原　　著

フラビン蛋白蛍光イメージングによるヒトてんかん性組織における皮質活動の伝播所見の可視化とその意義の検討

平　石　哲　也
新潟大学大学院医歯学総合研究科分子細胞医学専攻
新潟大学脳研究所脳神経外科学分野
（主任：藤井幸彦教授）

Propagation of the Cortical Activation in the Epileptic Cortex Visualized by Flavoprotein Fluorescence Imaging

Tetsuya HIRAISHI

Department of Neurosurgery, Brain Research Institute, University of Niigata
(*Director: Prof. Yukihiko FUJII*)

要　旨

【目的】ヒトてんかん性組織に特徴的な興奮の易伝播性を可視化するために，フラビン蛋白蛍光イメージング（Flavoprotein fluorescence imaging: FFI）によりヒト脳組織内の神経活動伝播反応の観察を行い，さらに同組織におけるカルシウム結合蛋白の発現を免疫組織学的に検証し，FFI所見との整合性を検討することでその意義に関する検討を試みた．

【方法】原発性脳腫瘍などの大脳局在病変に対し外科治療を行った10症例を対象とし，術前のてんかん発作症状の有無によりてんかん群（5例），非てんかん群（5例）に分類した．各症例で摘出術に伴って得られた腫瘍周囲の大脳皮質組織の一部を培養した状態で実験室へ搬送し，標本作成を行った．FFIの実験では，bicuculllineを加えた人工脳脊髄液で標本を灌流しながら皮質第Ⅳ層または第Ⅵ層の電気刺激を行い，青色光励起光（波長：470-490nm）の照射で励起される緑色自家蛍光（λ=510-550nm）をCCDカメラシステムにて撮影し，蛍光強度変化（$\Delta F/F_0$）をカラースケール表示した．同一標本から得られた切片を用いて，3種類のカルシウム結合蛋白（PV, CB, CR）の発現を陽性細胞の数として計測し，FFIの結果と免疫組織学的に比較

Reprint requests to: Tetsuya HIRAISHI
Department of Neurosurgery
Brain Research Institute
University of Niigata
1-757 Asahimachi-dori Chuo-ku,
Niigata 951-8510 Japan

別刷請求先：〒951-8510　新潟市中央区旭町通1-757
新潟大学脳研究所脳神経外科　　平石哲也

検討を行った．

【結果】てんかん群全例でFFIにて刺激部から強い蛍光反応が皮質に沿って水平方向に伝播してゆく特徴的な所見が観察され，非てんかん群ではこのような伝播所見は認めなかった．スライス標本上で計測した伝播域の広さは，非てんかん群よりてんかん群で有意に大きかったが（$p = 0.008$），$\Delta F/F_0$の最大値には差がなかった．免疫組織学的検討例でのPV陽性神経細胞の陽性率は，てんかん群で非てんかん群に比べて有意に低く（$p = 0.006$），FFIでの伝播域の広さとは負の相関を示す傾向を認めた（$R = 0.78, p = 0.04$）．

【結論】ヒト脳組織のスライス標本上でFFI法を用いて，てんかん性皮質に特徴的な皮質活動の水平性伝播所見を明らかにした．FFIでの伝播域の広さと同部のカルシウム結合蛋白陽性細胞の発現率の低下に相関も得られ，本研究によりヒト脳組織における活動の易伝播性と皮質内抑制機構の欠落との密接な関連性が示唆された．

キーワード：大脳皮質，てんかん性活動，フラビン蛋白蛍光イメージング，カルシウム結合蛋白

緒　言

てんかん性組織内の皮質活動の伝播様式に関しては様々な検討がなされて来たが，とりわけヒト脳組織においてその機序は明らかではない．てんかん性皮質においては，周囲の皮質と形成した強固な異常神経ネットワークにより皮質全体が易興奮性の状態にあることが想定されているが，今まではこの現象を直接観察する方法もなかった．脳皮質の活動を直接観察する方法として，近年は標的蛋白の信号変化を利用した光学イメージング法が応用され始めており[1)2)]，当研究所ではその中でも神経細胞活動時の細胞内のミトコンドリア内在性のフラビン蛋白の変化を可視化するフラビン蛋白蛍光イメージング（Flavoprotein fluorescence imaging: FFI）を用い，動物実験を主とした脳機能測定の研究に取り組んで来た[1)3)－7)]．優れた時空間分解能で皮質内の活動を可視化できる点において，本方法はヒトてんかん脳組織の病態解明に関する研究への応用に期待が持たれる．本研究では，ヒトてんかん性組織は神経活動の伝播に関して特異的な性質を有するという仮説に立ち，FFIによりこの性質に関わる現象を可視化することを目的として検討を行った．また，FFIにより観察された皮質活動に関する所見と，従来から免疫組織学的検討によりてんかん性皮質における役割が明らかにされてきた抑制性神経細胞の存在の指標としてのカルシウム結合蛋白発現[8)－11)]との整合性も検討し，てんかん性脳皮質の持つ性質について考察した．

