

膜電位感受性色素を用いた脳神経活動解析法の開発

－海馬神経活動機構の定量網羅解析法の確立－

2020 年

富永 洋子

目次

略語・用語一覧	1
要旨	3
序論	5
第1章 海馬スライス CA1 野における光計測の定量的計測方法の確立	9
1-1 方法	11
1-2 結果と考察	20
1-3 結論	23
第2章 海馬 CA1 錐体細胞の膜電位応答分布と、信号伝播における GABA _A 作 動性フィードフォワード抑制の影響の光計測法による解析	25
2-1 方法	27
2-2 結果と考察	28
2-3 結論	38
第3章 VSD 光計測を用いた海馬 CA1 野からの長期増強 (LTP) の信号伝播 パターンの網羅的解析	40
3-1 方法	42
3-2 結果と考察	42
3-3 結論	47
総括	48
図表一覧	54
付録資料	81
謝辞	86
参考文献	88
発表論文	106

略語・用語一覧

ACSF: artificial cerebrospinal fluid [人工脳脊髄液]
AD: Alzheimer's disease [アルツハイマー病]
ASD(s): autism spectrum disorder(s) [自閉症スペクトラム障害]
apical dendrite: [尖端樹状突起]
APV, AP5: D-(-)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid
basal dendrite: [基底樹状突起]
Bic: bicuculline [ビククリン]
CNQX: cyanquixaline (6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione)
CA1: cornu ammonis 1
CA3: cornu ammonis 3
CCD: charge coupled device
CMOS: complimentary metal oxide semiconductor
DG: dentate gyrus [海馬歯状回]
E/I: excitation/inhibition [興奮／抑制]
EPSC: excitatory postsynaptic current [興奮性シナプス後電流]
EPSP: excitatory postsynaptic potential [興奮性シナプス後電位]
fEPSP(s): field excitatory postsynaptic potential(s) [フィールド興奮性シナプス後電位]
FET: Field Effect Transistor
GABA: γ -aminobutyric acid
GEVI(s): genetically encoded voltage indicator(s)
HFS: high-frequency stimulation [高周波刺激]
IPSP: inhibitory postsynaptic potential [抑制性シナプス後電位]
IPSC: inhibitory postsynaptic current [抑制性シナプス後電流]
LTP: long-term potentiation [長期増強]
L-LTP: late phase LTP [後期長期増強]
MOS: metal oxide semiconductor

NA: numeric aperture

PITX: picrotoxin [ピクロトキシン]

PR ratio, PRR: stratum pyramidale vs. stratum radiatum optical signal ratio [PR 比]

RMS: root mean square [二乗平均平方根]

SLM, St. lacunosum-moleculare: stratum lacunosum-moleculare [網状分子層]

S/N: signal to noise ratio [信号ノイズ比]

SO, St. oriens: stratum oriens [上昇層]

SO-A, St. oriens-alveus: stratum oriens-alveus [上昇層-白板]

SP, St. pyramidale: stratum pyramidale [錐体細胞層]

SR, St. radiatum: stratum radiatum [放射状層]

temporoammonic pathway: [TA 経路]

TBS: theta-burst stimulation [シータバースト刺激]

TTX: tetrodotoxin [テトロドトキシン]

VSD: voltage sensitive dye [膜電位感受性色素]

要旨

「記憶・学習」など脳の高次機能を理解するには、個々の神経活動の動作とともに、神経回路全体としての動作様式の解明が必要となる。これは脳活動をターゲットとする薬物開発にも重要である。伝統的な神経活動の計測手法は、電極を用いて個々の神経細胞の膜電位、膜電流変化 (細胞内微小電極法、パッチクランプ法等)、あるいは神経細胞集合フィールド電位 (fEPSP, fIPSP 等) を計測する電気生理学的手法である。いくつかの電極を組み合わせた多点電極システム (マルチ電極アレイシステム) も開発されているが、原理的に点計測であり、回路全体としての動作を知ることは困難である。

この問題を解決する方法として、膜電位光計測法がある。膜電位光計測法は神経細胞の第一義的な情報単位である膜電位に対応した光信号応答を得られるため、神経回路の時空間的な動作様式の解明に最も適している。この手法では、細胞への侵襲を抑えて、膜電位変化を直接捉えることが可能で、従来の電気生理学的手法による膜電位計測法の代替手段として非常に有用である。膜電位光計測法では、適切な計測系を構築することで、高い時間分解能を達成できる。また、光学系の選定によって脳神経回路全体という広範囲での計測と、個々の神経細胞構成要素の動態まで知ることが可能な高い時空間分解能を満たすことが可能である。

本研究は、膜電位光計測法の1つとして、膜電位感受性色素 (Voltage Sensitive Dye; VSD) を用いた光計測法を確立するための技術的な課題とその解決を示し、本光計測法の有用性を示した。

「記憶・学習」などの脳の高次機能において、海馬は重要な役割を担っている。その一方で構造が単純であり、脳スライス標本として電気生理及び膜電位光計測実験を行うのに適している。本研究では、ラット、マウスの海馬スライス標本に膜電位感受性色素を負荷し、海馬神経回路における安定した計測を行った。また計測データの解析方法を確立して、海馬神経活動の機構解析法を確立した。

第1章では、定量的光計測法の確立に必要な技術的な課題とその解決について示した。第2章以降は、第1章において確立させた計測方法を元に光計測データについての検討を行い、神経回路全体の動作を検討するのに適した方法であることを示した。

第2章では、ラット海馬スライス標本のCA1野から記録されたVSD信号が、神経回路を構成するCA1錐体細胞の膜電位応答と対応することを示した。さらに、信号伝播におけるGABA_A作動性フィードフォワード抑制の影響を示した。

第3章では、マウス海馬スライス標本で長時間(12時間)を超える計測を可能とし、海馬CA1野における後期長期増強(L-LTP)を伴う神経信号伝播パターンの網羅的な解析を示した。

本研究では、VSD光計測法による脳神経活動解析法を確立し、海馬神経活動の機構解析、薬理的解析の定量解析基盤を築くことができた。本手法を駆使することで、精神神経疾患の病態解明、機構解析、治療薬開発、化学物質暴露の影響解明に貢献できる。

序論

数千億ともいわれる神経細胞からなる脳の神経回路活動を知ることは、脳活動の変調、異常に起因する各種の精神神経疾患の予防、治療などの薬物開発を行う上で必須である。長寿高齢化社会では、生涯にわたって脳の活動を健全に保つことは、健康寿命の延長にとっても必須であり、高齢化に伴う各種の疾患、アルツハイマー症を代表とする認知症の発症過程の解明や治療薬の開発には、脳の特に記憶に関連する海馬神経回路等の機能解析が欠かせない。また、複雑化する現代社会で重大な課題となってきた、発生発達期に顕在化する自閉症スペクトラム等の脳回路の機能変調を計測する手段が必須である。このような機能解析には、従来の点計測である電気生理学手法に代わるイメージング法の必要性が課題となってきた。それを解決する手法が、脳の第一義的な情報である膜電位を可視化する膜電位光計測法である。その一つに膜電位感受性色素 (Voltage Sensitive Dye; VSD) による光計測法がある (Grinvald and Hildesheim, 2004; Homma et al., 2009; Tominaga et al., 2013, 2018)。

光計測法は、最初は膜興奮に伴う膜の光学特性の変化の単一点計測から始まった (Hill and Keynes, 1949; Cohen et al., 1968; Cohen et al., 1970)。その後、1970年代初期、ウッズホール海洋生物学研究所 (MBL) の Larry Cohen らの研究グループが、現在の基礎となる技術を開発した (Cohen et al., 1968; Tasaki et al., 1968; Salzberg et al., 1973; Waggoner et al., 1973; Davila et al., 1973; Ross et al., 1974)。これが VSD による計測の始まりである。この技術を用いて、1980年代から脳のリアルタイム回路機能活動を捉える研究が行われた (Grinvald et al., 1981, 1982, 1988; Ichikawa et al., 1993a; Tanifuji et al., 1994; Vranesic et al., 1994; Iijima et al., 1996)。広視野で広範囲を計測可能とする光計測法は、遺伝子改変や薬物投与による病態動物モデルにおいて、その神経回路動態を検証することを可能とした (Tanemura et al., 2002; Mann et al., 2005; Suh et al., 2011; Juliandi et al., 2016)。

膜電位感受性色素 (VSD) による光計測法は、上述のように半世紀以上の歴史があるにも関わらず、この手法が一般に広く使われるようになったのは、2000年頃からである。これは VSD 光計測法には多くの技術的な課題があったためである。本研究は、こ

のような技術的な課題を解決し、光計測法による脳の生理機能の定量的な解析を可能にした。

脳活動計測を行うツールとしての VSD 光計測法を確立するために、(1) カメラシステムの検討、(2) 高効率の光学系の確立、(3) VSD の選択、(4) 染色法の確立、(5) 脳スライス標本の作成手順の確立および生理活性の維持 (Tominaga et al., 2002)、を可能とし、これらの工夫による長時間の安定した計測を可能とした (Tominaga et al., 2018)。光計測法により取得したデータは膨大であり、(6) データ解析のための解析用ソフトウェアも開発した。本研究では、サブミリ秒の連続データを数千フレームに渡って記録する。実験によっては、1 スライスからの 1 実験データで、データファイルが 100 を超える膨大なデータ量 (1 スライスからの 1 実験データが合計 2 GB 程度) となり、これを実験群と対照実験群で、それぞれ数枚から 10 数枚のスライスから取得したデータを統計処理し、比較解析する必要がある。このような大規模なデータを扱うための解析用ソフトウェアの開発は必須であり、数値解析用プラットフォーム (IgorPro, WaveMetrics Inc., OR) 上のマクロソフトウェアとして開発した (Tominaga et al., 2002b)。

