Erzurumlu S and Itohara S: Cortex - restricted disruption of NMDAR1 impairs neuronal patterns in the barrel cortex. *Nature* 406: 726 - 731, 2000.
- (平成17年12月27日受付)
-