方　法

対象症例

対象症例は**表1**に示した10症例（男性6例，女性4例，11歳～63歳）である．実験は当該施設の倫理委員会承認のもと，全患者もしくは家族から同意を得た上で施行された．全例が大脳局在病変（前頭葉5例，側頭葉3例，頭頂葉1例，後頭葉1例）を有し，原疾患の組織診断は胚芽異形成性神経上皮腫3例，低悪性度神経膠腫3例，その他4例であった．臨床症状としてててんかんを有した5例をてんかん群，有さなかった5例を非てんかん群とした．

スライス標本の作製

実験標本には，摘出予定域内で摘出に伴って得られた病変辺縁の大脳皮質の一部を使用した．てんかん群では術中皮質脳波にて異常波の多い部を含めた．手術室にて，得られた皮質の方向と位置を確認しながら5mmの厚さに裁断し，これを氷冷の人工脳脊髄液（NaCl, 124mM; KCl, 5mM; NaH_2PO_4, 1.24mM; $MgSO_4$, 1.3mM; $CaCl_2$, 2.4mM; $NaHCO_3$, 26 mM; and glucose, 10mM）に浸し，酸素95％と二酸化炭素5％の混合ガスでバブリングしながら切除後45分以内に実験室

表 1 Patients' profile and the results of flavoprotein fluorescence imaging

Case	Patients' profile							Flavoprotein fluorescence imaging	
	Age/Sex	Side	Location	Diagnosis	Epilepsy	Seizure type	Age at onset (year)	ΔF/F (%)	Propagated area (mm2)
1	17/M	R	Occipital	Dysembryoplastic neuroepithelial tumor				0.59	0.76
2	19/M	R	Temporal	Dysembryoplastic neuroepithelial tumor				0.71	2.9
3	26/F	R	Frontal	Diffuse astrocytoma				0.9	2.52
4	44/M	L	Frontal	Oligodendroglioma				1.18	2.36
5	57/M	R	Frontal	Extraventricular neurocytoma				2.04	3.75
6	11/F	R	Temporal	Pilocytic astrocytoma	+	SPS,CPS	2 (month)	2.57	12.6
7	37/M	R	Frontal	Anaplastic astrocytoma	+	CPS, GTC	31	0.93	6.88
8	44/M	R	Parietal	Gliosis with atrophic brain	+	CPS, GTC	14	1.35	7.28
9	46/F	L	Frontal	Dysembryoplastic neuroepithelial tumor	+	CPS, GTC	8	2.12	8.83
10	63/F	R	Temporal	Cavernous angioma	+	CPS	38	1.03	6.17

M, male; F, female; R, right; L, left; SPS, simple partial seizure; CPS complex partial seizure; GTC generalized tonic-clonic convulsion

へ搬送の上，実験室にて改めて 500 μm の厚さのスライス標本を作成した．

フラビン蛋白蛍光イメージング

スライス標本は 29 - 30 ℃の人工脳脊髄液で 1 時間以上の培養後，記録用チャンバーに移し，酸素化され 5 μM bicuculline methiodide を加えた人工脳脊髄液にて持続灌流しながら実験を行った．まず倒立型落射蛍光顕微鏡（IX71, オリンパス）に備え付けた冷却型 CCD カメラシステム（AQUACOSMOS / Ratio with ORCA - AG, 浜松フォトニックス）にて赤外線透過画像を撮像した．次にスライスで同定した皮質第Ⅳ層または第Ⅵ層にタングステン製の双極針電極を留置し，二相性刺激電流（刺激強度 300 μA, 刺激幅 200 μsec, 頻度 10Hz）による刺激を行い，青色光励起光（波長：470 - 490nm）を照射し励起される緑色自家蛍光（λ=510 - 550nm）を倍率 2 倍の対物レンズと上記 CCD カメラシステムにて撮影した．FFI 撮像条件は，解像度 336 × 256pixel, 観察域 4.2 × 3.2mm, 10 秒間秒速 6 フレームで，1 分毎に繰り返して得られた 8 回分のデータを加算平均し，刺激直前に得た 5 フレームの加算平均データに対する蛍光強度変化（$\Delta F/F_0$）としてカラースケール表示した．第Ⅳ層に沿って約 5mm 間隔で刺激電極を留置し直し，同様の計測を繰り返した．