神経活動を計測するための光計測システムの要件として、サブミリ秒の膜電位変化が計測できる高速時間分解能をもつカメラシステムが必要である。一方、回路全体のダイナミクスを計測するためには、回路全体が視野に入り、かつ高空間分解能で計測することも要求される。VSD 信号は非常に小さいので、その信号の変化 ($10^{-5} \sim 10^{-3}$) を計測するためには極めて低ノイズで安定に計測可能な光学系システムを構築する必要がある (Tominaga et al., 2000, 2013)。また、蛍光物質としての VSD そのものの侵襲性 (蛍光発生に伴うラジカルの発生など) の課題 (Schaffer et al., 1994) も解決する必要がある。さらには、測定される光信号の生理学的な意味を、正確に解釈することも必要であった (Tominaga et al., 2009)。

本研究では、ラット、マウスの脳スライス標本を使用して光計測をおこない、得られたデータを従来の電気生理学的方法と比較して定量的に評価できるようにシステムを較正し、安定して長時間計測可能とすることを目指した。電気生理学的に測定されたパラメーターが、光学記録法ではどのように視覚化され、そのデータをどのように

捉えるべきかを検討して、光信号の定量化を示し、本光計測法の有用性を示した (Tominaga et al., 2000, 2009, 2018)。

本研究では、海馬スライス標本を使用した。海馬は、記憶・学習の鍵となる神経回路であり、現在まで最もよくその生理機構が調べられてきた組織である。海馬は層状構造をなしており (Andersen et al., 1969b)、とくに海馬スライス標本としてよく使われる横断海馬スライス標本 (transverse hippocampal slice preparation) の CA1 野は、その層構造と錐体細胞の各部位が対応している。海馬 CA1 野では、計測した各層からの光信号を CA1 錐体細胞の特定の部位の膜要素に起因する光信号として捉えることを可能とするため (Witter, 1993)、光計測を用いた神経回路における神経統合の研究に適している。例えば、海馬 CA1 野の放射状層 (stratum radiatum; SR) の光信号を先端樹状突起 (apical dendrite) の応答として、錐体細胞層 (stratum pyramidale; SP) の光信号を細胞体の応答として評価し、海馬 CA1 野の錐体細胞活動の統合評価が可能となる。このような利点を活かして多くの VSD による海馬光計測研究が行われている (Grinvald et al., 1982; Barish et al., 1996; Tominaga et al., 2000, 2001, 2002b; Inoue et al., 2001; Mochida et al., 2001; Aihara et al., 2005; Mann et al., 2005; Chang and Jackson, 2006)。

第 1 章での検討の結果、VSD として、Di-4-ANEPPS (分子式： $C_{28}H_{36}N_2O_3S$, 分子量：480.66) を採用した。本色素の構造式と動作の模式図を添付 Fig. 1 に示す (添付 1)。Di-4-ANEPPS は、細胞膜の脂質二重層に脂質分子と同方向に配向する electrochromic dye (Peterka et al., 2011) とされる色素分子の一つである。この分子の発光団からの蛍光量は細胞膜内外の電位差 (膜電位; membrane potential) の変化に応じて変化する。蛍光量の変化は分子内の電荷移動に依存するので高速の分子プローブとして動作し、サブミリ秒 (応答時間はナノ秒オーダー) で膜電位変化を計測することができる (Loew et al., 1985, 1992)。本研究では、すべてこの色素を用いている。この色素は、530 nm の励起光、610 nm の蛍光では、膜の脱分極に対して蛍光量の減少、膜の過分極に対して蛍光量の増大を起こす。したがって、本研究で光信号として示すときには膜電位変化の極性に合わせて蛍光の減少を正の方向の変化として示した。蛍光そのものの大きさを議論する場合は「蛍光量」として本来の極性で表記した (第 2 章)。

本研究成果で確立した評価法を用いて、新規開発の認知症治療薬を投与したマウス海馬神経回路における神経回路ダイナミクス変化の評価を行った (小野薬品との共同研究、結果未公表)。また、この評価法によってアルツハイマー病の原因遺伝子による海馬活動の変化、自閉症の原因因子の可能性のある化学物質を投与したマウスでの海馬神経回路の変調、遺伝子改変による海馬回路の活動変化、海馬周辺回路での可塑的活動変化も明らかになった (Tanemura et al., 2002; Tominaga et al., 2009, 2018; Suh et al., 2011; Juliandi et al., 2016; Kajiwara et al., 2019)。

このように本研究によって、それまで困難であった光計測法による脳神経組織の詳細な機構解析を行うことが可能になり、化学物質、脳遺伝子変異等各種の要因による脳神経回路の変調機構を定量的に明らかにすることが可能になった。

第1章 海馬スライス CA1 野における光計測の定量的計測方法の確立

(本章の内容に関しては、*J. Neurosci. Methods* 102:11-23 (2000) に発表済み)

神経回路全体としての生理学的な動作様式とその改変は、中枢神経系が情報を処理し、高度に組織化された行動を制御する能力において中心的な役割を果たしている。従来の電気生理学的方法では空間分解能が制限されており、この制限を克服するためにいくつかの光計測法が開発されてきた。神経情報の伝達には膜電位の変化が重要な役割を果たしているため、神経回路を調べるには膜電位の可視化解析が有効な方法となる (reviews, Cohen et al., 1978, 1986; Grinvald et al., 1988; Salzberg, 1989; Ichikawa et al., 1993)。この方法は、*in vitro* 脳スライス標本において、たとえば神経機能の連続性 (Tanifuji et al., 1994; Iijima et al., 1996) や、単一細胞での機能分化 (Zecevic, 1996)、遺伝子改変とノーマル動物の脳における機能ドメインの存在 (Watanabe et al., 1998; Demir et al., 1999) を調べるなど、広く使われてきた。また、海馬スライス標本における神経信号の伝搬についても、光計測が使われてきた (Grinvald et al., 1982; Barish et al., 1996; Nakagami et al., 1997; Sekino et al., 1997; Kojima et al., 1999)。海馬における高頻度刺激誘発 LTP について、VSD を用いた光計測法で測定した研究も報告されている (Saggau et al., 1986; Bonhoeffer et al., 1989; Momose-Sato et al., 1999)。

しかし、電気生理学的方法と比較した場合、*in vitro* 標本の光計測は定量的な計測方法として確立するには至っていなかった。このため非侵襲的多点同時記録方法としての光信号計測には大きな可能性があるにもかかわらず、脳スライス標本の神経活動を計測するためのツールとして広く使われることはなかった。この理由は、主に (1) 信号の安定性が低い、(2) VSD 使用に伴い発生する問題がある、ことである。(1) は計測する信号が微弱であることに起因する。光計測システムに高度な技術要件が必要とされる。撮像装置は、神経細胞の活動による高速な膜電位変化 (Ca^{2+} 信号がサブ秒オーダーであるのに対し、神経細胞活動による高速な膜電位変化はサブミリ秒のオーダーである) を記録するために高い時間分解能が要求される。また、信号が微小なためより低いノイズの条件でないと計測できない (Ca^{2+} 信号が約 $10^{-2} \sim 10^{-1}$ であるのに対し、VSD 信号は通常 $10^{-5} \sim 10^{-3}$ である)。これらの要件により、光計測システムが不安定で信頼

性が低くなる傾向がある。(2)の問題もいくつかある。VSDを使用するための染色手順によっては、てんかん様過興奮を誘発させることがある。また、溶液の還流によりVSDが洗い流される問題や、VSDの漂白が起こる問題など、膜内のVSDの存在期間が短いことも、光信号の定量的評価を困難にしてきた。蛍光発生に伴うラジカルの発生(Schaffer et al., 1994)や、VSDによっては、イオンチャンネル型 GABA_A 受容体に影響を及ぼすことも報告されている(Mennerick et al., 2010)。

本研究では、生理学的実験要件を満たし、再現性の高いVSD光計測法の確立を目指した。そこで、(1)新規のCCDベースのデジタル光計測システムの開発、(2)新規の落射蛍光光学系の開発、(3)スライス標本作成手順の検討・改善、(4)VSDとしてDi-4-ANNEPSの選択と染色プロトコルの検討・改善、(5)スライス標本の生理活性を維持するための新規チャンバーの設計を行い、安定した光計測が可能となった。

次に、ラット海馬スライス標本を使用してシステムを較正し、計測で得られた値が従来の電気生理学的方法と比較して、安定して計測・評価可能であることを検討した。

以上により、膜電位感受性色素 (Di-4-ANNEPS) による光計測法は、ラット海馬スライス標本において、従来の電気生理学的手法に代わりうる手法であることを示すことができた。

1-1 方法

本光計測法を確立するために検討した各項目について、以下に説明する。尚、電気生理学的手法については、添付資料 (添付 2) に示した。

尚、すべての動物実験は、「徳島文理大学における動物実験と動物の飼養及び保管等に関する規定」と理化学研究所の「動物実験実施規定」、および米国国立衛生研究所の実験動物の管理と使用ガイドによって承認されたプロトコルに従って実施した。使用する動物の数と苦痛を最小限に抑えた 3R の原則に則り実験を実施した。

1-1-1 脳スライス標本における神経活動の光計測用カメラシステムの検討

VSD 光信号を記録するために必要な光信号検出装置の技術要件には、ダイナミックレンジ、空間分解能、および時間分解能 (撮像速度) が含まれる。特に、より大きなシグナルを得るために、装置のダイナミックレンジは、神経活動の生理学的記録にとって重要である。

光信号検出装置の技術要件について、2000 年の本研究で使用した CCD ベースのカメラシステムを基に、フォトダイオードアレイ (e.g. Cohen and Leshner, 1986; Grinvald et al., 1988)、および MOS ベースのモノリシックアレイ (Ichikawa et al., 1993a) など、他の光計測システムと比較して検討した。

撮像装置は、光検出器に投射される光強度の変動を測定する。検出された変動 (ΔF) には、生理学的信号 (膜電位) の変化 (dF_{signal}) および非生物学的要因によるノイズによって引き起こされる変動が含まれる。 dF_{signal} は光の強度 (F) に比例する。

$$dF_{\text{signal}} \propto F$$

Fig. 1-1 は、蛍光強度と光信号 (dF_{signal}) の関係を示している。光検出器での蛍光強度の関数として、光信号が 10^{-2} から 10^{-3} の変化を示す場合のグラフを実線でプロットした。次のセクションに示すように、Di-4-ANEPPS からの光信号は最大で 10^{-3} オーダーの変化である。

ノイズの主な原因の1つは、光の量子的性質による光量子ノイズ (photon-shot noise) (dF_{shot}) である。光量子ノイズは、光強度の平方根に比例する。

$$dF_{\text{shot}} \propto \sqrt{F}$$

Fig. 1-1 の太線は、光量子ノイズと光強度の関係を示したものである。太線より下では、信号は光量子ノイズ (Fig. 1-1 の斜線部分) によって隠されており、信号の定量的評価には使用できない。

もう1つの主要なノイズは、暗時ノイズ (dark noise) (dF_{dark}) である。暗時ノイズは、各光検出器または装置に固有であり、光の強度には依存しない。

$$dF_{\text{dark}} = \text{定数}$$

既存の機器 (フォトダイオードアレイ、MOS ベースのモノリシックアレイ、CCD ベースの高速カメラ、Cooled CCD カメラ) の一般的な暗時ノイズレベルを Fig. 1-1 の点線で示した。CCD の暗時ノイズレベルは フォトダイオードの熱ノイズのみが原因となる。フォトダイオードの熱ノイズに加えて、フォトダイオードアレイの暗時ノイズには、読み出しアンプ回路固有の熱ノイズが追加され、MOS ベースのモノリシックアレイの場合は、FET スイッチングゲートでのリーク電流がノイズとして追加される。各撮像装置のダイナミックレンジの下限は、実際には暗時ノイズと光量子ノイズの2つの要素で決定される。ダイナミックレンジの上限は、フォトンウェルの深さ (CCD および MOS ベースのモノリシックアレイ) または読み出しアンプのダイナミックレンジ (フォトダイオードアレイ) によって決定される。各装置の一般的なダイナミックレンジを Fig. 1-1 に示した。

光強度を増加させると、信号 (ΔF) は増加する (Fig. 1-1)。一方で、光強度を高くすると、標本への光誘起損傷と VSD 漂白を起こしやすく、安定した生理学的計測を妨げる。実際には、光検出器で十分な光を集めることは困難である。新しい光学系を備えた検出器で $10 \mu\text{W mm}^{-2}$ 以上の蛍光を生成するには、最大出力で 150 W のハロゲンランプや高輝度 LED を使用する必要がある (1-2-2. 参照)。レーザーや Xenon は光源自体のノイズが大きく、本光計測法での利用は難しい。

フォトダイオードと MOS ベースのアレイは、比較的高い暗時ノイズのレベルを超える必要があり、光強度が十分に高い場合 (光検出器で約 $100 \sim 1000 \mu\text{W mm}^{-2}$) におい

て、ダイナミックレンジ内でより高い S/N の光信号を測定できる。対照的に、CCD ベースのシステムは暗時ノイズレベルが低いため、低い光強度 ($\sim 10 \mu\text{W mm}^{-2}$) で使用可能である。しかしながら、ダイナミックレンジは低く、 dF_{shot} の影響を強く受け、S/N は決して優れているわけではない。ただし、各試行中に信号が統計的に同一である場合、加算平均手法を用いて S/N の低さを改善することが可能となる。Cooled CCD は、暗時ノイズが最も低い、光量が低い時は光信号が光量子ノイズに隠れ、結果的に通常の CCD の S/N と同程度の信号しかとれず、VSD 信号の測定にはほとんど利点がなかった。そこで、安定した計測を確立するという目標を達成するために、光検出デバイスとして CCD を使用することを決定し、CCD ベースの光計測システムを構築した。

本研究では、市販の CCD チップを選択した。市販の CCD チップは、大量生産により供給が安定し、専用チップよりも価格に対して優れた性能を発揮すると考えられる。ほとんどの 1/5~1/3 インチのインターライン CCD チップが高速充電駆動パルス (最大 100 MHz) に追従できることを確認し、その中で ICX076AL (1/5 インチ; Sony Inc., Tokyo, Japan) を選択した。ICX076AL では量子効率 ($\sim 45\%$) で撮像装置に必要な最適な電荷転送レートが得られた。電気回路の詳細は、以前に (Takashima et al., 1999) によって説明された回路に近く、さらに最新の半導体技術を使用してフレームとデータの転送速度を上げた。

このデバイスには、 248×380 ピクセルで構成される $2 \times 3 \text{ mm}$ の光検出領域がある。検出器のダイナミックレンジの上限と撮像速度を上げるために、 4×4 ピクセルを一つのピクセルにビニングした。結果として得られるフォトンウェルの深さは 5×10^5 であり、撮像速度は 0.7 ms / frame に増加した (本システムは MiCAM01 として BrainVision Inc., Tokyo, Japan より市販された)。本システムの空間分解能 (60×90 ピクセルの有効な光検出領域) および時間分解能は、他のタイプの光検出システムとほぼ同じであった。MOS ベースのモノリシックアレイでは、撮像速度が 0.6 ms / frame の 128×128 ピクセルの解像度が実現された実績がある (Ichikawa et al., 1993; Iijima et al., 1996) が、通常はより良い S/N を得るために 64×64 ピクセルが使用される。フォトダイオードアレイでは、 0.5 ms / frame で 34×34 ピクセルの解像度が達成されている (Hirota et al., 1995)。これらの仕様は、神経膜の長さ定数および神経膜電位イベントの時間スケール

と比較して、脳組織の神経活動を可視化するために必要な要件を満たしている。Fig. 1-11,12 および第3章で使用した現行システムでは、さらに改良を加えた CMOS カメラ (MiCAM Ultima および MiCAM02, Brainvision Inc., Tokyo, Japan) を使用した。

カメラシステムは、PC ベースのコンピューターによって制御した。光信号は、PC ベースのコンピューターと Macintosh コンピューターで、カスタムメイドのソフトウェアまたは Igor Pro (WaveMetrics Inc., OR) を使用して、解析用のプロシジャおよびプログラムを開発し、オフラインで分析した。

1-1-2 顕微鏡システムの開発

タンデムレンズ構成 (Ratzlaff and Grinvald, 1991 も参照) の高開口数の落射蛍光光学系を開発した (Fig. 1-2)。本光学系の開発により、色素の退色や標本の光誘起損傷を避けるための励起光を最小限に抑え、かつ高 S/N の達成を可能とした。本システムでは、変更を加えた 35 mm カメラレンズ ($f=50$ mm, F/1.4, Nikon) を対物レンズとして使用し (2000 年当時)、双眼顕微鏡の対物レンズ ($f=55$ mm, $\times 1.0$ for Leica MZ-APO, Leica Microsystems) を投影レンズとして使用した。システムの最終倍率は 1.5 倍となった。適切な集光レンズを備えたライトガイドを用いて、ハロゲン光源 (150 W; MHF-G150LR, Moritex Corp., Tokyo, Japan) からの光を励起フィルター ($\lambda=530 \pm 10$ nm) を通して使用した。励起光はダイクロイックミラーで反射し、対物レンズを通して試料を照射する。試料からの蛍光は、ダイクロイックミラーを透過し、吸収フィルター ($\lambda > 590$ nm) を通って CCD センサーに投影される。明視野照明でスライス標本に電極を配置する必要がある場合は、双眼顕微鏡 (Leica MZ-APO, Leica Microsystems) を使用して、光路を回転させてダイクロイックミラーに反射する画像を確認した。尚、このシステムは現在市販されている (THT-01, BrainVision Inc., Tokyo, Japan)。その後の改良により、目的に応じて複数のレンズを利用可能とした。特に、低倍率の水浸対物レンズ ($\times 5$, NA 0.60, オリンパス製, $f=20$ mm, NA 0.35, Brainvision Inc., Tokyo) は、回路全体の活性を測定しながら、流体の動きによる機械的ノイズの回避を可能とすることで、海馬 CA1 スライス標本の計測に適したレンズとなった。さらに、低倍率で高 NA (開口