免疫組織学的検討

標本から FFI 実験用のスライスを切り出した対面の切片を，ホルムアルデヒド固定した上でパラフィン包埋した 4 μm 厚スライス標本を作成した．免疫組織染色は，Vectastain ABC キット（Vector 社）を使用し，ABC 法で行った．1 次抗体にはカルシウム結合蛋白である parvalbumin (PV) (1: 250 ；シグマ社製)，calbindin (CB) (1: 50, シグマ社製)，calretinin (CR) (1: 5000 ；ケミコン社製）と，神経細胞染色のために NeuN（1 : 150 ；ケミコン社製）を使用し，0.02 %ジアミノベンジジンと 0.05 %過酸化水素水を加え，pH7.6 に調整した 0.05 モルトリス塩酸緩衝液で 10 分間の発色反応を行った．切片の NeuN, PV, CB, CR の定量的評価のため，各サンプルで組織損傷や大きな血管の局在部を避けた関心領域を 3 ヶ所ずつ選択し細胞数を計測した．各計測フレームは上端

が大脳表面，下側が白室，側面が皮質表面に垂直になるようにし，免疫染色での陽性細胞の計測は顕微鏡下に行った．関心領域の位置は，FFI実験時の赤外線透過像にてFFIの計測部位と位置合わせを行い，また連続切片のHE染色にて同部の病理組織学的特徴の確認も行った．

データ解析

統計学的解析にはIBM SPSS Statics 18を使用し，データの比較はMan-Whitney U testを行い，回帰分析により相関関係はそれぞれ検定を行った．なお$p < 0.05$を統計学的に有意と判断した．

結　　果

フラビン蛋白蛍光イメージングによる神経活動の大脳皮質内伝播所見

てんかん群の組織では，強いフラビン蛋白蛍光反応が刺激部から皮質の層に沿って水平方向に速やかに伝播してゆく特徴的な現象が全例に観察され，非てんかん群の組織では，同反応は刺激した部位に限局し伝播することなく刺激終了とともに消失した（**図1A**）．スライス標本上でフラビン蛋白蛍光信号が0.5％以上の変化を示した範囲を伝播域と定義しその範囲を計測したところ，てんかん群の伝播域は非てんかん群より有意に広く（$p = 0.008$），$\Delta F/F_0$の最大値は2群間に有意な差は得られなかった（$p = 0.25$）（**図1B**）．

カルシウム結合蛋白陽性細胞の分布

免疫組織学的検討は，組織の状態から10例中7例（てんかん群5例，非てんかん群2例）で可能であり，全例においてPV陽性細胞は皮質内第Ⅱ-Ⅴ層に広く分布し，CB陽性細胞とCR陽性細胞は第Ⅱ/Ⅲ層にその分布が観察された（**図2A**）．PV，CB，CR陽性細胞の陽性率をNeuN陽性細胞との比としてててんかん群と非てんかん群で比較したところ，PV陽性細胞の陽性率のみが非てんかん群（3.86 ± 1.49%）に比べててんかん群（2.02 ± 1.03％）で有意（$p = 0.006$）に低く，CBとCR陽性細胞の陽性率は2群間に有意な差がなか