数) を実現するために、光学系の入射瞳を大きくとり、2つの対物レンズと広いダイクロミックミラーを組み合わせて、開口数の高い落射蛍光光学系を実現した。Fig. 1-11,12 および第3章で使用した現行システムでは、上記の光学系の改良と、光源としてフォトダイオードフィードバック制御システム (Nishimura et al., 2006) を備えた LED 照明システム (LEX-2G, Brainvision, Inc., Tokyo) を使用することにより、励起光を最小限に抑えながら、高速光計測に十分な量の蛍光を捕捉することを可能とした (最大 10,000 frame / sec)。

現行の光学系システムの写真、レンズ群、記録システムの概略図を Fig. 1-3 に示した。

1-1-3 スライス標本作成の確立

光計測法において、光障害などを生じない生理活性をもった脳スライス標本の作成法を確立した。本作成法により、効率的な膜電位感受性色素の負荷が可能になり、安定して長時間の計測を行うことが可能になった。

第1、2章ではラット、第3章ではマウスの脳スライス標本を使用した。ラットは脳も大きく計測法の確立のためには有用であり、現在でもラットのみで観察される脳機能があると言われている。近年、マウスの遺伝子改変動物の急速な進歩に合わせて、ラット海馬からマウス脳スライス標本へ計測の主体を変更した。ラットでの脳スライス標本の作成法とマウスでの脳スライス標本の作成法は、原則的に同じである。しかし、物理的な大きさの変化に合わせて手順の改善を行った。マウス脳スライス標本作成は、脳がラットと比較して小さく虚血条件に弱いため、細かい注意が必要となる。第1、2章のラット脳スライス標本は Wistar 系の雄ラット (4-5 週令 SLC またはクレア) から作成した。マウス脳スライス標本 (第1章 Fig. 1-10-12)、第3章の全ては C57BL6 系の雄マウス (4-5 週令 SLC またはクレア) から作成した。

1-1-3-1 脳スライス標本作成手順

海馬脳スライス標本の作成は以下の手順によった。

ラット (マウス) を深麻酔下で断頭して脳を取り出し、氷冷した人工脳脊髄液 (ACSF; 124 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgSO₄, 1.25 mM NaH₂PO₄, 26 mM NaHCO₃ and 10 mM グルコース, pH 7.4, 95% O₂ / 5% CO₂ 混合ガスでバブリング) で 5 分間冷却した。

ラット脳スライス標本作成時は、5 分間の脳の冷却後、小脳を切り離し、大脳縦裂で左脳と右脳を切り離す。左脳 (または右脳) の脳幹をリングピンセットで摘み、精巧なピンセットで硬膜を取り除く。その後、脳幹部を切除し、脳組織の前後 (海馬を含まない前頭葉部と後頭葉部) を切り落として、直方体の寒天ブロックにのせる。この処理で、脳組織をほぼ平らな状態でスライスすることが可能となり、海馬の形が揃った均質の脳スライス標本作成することが可能となった。

マウス脳スライス標本作成時は、脳が小さいこと、硬膜がラットほど硬くないことなどから、硬膜を取り除く作業は行わない。5 分間の脳の冷却後、小脳と海馬を含まない前頭葉部を切り離し、大脳縦裂で左脳と右脳を切り離してできた脳組織を、寒天ブロックにのせた。Fig. 1-4 に、マウス脳スライス作成時に、脳組織をのせるために使用する寒天ブロックと、寒天ブロックを作成するための治具 (テンプレート) のイラストと写真を載せた。治具に沿って整形した寒天ブロックの概略図を Fig. 1-5B に示した。Fig. 1-5 で示したように、この寒天ブロックにマウス脳ブロックをのせてスライス標本作成することにより、ほぼ歪みのない、常に海馬の形が揃った均質の脳スライス標本の作成が可能となった。

ラット、マウスとも、脳組織をマウントした寒天ブロックを、スライサーにセットする。海馬を周囲の皮質とともに、スライサー (752M Vibroslice, Campden Instruments Ltd., Lough-borough, UK; 現行システムでは Leica VT-1000 または VT-1200s を使用) で厚さ 400 μm (ラット脳スライス) 、または 350 μm (マウス脳スライス) のスライス標本を作成した。

各スライス標本は、常に 95% O₂ /5% CO₂ ガスでバブリングした ACSF に浸した状態で、Fig. 1-5E に示したアクリルリング (外径 15 mm、内径 11 mm。直径 13 mm のポリテトラフルオロエチレン (PTFE) メンブレンフィルター (オムニポア、JHWP01300、0.45 μm 孔、Millipore Corp., MA) を貼ったもの) (Tominaga et al., 2000, 2002a, 2002b, 2013) に移動させた。このとき、作成したスライス標本を傷つけないよう、細心の注意を払う必要がある。各スライスをアクリルリング上のメンブレンフィルターに移すと、スライス標本は容易にメンブレンフィルターに付着した。すべての処理はアクリルリングを保持して行うため、スライス標本は機械的な障害を受けなかった。細かいメッシュのメンブレンフィルターは、酸素と ACSF に対して十分な透過性を持っており、生理活性を維持することが可能である。アクリルリングに取り付けたメンブレンフィルターは濡れると半透明になり、明視野照明でスライスを見ることが可能となる。電極操作等の電気生理学的測定の妨げにはならないように、リングは薄く (1.0mm) 作製した。海馬スライス標本は膜に付着するため、水没型の計測用チャンバーにスライスを固定するための押さえや錘も必要なかった。

アクリルリングに置いたスライス標本は、常時 O₂/CO₂ ガスをバブリングさせた 28°C モイストチャンバーに移す (Fig. 1-6)。モイストチャンバーで 25 分保った後、室温に移す。染色は、全体で 1 時間保持した後に行った。

1-1-4 VSD の検討および染色

本研究を実施する前に、信号ノイズ比 (S/N) と安定性に基いて市販の VSD をスクリーニングした。VSD は細胞膜に埋め込まれるため、細胞毒性の可能性はある。また、スライス標本は無酸素状態になると、てんかん様過興奮を容易に誘発することが知られており (Balestrino and Somjen, 1986)、染色過程において、無酸素状態を避ける必要もあった。VSD 染色による細胞組織損傷を回避するために、一定時間の染色後に、染色液を洗い流す必要がある。また、組織の生理活性を保つために、染色後の脳スライス標本は、計測時には常に ACSF 還流液下におかれる。親水性の VSD (RH155, RH795 等) は、染めやすい一方で、一般的に洗い流されやすい性質を持つ。膜電位変

化の指標素子として、長時間、細胞膜にとどまり、適切かつ安定的に光信号を計測できる VSD の選択と、染色手順の確立が必要であった。本研究で用いた色素 (Di-4-ANEPPS; D-1199, Molecular Probes Inc. (現 Thermo Fisher Scientific Inc.)) は、比較的疎水性で脂溶性が高く、ACSF に溶解しにくいため、脳スライス標本を染色するのは容易ではなかった。しかし、本研究で確立した適切な手順を踏むと、色素は非常に安定し、膜内に長時間とどまることができた。染色時における脳スライス標本の無酸素状態を回避するために、脳スライス標本をアクリルリングにのせ、モイストチャンバー (Fig. 1-6) で十分な酸素供給と湿度を保った状態でスライス標本を染色した。Di-4-ANEPPS による光誘発毒性 (Schaffer et al., 1994) の兆候は認められなかった (Tominaga et al., 2000, 2018)。

1-1-4-1 VSD 染色手順

アクリルリングに VSD 染色液 [0.1 mM Di-4-ANEPPS (D-1199, Molecular Probes Inc. OR, USA), 2.7% エタノール, 0.13% Cremophor EL (Sigma), 50% ウシ胎児血清 (Sigma) および 50% ACSF] 100~110 μ l を静かにのせて各スライス標本を染色し、25 分間 (ラット脳スライス標本)、または 20 分間 (マウス脳スライス標本)、モイストチャンバー (Fig. 1-6) 内で、室温で保持する。その後、十分にバブリングした ACSF に、アクリルリングごとスライス標本を浸してすすいだ後、新しく用意した同様のモイストチャンバーに移す。脳スライス標本は、室温で少なくとも 1 時間保持した後に、実験に供した。

1-1-5 計測用チャンバーシステム

上記のアクリルリング (Fig. 1-5E) をそのまま使用できる計測用チャンバーを開発した (Fig. 1-7) (Tominaga et al., 2000, 2002a, 2013)。アクリル製の計測用チャンバーは、アルミニウム製の加熱ブロックで囲まれており、ACSF の温度を 31°C に一定に保った。バブリングした ACSF は、1 ml/分の流速で還流するようにポンプを設定した。ACSF は、加熱ブロックに埋め込まれた細いチューブから、気泡トラップチューブを通り、計測

用チャンバーへと流れる。計測用チャンバーに流れ込んだ ACSF は、スライス標本をのせたメンブレンフィルター (アクリルリングで保持) の下を流れた後に、細い水路を介してスライス標本の上を流れる。この水路は閉じているので、確実に、常に酸素を含んだ ACSF の供給を可能とした。アクリルリングは O リングにはめ込んで計測用チャンバーに保持しているため、この部分もシーリングされ、ACSF は常にスライス標本の下から上へと一方向に流れて、最後に ACSF はアウトレットチューブから吸い出される。

この計測用チャンバーシステムを開発・製作することで、常に新鮮な酸素を含んだ ACSF を還流し続け、スライス標本の上下から O_2/CO_2 ガスとグルコースを持続的に供給することが可能となった。また、長時間の生理活性の維持と、光計測においてノイズとなる機械的な振動を取り除くことができた。

1-2 結果と考察

MiCAM01 カメラシステムを使用した代表的計測例を Fig. 1-8 に示す。0.75 ms / frame の時間分解能で、各ピクセルの蛍光強度 (ΔF) の初期蛍光強度 (F) に対する差分 (ΔF) を測定した (総フレーム数 341)。初期蛍光強度 (F) に対する蛍光強度の差分の変化率 ($\Delta F/F$) を使用することにより、蛍光強度の変化 (差分) を正規化した。蛍光強度の減少を正、増加を負の値として扱うことにより、正規化した蛍光強度変化率の向きを膜電位変化の方向に一致させた (Loew et al., 1992; Haugland, 1996; Yuste et al., 1997)。光計測時は、少なくとも 1 つのフィールド電極を用いて、常時、同時に電気生理学的な手法で応答を記録し比較した。スライス標本の生理的条件を確かめるために、刺激強度を変化 (10 μ A ~ 250 μ A) させながら同時計測を行ない、全ての刺激強度において、光信号および電気生理学的信号において、てんかん様過興奮の兆候がないことを確認した。Fig. 1-8 は、5 枚のスライスから得られたデータの代表例を示した。

Fig. 1-8 に示すように、ベースライン (刺激前 70 ms) の光信号 ($\Delta F/F$) の二乗平均平方根 (RMS) ノイズ (Fig. 1-8A の黒塗り記号 (▼, ▲, ■, ●)) の対数は、蛍光強度 (F) の対数に比例した (勾配 = -0.59 ± 0.02 , $r = 0.94$)。画像の光信号 ($\Delta F/F$) に対する RMS ノイズの対数についても同様だった (Fig. 1-8A の○)。これはノイズの振幅が蛍光強度の平方根に比例することを示している。すなわち、光信号のノイズの主な原因は光量子ノイズであるといえる。

S/N を向上させるために、加算平均とソフトウェアフィルターを適用した。Fig. 1-8B に示すように、試行の数が増加するにつれて、ベースラインの RMS ノイズは減少した (勾配 = -0.51 ± 0.01 , $r = 0.99$)。加算平均は、刺激に対して同じ応答を期待できるときに、ノイズを下げる効果を発揮し、空間分解能と時間分解能には影響を与えない。また、cubic software filter (5 × 5 (イメージプレーン) × 3 (時間) の gaussian 3D matrix filter) を作成し、ノイズレベルを約 3×10^{-3} 減少させた。これは検出器における約 10 倍の蛍光に相当する効果である。MOS ベースのモノリシックアレイタイプの光検出器のフォトンウェルの深さに近い、 10^6 フォトンウェルの深さに相当する効果となる。隣接ピクセルからの信号を組み合わせると 16 × 16 の光検出器を生成した場合にも同様の S/N 効果が

得られるが (Fig. 1-8C および D を参照)、Fig. 1-8B に示すように、cubic software filter の方が画像データの空間分解能が高い。この結果をもとに、本研究では 8 - 32 の加算平均と cubic software filter を使用することとした。

次に、光信号が電気生理学的測定で得られた情報と一致するかどうかを検討するために、得られた光信号を、同時記録した電気生理学的パラメーターを用いて定量化した。光信号の定量化を示すことができれば、本光計測法がフィールド電位記録で通常行われる電気生理学的測定の代替手段となり得る。さらに、本光計測法により、通常電気生理学的測定で得られる限られた測定部位からの点情報ではなく、広範な領域を網羅した時空間情報を取得可能とすることが可能となる。

Fig. 1-9A は、VSD で染色したラット海馬 CA1 野の蛍光画像 (対物面で 2×1.3 mm) と刺激電極および電気生理学的データを取得するための記録電極の位置を示す。図で示したように、CA1 野のほぼ全体が、その形態を認識するのに十分な解像度で視野に収まった。

Fig. 1-9B では、各フレームの光信号 ($\Delta F/F$) の蛍光画像を初期蛍光画像に疑似カラーとして重ねたものである。赤は膜の脱分極 (光学的)、青は膜の過分極 (光学的) を示す (Fig. 1-9 左下の色補正バーを参照)。刺激電極部位 (Fig. 1-9A の 0.75 ms 画像) で膜の脱分極が始まり (Fig. 1-9A の赤い点)、CA1 各層に広がり、CA1 の遠位方向に向かってシャッファー側枝に沿って広がった (0.75~8.25 ms 画像)。脱分極の信号は、一定の時間後に消失し (9.75~17.25 ms 画像)、46.5 ms で CA1 の遠位側において初期の一過性の脱分極に続いて過分極が発生した (Fig. 1-9B 最後の画像)。過分極は、錐体細胞層 (SP) と上昇層 (SO) で最も顕著だった。これは、抑制性シナプス後電位 (IPSP) に対応している可能性があり、数種類の K^+ チャネルによって引き起こされた後過分極の可能性がある (Schwartzkroin, 1986)。

Fig. 1-10A の上図は、細胞内電極で測定された膜電位変化のトレース (細線) に対応するピクセルから同時に記録した光信号のトレース (太線) を重ねた図である。重ねて表示した光信号は、膜電位変化のトレースと本質的に同じ時間経過をたどっている。これは、光信号が本質的にシナプス後細胞の膜電位変化を計測していることを示唆する。

Fig. 1-10A の下図は、細胞外電極で記録したフィールド電位 (fEPSP) のトレース (細線) に光信号を時間微分したトレース (太線) を重ねた図である。fEPSP は、光信号の微分波形に非常によく一致する。これは、光信号がこの部位のシナプス後膜の膜電位変化を表していることを示唆する。

同じ光計測データの他のピクセル位置における代表的なトレースを Fig. 1-10 B に示した。それぞれのトレースは、各位置での膜電位の変化に対応していると考えられる。

次に、マウス海馬スライス標本でも検討した。Fig. 1-11 には現行 (2019 年) システムの MiCAM Ultima でのマウス海馬 CA1 野の光計測データを示した。A は 1 回の試行におけるオリジナルデータ、B は $5 \times 5 \times 5$ のキュービックフィルターを 2 回適用した結果である。C はオリジナルデータ A の矩形部分から縦軸に沿って 2 ピクセル ($36\mu\text{m}$) 間隔でトレースを抽出したグラフである。*で示したトレースは錐体細胞層 (SP) のトレースである。D は B のデータから C と同じ位置のピクセルのトレースを抽出したグラフである。E に C、D のトレースを重ねて示した。それぞれの計測システムに改良を加えた結果、現在では 1 回の試行でも S/N の優れた信号が取れるようになった。

マウスとラットの海馬 CA1 野の光信号を比較した (Fig. 1-12)。マウスでは脱分極が伝播したのち、それが消失するのみであるのに対し、ラットでは脱分極性の信号が消失しつつある刺激後 12.0 ms から過分極成分が大きく広がっていることが確認できる。このマウスとラットの海馬 CA1 野に現れた神経活動現象の差異は、電気生理学的手法のみでは見逃された可能性のある現象であるが、本光計測法を用いることにより、このような計測領域全体における応答の違いを捉えることが可能となった。この差異を起こす機構の違いについては、電気生理学的手法での検証も加え、今後さらに研究していく必要がある。

1-3 結論

本章では、VSD 光計測の技術的な課題と、その克服のための技術開発についてまとめた。特によく使われる脳組織標本である海馬スライス標本を用いて VSD 光計測が安定して定量的に行うことができるように各種の開発と検討を行った。

VSD 光計測システムを構築するにあたり、以下の技術要件を達成した。(1) 撮像装置としてより大きなダイナミックレンジを持ち、高時間空間分解能を持つ CCD 高速カメラシステムを開発した。(2) 神経回路全体を視野に収め、励起光を最小限に抑え、高速光計測に十分な量の蛍光を捕捉可能な落射蛍光光学系を開発した。(3) 生理活性を保った脳スライスを作成する手順を確立した。(4) 安定した光計測を可能とする VSD として蛍光性の Di-4-ANEPPS を選択した。この色素は比較的疎水性で、染色は困難であったが、本研究で確立した染色方法により、色素を安定して膜内に維持することが可能となった。また、染色した海馬スライス標本の生理活性を保つためのモイストチャンバーを開発し、染色手順を確立した。(5) 計測用チャンバーシステムを開発し、長時間の生理活性の維持と、光計測においてノイズとなる機械的振動を取り除くことを可能とし、安定した計測を可能とした。

Di-4-ANEPPS で染色したラット海馬スライス標本の CA1 野を用い、本光計測システムと電気生理学的手法で得られる神経活動と比較検討した。この結果、生理学的状態に影響を与えることなく、光信号と電気生理学的測定の安定した信頼性の高い記録が可能となり、定量的に計測を行えたことが確認できた。光信号の時間経過と振幅は、細胞内および細胞外の記録と一致し、長時間安定した光信号を計測することができた。本研究により、電気生理学的方法に加えて、光計測が脳スライス標本の神経活動を測定するための代替手段となりうることを示し、CA1 野全体を網羅できる広範囲において、高時間空間分解能を有した多点同時計測可能な優れた方法であることを示すことができた。