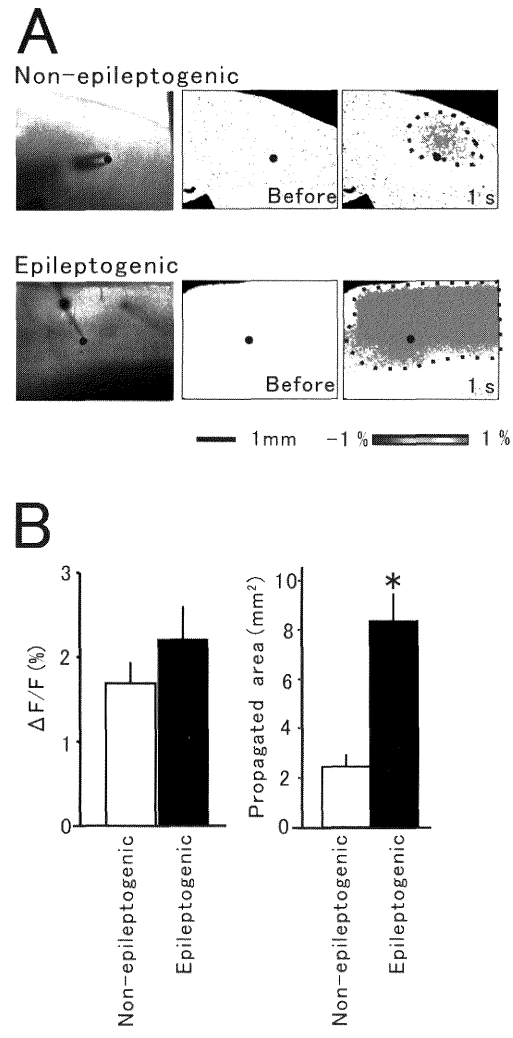

図1　フラビン蛋白蛍光イメージング（FFI）の実験結果

A：非てんかん群（Non-epileptogenic）とてんかん群（Epileptogenic）のFFIの代表所見（それぞれ症例3と症例6）．左から順にスライスの透過像，電気刺激直前と電気刺激後1秒後のFFIカラースケール像である．黒点が刺激部位であり，破線で囲まれた範囲が$\Delta F/F_0$で0.5％以上を示した伝播域に相当する．てんかん群において水平方向へ広い伝播を認めることが分かる．B：てんかん群（5例）と非てんかん群（5例）間での，$\Delta F/F_0$の最大値と伝播域（Propagated area）の比較結果．伝播域に有意な差（$*p = 0.008$）が認められた．

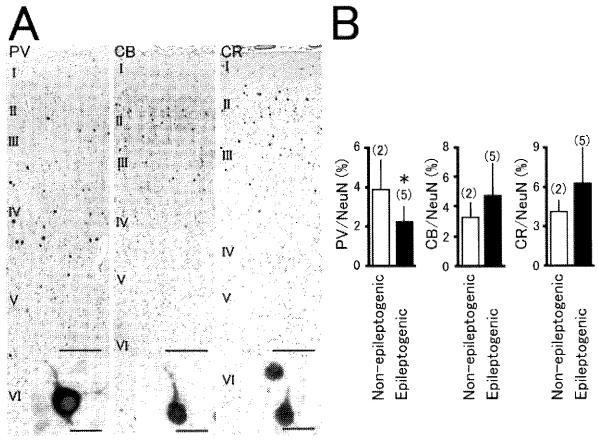

図 2　カルシウム結合蛋白陽性細胞の分布に関する免疫組織学的検討結果

A：カルシウム結合蛋白（PV: parvalbumin; CB: calbindin; CR: calretinin）の陽性神経細胞の典型例．大脳皮質の層構造をⅠ-Ⅵとして示した．PV 陽性細胞は，主にⅡ-Ⅴ層に存在し，CB や CR 陽性神経細胞は，主にⅡ-Ⅲ層に存在することが分かる．スケールバーはスライスの全体像で 200 μm，拡大像で 50 μm である．B：非てんかん群とてんかん群における，PV，CB. CR 陽性細胞の NeuN 陽性細胞に対する発現比率それぞれの比較結果．PV 陽性細胞のみが有意差（$^*p = 0.006$）を示した．

った（**図 2B**）．

PV 陽性神経細胞陽性率とフラビン蛋白蛍光イメージング所見の比較

PV 陽性細胞の発現と FFI 所見の比較の代表例を**図 3A** に示した．非てんかん症例に比べてんかん症例で，PV 陽性細胞が減少しており，FFI での皮質内伝播所見は広範におよんだ．PV 陽性細胞の陽性率は，FFI での伝播域と負の相関関係を認め（$R = 0.78$, $p = 0.04$），$\Delta F/F$ の最大値との相関は認められなかった（$R = 0.55$, $p = 0.20$）．