上記の技術的検討は、主にラット海馬スライス標本を用いて行った (Fig. 1-8, 10,12; Tominag et. al., 2000) が、同様の手法が、マウス海馬スライス標本における計測 (Fig. 1-11,12) でも有用であることも明らかにした。

また、この 2000 年に開発した手法を基礎にして、実験手法にさらに改良を加え、多くの研究者が光計測実験を取り入れられるよう、本手法をビデオジャーナルとして発表した (Tominaga et al., 2019)。

第2章

海馬 CA1 錐体細胞の膜電位応答分布と、信号伝播における GABA_A 作動性フィードフォワード抑制の影響の光計測法による解析

(本章の内容に関しては、*Neurosci. Res.* 64:152–161 (2009) に発表済み)

神経細胞には高度に組織化された膜構造があり、入力情報であるすべての膜電位変化を統合して、情報を入力する。神経細胞のこの性質は、膜上の全てのチャンネルの特性とその配置に大きく依存する。電気生理学的手法を用いて、微細な樹状突起での計測を行った研究もあり (Stuart et al., 1993; Davie et al., 2006)、さらに微細な基底樹状突起 (Nevian et al., 2007) における計測を行った研究もある。しかし、実際の興奮性の程度や、特に抑制性シナプスからの入力による神経情報の出力に対する影響の程度は明確ではなかった。

海馬 CA1 回路への主な入力経路であるシャッフアー側枝を刺激することにより誘発される抑制性シナプス後電位 (IPSP) の存在は長い間知られていた (Kandel et al., 1961; Andersen et al., 1963, 1964; Buzsaki, 1984)。この回路は、反回抑制システムと呼ばれる。順行刺激によって活性化されるフィードフォワード抑制も確認されている (Dingledine and Langmoen, 1980; Alger and Nicoll, 1982b)。抑制性シナプス入力の位置は、局所電気刺激と組み合わせた GABA の局所投与による実験 (Andersen et al., 1980; Alger and Nicoll, 1982a) で、抑制入力と興奮性入力は重ね合わされた時間経過トレースとして示された (Dingledine and Langmoen, 1980; Brown and Johnston, 1983; Griffith et al., 1986; Turner 1990; Karnup and Stelzer 1999)。この抑制は、通常、短絡制御に関与するため、膜電位トレースとしてはほとんど検出されない (Turner, 1988; Sayer et al., 1989; Pouille and Scanziani, 2004)。したがって、神経細胞の細胞体樹状突起軸に沿って、抑制性入力があるように分布して膜電位応答に影響を与えているのかは不明であった。本光計測法は、海馬 CA1 回路全体の神経細胞集団の活動を視覚化できることから、海馬 CA1 錐体細胞の細胞体樹状突起軸に沿った GABA_A 受容体介在による抑制制御分布をマッピングし (Megías et al., 2001)、海馬 CA1 における信号伝達に対して、抑制部位を決定することが可能になった。

本章では、最初に、光信号の性質が、多くの膜要素からの膜電位信号の加算平均となる集合信号 (populational signal) であることを実証し、光計測データが信頼できるものであることを示した上で、GABA 作動性フィードフォワード・フィードバック抑制の CA1 錐体細胞への入力分布を可視化する。

光計測法の問題点は、光信号の振幅が単一神経細胞応答から予測される膜電位の絶対値と線形に相関していないように見えるということである。このような光信号は適切に解釈されないことが多い。例えば、海馬スライス標本 CA1 野において、放射状層 (SR) に刺激電極を置き、シャップァー側枝に刺激を加えたときの、錐体細胞層 (SP) と SR の光信号の振幅の関係は、錐体細胞における細胞体と先端樹状突起との膜電位との関係と一致しないと解釈されることがある。刺激強度を非常に高くして飽和状態になるまで十分に強度を上げても、SR から測定される光信号 (数 10 mV の興奮性シナプス後電位に対応) は、SP から測定される光信号 (100 mV の活動電位に対応) よりも光信号の振幅が大きい。この見かけの不一致は、集合信号によるものであるかを明らかにするため、高カリウム ACSF 溶液で灌流した時のスライス標本の定常膜電位変化を分析した。さらに、NEURON シミュレータ (Hines and Carnevale, 1997) を使用して、光信号測定結果とシミュレーション結果による CA1 錐体細胞集合の膜電位応答の応答分布図の比較検討を行った。得られた結果から、光信号データは集合信号であることを示し、本光計測データが信頼できるものであるという基盤を築いた。

シャップァー側枝入力による海馬 CA1 錐体細胞へのフィードフォワードおよびフィードバック抑制は、海馬 CA1 野での神経回路演算に重要な役割を果たすと考えられている (Buzsaki, 1984; Lacaille and Schwartzkroin, 1988a,b; Freund and Buzsaki, 1996)。光計測法の利点を生かして、抑制入力の分布特性評価を行い、シナプス後細胞への抑制入力の空間的寄与が異なることも発見した。

2-1 方法

光計測システム、ラット海馬スライス作成および染色に関しては 1-1 で既に説明した通りである。本研究にあたって新たに採用した光計測方法について、以下に示す。電気生理学的手法および NEURON シミュレータを使用した膜電位-光信号シミュレーションの詳細については、付録資料（付録 3）に示した。

2-1-1 タイムラспイメーシング法の開発

第 1 章で構築した光計測システムは、蛍光の緩やかな変化の評価には適していないため、画像取得システムの設定を撮像速度 1ms で 85 フレームを取得するようにした上で、10 秒ごとにこのプロセスが走るように自動化マクロプログラムを開発した。1 回の計測から得られる 85 フレームの連続画像を平均化して 1 枚の平均画像を作成した。これを 10 秒に 1 枚の蛍光画像とし、実験終了までの 90 分以上にわたる時系列の連続画像データ（タイムラспス画像）を作成した。また、このタイムラспス画像の解析のために IgorPro 上でマクロ言語を使ってプログラムを開発した。タイムラспスで計測したデータは、蛍光変化本来の極性（膜の脱分極に応じて蛍光が減少する）を用いた (Fig. 2-2)。

2-2 結果と考察

2-2-1 光信号における神経応答の振幅分布

Fig. 2-1B-D に、海馬 CA1 野のシャッフアー側枝に電気刺激 (250 μ A を正負方向に 200 μ s) を加えたときの典型的な光信号応答を示した (Tominaga et al., 2000, 2002b を参照)。

刺激直後からの時間経過に従って得られた光信号の連続画像を Fig. 2-1B に示した。代表的な 3 点から抽出したトレース (時間に対する光信号の応答) を Fig. 2-1B の下部に示した。左端のトレースは、刺激部位で記録された応答を示し、刺激アーティファクト (電氣的な刺激により刺激電極周囲の膜電位が強制的に変化することに対応する信号) の後にシナプス後反応が続いている。CA1 野の中間および遠位部分で記録したトレースをその横に並べて示した。それぞれのトレースにおける応答のピークを矢印で指し示した。応答は時間経過にしたがって遠位側に伝播し、それぞれの光信号トレースの応答ピークは、異なる時間に現れている。

刺激電極から約 90 μ m 離れた錐体細胞の細胞体樹状突起軸に沿った光信号の時間経過を、Fig. 2-1C に示した。振幅の最大値は SR の中央付近にあらわれた。錐体細胞層 (SP) では放射状層 (SR) と比較してピークが小さく、その後、過分極反応が続いた。各代表ピクセルの光信号トレースを Fig. 2-1D に示した。刺激強度の変化 (20, 30, 40, 50, 80, 120, 200, 250 μ A) に対応するトレースは、擬似カラーコードで示した (Fig. 2-1D)。全ての刺激強度において、SR での応答が最も大きかったのに対し、SP では SR よりも応答が小さく、他の層の応答よりも過分極応答が大きかった。

次に、各ピクセルでの最大応答振幅値 (Fig. 2-1B のトレースにおいて矢印で示したピーク振幅値) の分布を Fig. 2-1E の画像に投影した (最大応答投影マップ)。ここから、錐体細胞の細胞体樹状突起軸のピーク振幅を取り出して、応答の振幅を比較した。錐体細胞の細胞体樹状突起軸に沿って最大応答値を投影した応答分布図を Fig. 2-1F に示す。この図には刺激部位から異なる距離 (90, 180, 360, 540 μ m) での応答分布図を示している。刺激部位からの距離が異なっても、全ての応答分布図においてピーク

応答は SR の中央 (SP から約 200 μm) に現れた。上昇層 (SO) での最大応答は、SR での応答の 70% 以下であった。この関係は、刺激強度を変化させても変わらず、全ての刺激強度(20, 30, 40, 50, 80, 120, 200, 250 μA)において、光信号のピーク応答は SR にあらわれた (Fig. 2-1G および H)。

SP における光信号反応は錐体細胞の細胞体における活動電位に対応すると考えられ、活動電位の膜電位変化は 100 mV 以上である。一方、SR における光信号反応は先端樹状突起の EPSP に対応すると考えられ、EPSP の膜電位変化は数 10 mV である。VSD によって測定した応答が膜電位の振幅を反映していると考えると、SR よりも SP の応答が大きくなることが予想されるが、光信号計測結果では逆のことが観察されている。すなわち、SR の光信号の方が SP の光信号よりも大きい。この振幅分布の齟齬が、部位あるいは層依存的な VSD 感度の差に起因していた場合、VSD 信号を使用した脳神経回路全体における膜電位応答の比較検討をより慎重に行う必要がある。