考　　察

本研究では，内在性信号の蛍光イメージング法である FFI を用いてヒト脳組織のスライス標本上で実験を行い，てんかん性皮質と非てんかん性皮質における皮質活動の伝播所見の違いを明らかにし，てんかん性皮質に特徴的な所見として皮質内の速やかな水平性伝播所見を可視化した．このような反応をヒト組織上で FFI のような光学イメージング法にて観察し，その特異性を非てんかん性組織との違いから示したのは本研究が初めてであり，我々はこの現象がてんかん性皮質自体の持つ特殊な性質を反映しているものと考えた．またこの FFI 所見の意義を検討するために，抑制性神経細胞の存在の指標となりうるカルシウム結合蛋白陽性細胞の標本内での発現率を調べ，FFI 所見との比較検討を行い，てんかん性皮質において PV 陽性細胞の発現が特に低下していること，そしてその減少の程度と FFI での伝播域の広さに関連があることを証明した．これら FFI で捉えた皮質活動の易伝播性所見と，従来から抑制系の指標として指摘されてきた PV 陽性細胞の変化の整合性が得られたことは，本研究においてててんかん性皮質の持つ特徴を光学イメージングと免疫組織学的検索といった二つの側面から検証できたことを意味する．

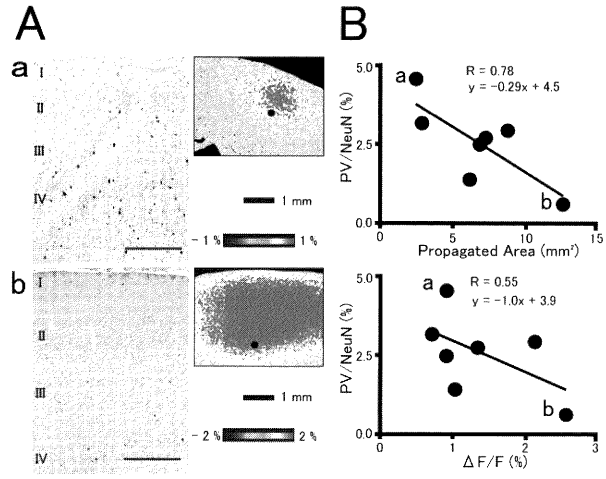

図3　免疫組織学的検討結果とフラビン蛍光イメージングの整合性

A：非てんかん群（a）とてんかん群（b）における，同一組織上のPV陽性細胞の分布とフラビン蛋白蛍光イメージング結果の代表例．B：NeuN陽性細胞に対するPV陽性細胞の陽性率とフラビン蛋白蛍光イメージングの実験結果の相関関係．PV陽性細胞の陽性率は，伝播域と相関傾向にあった（$R = 0.78$，$p = 0.04$）ものの，$\Delta F/F_0$の最大反応には関係しなかった（$R = 0.55, p = 0.20$）．

光学イメージングを用いた脳皮質内の神経活動伝播所見の観察法は，その時空間解像度の高さからも神経活動のパターン観察に適した方法と言えるが，ヒト大脳皮質を対象とした研究報告はいまだわずかである．特殊な電圧感受性染色物質を用いた方法も報告されているが[12]，今回我々が行ったFFI法などの内在性物質の発する特殊波長を利用した光学イメージング法は，外在性染色物質を必要としない点で，標本そのものに対する細胞毒性や染色の不均一性などの実験に伴う問題点を回避できることが利点である[1)2)]．またFFI法は，活動神経細胞内のミトコンドリア内での代謝産物であるフラビン蛋白の変化を観察しており，脳の神経生理学的反応の検討に適している．既に動物実験においてFFI法を応用してさまざまな生理学的反応を可視化して来たが[1)4)−7)]，本研究ではヒト大脳組織から脳腫瘍の手術時に採取した皮質組織を対象とし，摘出直後に細胞を死滅させることなく実験室へ搬送し作成した標本を用いて実験を行い，ヒトてんかん性脳組織に特徴的な皮質内の水平方向への神経活動伝播所見を可視化することができた点が画期的である．現在一度に実験が行える組織はまだ小さく，さらに広範囲の検討を行うにはさらなる技術の改良を要するが，本方法の応用によりてんかん性皮質の持つ生理学的特徴の新たな解明が進むことが期待される．