2-2-2 高カリウム (High K^+) 溶液による計測

SP、SR の層または部位における膜電位変化と光信号振幅との間の対応に齟齬が認められる理由として、(1) VSD 感度の部位または層依存性、(2) 光信号集合性による可能性、がある。これらの可能性を検討するため、最初に (1) の VSD 感度に部位または層依存性があるのか検討を行った。

海馬スライス標本外液の $[\text{K}^+]_o$ 濃度を高くすると、静止膜に対して組織非依存に均一な持続的脱分極を引き起こすことができる。この時の蛍光変化を計測して (Fig. 2-2)、評価を行った。

灌流液をコントロール ACSF ($[\text{K}^+]_o = 2.5 \text{ mM}$) から High- K^+ ACSF 溶液 ($[\text{K}^+]_o = 25 \text{ mM}$; 以下 High- K^+ 溶液と記載) に切り替えると、蛍光は全体に減少した。High- K^+ 溶液を洗い流してコントロール ACSF に戻すと、応答は回復し、蛍光レベルがコントロールレベルに戻った (Fig. 2-2A)。脱分極応答時の計測した蛍光データを Fig. 2-2 Ba に示した。初期蛍光に対する蛍光の減少の割合 (Fig. 2-2Ba) は、SR では均一な変化を示す一方、SP および SO では蛍光変化が顕著 (Fig. 2-2Ba 矢印) だった。Fig. 2-2Ba の蛍光 3D

画像に直交する青い平面で切り取った断面で表される細胞体樹状突起軸の応答分布図を Fig. 2-2C に示した (High-K トレース)。

SP および SO で観察された SR よりも大きな蛍光変化が、シナプス後細胞で生じる活動電位によって引き起こされた反応であるか確認するため、電位感受性 Na⁺チャネル阻害薬 (TTX 5 μM) を High-K⁺溶液に添加して還流した。TTX を High-K⁺溶液に加えて還流すると、SP と SO に沿って見られた急峻なピーク (Fig. 2-2Ba 矢印) は消失した (Fig. 2-2Bb 矢印)。錐体細胞の細胞体樹状突起軸に沿った蛍光変化の応答分布図を Fig. 2-2C にプロットした (High-K⁺+TTX)。TTX 存在下では、錐体細胞の細胞体樹状突起軸に沿った蛍光変化が一様になった。Fig. 2-2D に統計処理した応答分布図 (n = 4-9) をプロットしたところ、High-K⁺溶液 (○) の SP および SO で検出されたピーク応答が、TTX 存在下 (●) では大幅に減少した。細胞体樹状突起軸の全長に沿った全サンプリングポイントで、TTX 存在下と非存在下で有意差が認められた (ANOVA 検定, p < 0.05)。これは、High-K⁺溶液における応答分布図の不均一は神経細胞の活動電位発火によって引き起こされたことを示している。

脱分極細胞からの神経伝達物質放出の影響を排除するため、主要な興奮性伝達物質受容体阻害薬 (NMDA 受容体阻害薬 APV 50 μM、AMPA/Kinate 受容体阻害薬 CNQX 10 μM) および抑制性受容体阻害薬 (GABA_A 受容体阻害薬ビククリン 20 μM) を含む混合液を加えた High-K⁺溶液を還流し、計測した (Fig. 2-2D Δ HighK⁺ + Blockers)。この結果は、放射状層 (SR)、上昇層 (SO)、および網状分子層 (SLM) の High-K⁺脱分極反応を優位に減少させた (Fig. 2-2D 阻害薬混合液存在下 (Δ HighK⁺ + Blockers) と非存在下 (○ HighK⁺); ANOVA 検定, p < 0.05)。このことは、細胞周辺の過剰なグルタミン酸および GABA が、High-K⁺溶液のスライス標本で観察された脱分極の一因となっていることを示唆している。SP 付近のピークは、TTX (Fig. 2-2D ▲ HighK⁺ + Blockers + TTX) の適用により消失した。すなわち、蛍光変化の不均一な分布は、主にシナプス後細胞である CA1 錐体細胞の活動電位によって引き起こされたと考えられる。

この結果から、VSD 感度に部位または層依存性がある可能性を排除することができた。

2-2-3 NEURON シミュレータによる計算データとの比較検証

さらに、SP、SR などの部位ごとの膜電位変化と光信号の振幅との間の不一致の理由を解明するために、2-2-2 で挙げた光信号データの集合信号としての特性について解析した。

海馬 CA1 スライス標本のシャッフアー側枝へ電気刺激を与えた時に、海馬 CA1 スライス標本の錐体細胞には、活動電位を発火させる細胞と発火しない細胞が含まれている可能性がある。活動電位を発火させる細胞と発火しない細胞の集団組成を実験的にコントロールすることは難しいため、NEURON シミュレータ (Hines and Carnevale, 1997) を用いて計算的に検証した。このシミュレーションには海馬 CA1 錐体細胞の現実的なモデル (realistic model; Magee and Johnston, 1995; Migliore et al., 1999; Johnston et al., 2003) を採用し、数値モデル (Migliore et al., 2003) より CA1 野の膜電位応答をシミュレートした。Fig. 2-3A に、使用した CA1 錐体細胞モデルの幾何学的関係を示した。Fig. 2-3A のトレースは、比較的強いシナプス入力に対して錐体細胞が活動電位を発火させた時の、異なる位置 (細胞体から 0, 100, 200, 300 μm) での代表的な膜電位応答を示している。モデルの各セグメントの膜電位応答を計算し、それを錐体細胞の細胞体樹状突起軸に沿った位置に対する応答の分布として再構築した結果から膜電位応答トレースを抽出した。

シミュレーションの仮想的な入力強度の値を少しずつ変えていき、モデル CA1 錐体細胞の応答が活動電位を発火させる条件を探索した。これにより、発火が起こる直前、すなわち発火閾値をわずかに下回った場合 (a)、または発火が起こる最小の入力を加えた場合 (b) のシミュレーション結果を得た。この時の両者のモデル CA1 錐体細胞の細胞体樹状突起軸に沿った膜電位応答分布図を計算して 3D グラフで示した (Fig. 2-3B)。採用した錐体細胞モデルは、細胞体から 200 μm の所にシナプス入力がある。活動電位を発火する入力を与えた場合 (Fig. 2-3Bb) と活動電位を発火しない入力を与えた場合 (Fig. 2-3Ba) の膜電位応答分布図を計算したところ、どちらも EPSP の振幅はほぼ同じであった。モデル錐体細胞が活動電位を発火した場合、SP および SO で非常に強い応答 (約 80 mV 変化) が発生した (Fig. 2-3Bb)。CA1 錐体細胞単体でのシミュレー

シヨンデータを元に再構築した膜電位応答分布図計算結果からは、発火した場合、発火しなかった場合のどちらも光計測法によって得られた応答の振幅・分布とは一致しなかった。

Fig. 2-4A に、Fig. 2-3Ba,b と対応する膜電位応答の時間経過を示した。活動電位生成の閾値をわずかに上回る (just-supra threshold) シナプス入力 (EPSP に続いて活動電位が発生する場合。黒のトレース) と、わずかに下回る (below threshold) シナプス入力 (EPSP のみ発生する場合。青のトレース) を重ねて示した。閾値を超える反応と超えない反応は、シナプスウェイトを連続的に変化させた時、閾値をちょうど超えた点での反応と、それ以下の時の反応を示しており、EPSP の大きさにはほとんど差は認められなかった。これで、ほぼ同じ入力を受けた時に発火する細胞と発火しない細胞を代表させることとした。それぞれの入力を受けた時のモデル錐体細胞の細胞体樹状突起軸に沿ったピーク膜電位応答分布図を Fig. 2-4B に示した。EPSP のみ(Fig. 2-4Ba)、活動電位を発生させた場合(Fig. 2-4Bb) の2つの膜電位応答分布図の形状はまったく異なっていた。活動電位を発生させた入力条件では、SP の膜電位振幅と SR の膜電位振幅の比 (SP 膜電位振幅/SR 膜電位振幅) は 5.13 だったが、活動電位が起こらない入力条件では、この比は 0.63 となった。つまり、膜電位変化は、錐体細胞が活動電位を生成したときは SP の応答は SR の応答の 513% となり、錐体細胞が EPSP のみを生成した場合は SP の応答は SR の応答の 63% になった。

Fig. 2-4C に、非発火神経細胞 [EPSP のみを生成する錐体細胞 (Fig. 2-4Ba)] と、発火神経細胞 [活動電位を生成する錐体細胞 (Fig. 2-4Bb)] の存在の割合を変化させたときの平均膜電位応答分布図を示した (Fig. 2-4C)。非発火神経細胞の割合が高い時 (発火神経細胞/非発火神経細胞が 1/60 以下) の膜電位応答分布図の形状は、光信号で捉えた応答分布図の形状と類似している (Fig. 2-1F, G, Fig. 2-5B)。

次に、発火のタイミングの違いがこの分布に影響する可能性を検討した。16 ms の範囲内で活動電位発火のタイミングをランダムに変化させ、膜電位応答分布図をシミュレーションしたが、応答分布図の形状にはほとんど影響しなかった (Fig. 2-4C 青線)。すなわち、Fig. 2-1F, G で示した光信号膜応答分布図は、神経細胞集合には発火神経細胞と非発火神経細胞が混在し、EPSP のみを生成する非発火神経細胞の割合が高いこと