てんかん性組織では一般的に，神経回路における興奮と抑制の不均衡が発作の形成機構に関与すると考えられており[13)14)]，その意味で各大脳皮質層における抑制性神経細胞の分布を調べるには，PV，CB，CRといったカルシウム結合蛋白陽性細胞，中でもPV陽性細胞の減少や損失がその指標として重要であることが，てんかん動物モデルやてんかん症例の海馬や新皮質の検討を通して報告されてきた[15)16)]．本研究での免疫組織学的検討におけるCB，CR陽性細胞の第Ⅱ-Ⅲ層における発現や，PV陽性細胞の第Ⅱ-Ⅴ層へ分布所見は従来の報告と一致しており[10)17)18)]，その中で

もPV陽性細胞の発現低下がFFIでの伝播域の拡大所見と関連していたことは，PV陽性細胞が錐体細胞の興奮性を制御するのに最も強力な抑制作用を含むとする過去の知見とも一致する[8)19)−21)]．PV陽性細胞は形態学的にはバスケット細胞とシャンデリア細胞に分類され，錐体細胞にシナプスを形成する部位はそれぞれ異なるが[10)18)22)]，いずれにしてもその軸索分枝は水平方向に指向性があり軸索終末は第Ⅱ-Ⅵ層に分布するとされることから[23)−26)]，PV陽性細胞の減少所見は，錐体細胞間の水平方向への興奮伝播の制御能の低下を反映している可能性もある．また，てんかん性組織におけるPV陽性細胞の減少に関わる機序もいまだ不明な点であるが，てんかん性活動の存在そのものによる二次的な変化である可能性も考えうる．

本研究結果は，てんかん性組織の持つ易興奮性や活動の伝播に関する性質を考える上で興味深い所見となった．FFIを用いた実験では，従来から$GABA_A$拮抗薬であるbicuculline存在下での脳組織の電気生理学的検討により想定されて来たてんかん性皮質における易伝播性[27)−29)]を可視化し，この現象が非てんかん性組織との間に明らかな差があることを示した．てんかん群においてbicuculline使用下で活動の伝播域が有意に広くなる所見は，易興奮性・易伝播性に関連するその組織自体の特徴を反映していると考えられ，さらにFFI所見と免疫組織学的所見の間に見られた整合性は，皮質組織の易興奮性や易伝播性の獲得と，同組織におけるGABA作動性抑制性神経細胞の欠落という二つの事象の相互の関連性を示唆し，これらがお互いに干渉し合いそれぞれの所見を強める方向に作用することで，てんかん原性や難治性が獲得されてゆく可能性が考えられる．本実験に用いた標本は，てんかん原性部として完全に同定されたものではなく，また原疾患も一様ではないため，てんかん原性に関してこれ以上の考察を加えうるものではないが，本研究で我々が取り組んだ光学イメージングや免疫組織学的検討などを併せ行った多角的アプローチ法は，今後のてんかん原性の研究において新たな知見を提供するものと確信する．

謝　辞

本研究のご指導とご支援を頂きました新潟大学脳研究所神経病理学教室の北浦弘樹先生，同生命科学リソース研究センターの柿田明美准教授に深謝いたします．

引用文献

1）Shibuki K, Hishida R, Murakami H, Kudoh M, Kawaguchi T, Watanabe M, Watanabe S, Kouuchi T and Tanaka R: Dynamic imaging of somatosesory cortical activity in the rat visualized by flavoprotein autofluorescence. J Physiol 549: 919-927, 2003.

2）Haglund MM and Hochman DW: Optical imaging of epileptiform activity in human neocortex. Epilepsia 45 Suppl 4: 43-47, 2004.

3）Kitaura H, Hishida R, Kudoh M, and Shibuki K: Activity-dependent persisting modification of polysynaptic neural circuits involving layer V pyramidal neurons in rat auditory cortex in vitro. Eur J Neurosci 19: 356-364, 2004.

4）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 17: 267-271, 2006.

5）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 23: 1365-1376, 2006.

6）Kubota Y, Kamatani D, Tsukano H, Ohshima S, Takahashi K, Hishida R, Kudoh M, Takahashi S and Shibuki K: Transcranial photo-inactivation of neural activities in the mouse auditory cortex. Neurosci Res 60: 422-430, 2008.

7）Tohmi M, Takahashi K, Kubota Y, Hishida R and Shibuki K: Transcranial flavoprotein fluorescence imaging of mouse cortical activity and plasticity. J Neurochem 109 Suppl 1: 3-9, 2009.

8）Andressen C, Blumcke I and Celio MR: Calcium-binding proteins: selective markers of nerve cells. Cell Tissue Res 271: 181-208, 1993.

9）DeFelipe J: Neocortical neuronal diversity: chemical heterogeneity revealed by colocalization studies of classic neurotransmitters, neuropeptides, calcium-binding proteins, and cell surface molecules. Cereb Cortex 3: 273-289, 1993.
10）DeFelipe J: Types of neurons, synaptic connections and chemical characteristics of cells immunoreactive for calbindin-D28K, parvalbumin and calretinin in the neocortex. J Chem Neuroanat 14: 1-19, 1997.
11）Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G and Wu C: Interneurons of the neocortical inhibitory system. Nat Rev Neurosci 5: 793-807, 2004.
12）Albowitz B, Kuhnt U, Kohling R, Lucke A, Straub H, Speckmann EJ, Tuxhorn I, Wolf P, Pannek H and Oppel F: Spatio-temporal distribution of epileptiform activity in slices from human neocortex: recordings with voltage-sensitive dyes. Epilepsy Res 32: 224-232, 1998.
13）Engel J Jr: Excitation and inhibition in epilepsy. Can J Neurol Sci 23: 167-174, 1996.
14）Bernard C, Hirsch JC and Ben-Ari Y: Excitation and inhibition in temporal lobe epilepsy: a close encounter. Adv Neurol 79: 821-828, 1999.
15）Best N, Mitchell J, Baimbridge KG and Wheal HV: Changes in parvalbumin-immunoreactive neurons in the rat hippocampus following a kainic acid lesion. Neurosci Lett 155: 1-6, 1993.
16）Zhu ZQ, Armstrong DL, Hamilton WJ and Grossman RG: Disproportionate loss of CA4 parvalbumin-immunoreactive interneurons in patients with Ammon's horn sclerosis. J Neuropathol Exp Neurol 56: 988-998, 1997.
17）Zaitsev AV, Gonzalez-Burgos G, Povysheva NV, Kroner S, Lewis DA and Krimer LS: Localization of calcium-binding proteins in physiologically and morphologically characterized interneurons of monkey dorsolateral prefrontal cortex. Cereb Cortex 15: 1178-1186, 2005.
18）DeFelipe J: Chandelier cells and epilepsy. Brain 122: 1807-1822, 1999.
19）DeFelipe J, Hendry SH and Jones EG: Visualization of chandelier cell axons by parvalbumin immunoreactivity in monkey cerebral cortex. Proc Natl Acad Sci 86: 2093-2097, 1989.
20）Hendry SH, Jones EG, Emson PC, Lawson DE, Heizmann CW and Streit P: Two classes of cortical GABA neurons defined by differential calcium binding protein immunoreactivities. Exp Brain Res 76: 467-472, 1989.
21）Lewis DA and Lund JS: Heterogeneity of chandelier neurons in monkey neocortex: corticotropin-releasing factor and parvalbumin-immunoreactive populations. J Comp Neurol 293: 599-615, 1990.
22）Druga R: Neocortical inhibitory system. Folia Biol (Praha) 55: 201-217, 2009.
23）Lund JS and Lewis DA: Local circuit neurons of developing and mature macaque prefrontal cortex: Golgi and immunocytochemical characteristics. J Comp Neurol 328: 282-312, 1993.
24）Hendry SH and Jones EG: GABA neuronal subpopulations in cat primary auditory cortex: colocalization with calcium binding proteins. Brain Res 543: 45-55, 1991.
25）del Rio MR and DeFelipe J: Synaptic connections of calretinin-immunoreactive neurons in the human neocortex. J Neurosci 17: 5143-5154, 1997.
26）del Rio MR and DeFelipe J: Colocalization of parvalbumin and calbindin D-28k in neurons including chandelier cells of the human temporal neocortex. J Chem Neuroanat 12: 165-173, 1997.
27）Avoli M and Olivier A: Electrophysiological properties and synaptic responses in the deep layers of the human epileptogenic neocortex in vitro. J Neurophysiol 61: 589-606, 1989.
28）Hwa GG, Avoli M, Oliver A and Villemure JG: Bicuculline-induced epileptogenesis in the human neocortex maintained in vitro. Exp Brain Res 83: 329-339, 1991.
29）Telfeian AE and Connors BW: Layer-specific pathways for the horizontal propagation of epileptiform discharges in neocortex. Epilepsia 39: 700-708, 1998.

（平成22年12月21日受付）