が示された。光信号は、光の経路に含まれる全ての神経細胞の膜区分の電位情報を光信号に加算平均的に変換しており、この光信号の集合信号としての性質が観察された光信号膜応答分布図 (Fig. 2-1F, G) となると考えられる。

本シミュレーション条件で、集合電位信号から計算した SP ($L = 0 \mu\text{m}$) と SR ($L = 250 \mu\text{m}$) の応答比 (PR ratio = SP 応答 / SR 応答) を、発火神経細胞と非発火神経細胞の比率を変化させて示した (Fig. 2-4D)。発火神経細胞に対し、非発火神経細胞の割合を増やすと、PR ratio は低下した。発火神経細胞対非発火神経細胞が 1 : 10 の場合、PR ratio は 1.35、1 : 200 の場合、0.72 になった。本光計測システムでは 1 ピクセルは対物面で約 $25 \mu\text{m} \times 25 \mu\text{m}$ であり、観測される細胞数は細胞の直径が $10 \mu\text{m}$ 、計測可能な光信号の深さが $200 \mu\text{m}$ と仮定すると、錐体細胞は最大でも 200 個程度と推定される (Curtis et al., 1999)。

光計測データから SP ($L = 0 \text{mm}$) と SR の中間部 ($L = 250 \text{mm}$) の光信号の振幅の比率として PR ratio を計算すると 0.67 ± 0.07 (mean \pm SEM, $n = 6$ スライス; Fig. 2-5C, ○) となった。これは、シミュレーション結果で得られた発火神経細胞と非発火神経細胞を 1 : 200 とした時の PR ratio よりもさらに小さい。そこで、シミュレーションで得られた PR ratio よりも光信号データの PR ratio の方が小さくなる理由を検討した。

2-2-3 SR 刺激にตอบสนองしたフィードフォワード/フィードバック抑制入力影響の光信号に対する影響

海馬 CA1 野の錐体細胞の発火は、海馬 CA1 野に投射する入力経路と CA1 野の錐体細胞、介在細胞がつくる神経回路内のフィードフォワード抑制入力とフィードバック抑制入力によって制御されていると考えられている (Buzsaki, 1984)。

Fig. 2-5C (○) に、刺激強度に応じた PRratio を示した。PR ratio は、刺激強度が強くなるにつれて、最初に大きく減少し、その後増加に転じ、最大 0.7 に達した。より低い刺激強度で見られる PR ratio の減少は、光信号で計測した膜電位応答分布図が、刺激により誘発されるフィードフォワード抑制入力を反映している可能性を示唆している (Alger and Nicoll, 1982b; Turner, 1990)。シミュレータでは、この抑制成分を計算してい

なかったため、シミュレータのデータを元に計算した PR ratio に対して、実測した光信号の PR ratio が小さくなった可能性がある。

SR に刺入した電極からのシャッフアー側枝刺激による錐体細胞の細胞体樹状突起軸に沿った抑制入力があるように膜電位変化に影響するかを検討するため、GABA_A 受容体阻害剤であるピクロトキシン (PITX) を ACSF 溶液に加えて還流し、海馬 CA1 野の SP および SR の光信号を計測した (Fig. 2-5)。

PITX 存在下 (黒) と非存在下 (グレー) の SP、SR での光信号の時間変化を Fig. 2-5A に示す。PITX を添加すると、光信号の振幅は大きく増加し、大きな振幅が長く続いた。GABA_A 受容体阻害によって引き起こされる応答増大の最初のピーク (Fig. 2-5A の黒矢印) を、フィードフォワード抑制入力として定義した。この最初のピーク時点での PITX による光信号振幅の増加は、シナプス後細胞の活動電位発火に先行した結果から (Fig. 2-1D も参照)、妥当であった。この時の細胞体樹状突起軸に沿った PITX 存在下 (●) と PITX 非存在下 (○) の光信号応答分布図は、細胞体近位部位 ($\pm 20 \mu\text{m} < L < 0 \mu\text{m}$) と先端樹状突起遠位部位 ($L > 360.1 \mu\text{m}$) で、ともにコントロールとの有意差が認められた (* Fig. 2-5B, ANOVA, $p < 0.05$)。すなわち、細胞体近位部位、先端樹状突起遠位部位に、GABA フィードフォワード抑制入力があると考えられる。

先端樹状突起で発生する EPSP に対して、細胞体で活動電位が発生する割合 (EPSP-活動電位発火制御) の指標として、PR ratio を使用する。Fig. 2-5C に刺激強度に応じた PR ratio の変化を、100 μM PITX 存在下 (●)、非存在下 (○) に対して計算し、それぞれの値をプロットした。PITX 非存在下のコントロール条件では PR ratio は、刺激強度が一定の大きさ (50 μA) になるまで刺激強度が上昇しても低下し、その後、増大して一定の値になった (Fig. 2-5C ○)。一方、PITX 存在下では PR ratio は刺激強度の増大に伴って一様に増大して、PITX 非存在下で見られたような一時的な低下は認められなかった (Fig. 2-5C ●)。すなわち、PITX により、GABA_A 受容体が阻害されているため、PR ratio は単調に増大したのち一定の飽和値を示したことが示唆された。

応答初期のフィードフォワード抑制と比較するために、応答が一過的なピークを過ぎた減少期 (刺激後 30 ms) での光信号応答分布図を Fig. 2-5D に示した。PITX 非存在下では、SO、SP および細胞体近位領域から 400 μm の先端樹状突起で過分極反応が見

られた (Fig. 2-5D ○)。一方、PITX 存在下では、細胞体樹状突起軸の全体にわたって、脱分極反応が観察された (Fig. 2-5D ●)。これは主に、錐体細胞全体に対する GABA フィードバック抑制の影響を反映していると考えられる。

2-2-4 刺激部位依存的なフィードフォワード抑制／フィードバック抑制制御の可視化

海馬 CA1 野の錐体細胞は、CA3 領域からの入力 (シャッファー側枝) を放射層 (SR) に受ける他、上昇層 (SO) ではシャッファー側枝の分枝のほか、CA1-CA1 樹状突起間連絡がある。網状分子層 (SLM) では嗅内皮質からの TA 経路からシナプス入力を受けることが知られている。これらの他にも嗅周囲皮質を含む多くの入力から投射を受けている。また、SO と SLM にはそれぞれ異なる働きを持つ介在神経が分布していることが示唆されている (Freund and Buzsaki, 1996)。これらの入力経路に対するフィードフォワード抑制制御の影響を調べるために、SLM および SO 部位に挿入した刺激電極からの電気刺激 (それぞれ SLM 刺激、SO 刺激と略す) に応答した膜電位応答分布図を、SR への電気刺激 (SR 刺激) と比べて評価した (Fig. 2-6)。

SLM 刺激において (Fig. 2-6A-D)、PITX 存在下／非存在下の光信号応答分布図を比較すると (Fig. 2-6B)、SR 刺激で見られたように、SO および細胞体近位部位 ($-200 \mu\text{m} < L < 126.2 \mu\text{m}$) および尖端樹状突起部位 ($L > 381.3 \mu\text{m}$) で有意な差が認められた。SLM 刺激後の PR ratio の変化 (Fig. 2-6C) は、SR 刺激後の PR 比の変化 (Fig. 2-5C) とは全く異なった。SLM 刺激では、Fig. 2-6C に示すように、刺激強度が増加すると PR ratio は PITX 存在下の方が増大し、刺激強度が $120 \mu\text{A}$ を超えると有意な増大を示した ($P < 0.05$)。これは SR 刺激で見られたような弱い刺激で活性化するフィードフォワード抑制の効果があまり認められないことを意味している。

SO 刺激 (Fig. 2-6E-H) に対する PITX 存在下/非存在下の光信号応答分布図を比較すると、SO および SP から SR の近位では応答分布図にほとんど影響は認められなかった。一方、SR 遠位側で PITX 添加により有意な増大がみられた ($L > 258.8 \mu\text{m}$, $p < 0.05$)。Fig. 2-6G に示す PR ratio で評価を行うと、抑制入力が入っているため PITX 存在下では SR の EPSP による光信号の振幅が大きくなり分母が大きくなること

で、PITX 存在下の PR ratio が PITX 非存在下と比べて小さくなっている。刺激強度に対する PR ratio の変化を Fig. 2-6G に示した。これは SO 刺激が主に錐体細胞の直接刺激と、介在細胞の直接刺激に相当すると考えられた。

刺激後 30 ms での光信号応答分布図を PITX 存在下／非存在下で比較すると、PITX 非存在下の光信号応答分布図は過分極状態であるのに対し、PITX 適用時は細胞体樹状突起軸全体に沿って、脱分極が誘発されていることが観察できた。フィードバック抑制による制御 (SLM 刺激時: Fig. 2-6D; SO 刺激時: Fig. 2-6H) は細胞体樹状突起軸に沿って、全体にわたって影響していた。

2-2-5. 電気生理学的記録

CA1 錐体細胞を電位固定した状態で、SR、SLM および SO に対して、2つの異なる刺激強度 (250 μ A および 40 μ A) の入力を行った結果を、Fig. 2-7 に示す。固定電位を -80 mV から -20 mV の間で変化させ、膜電流応答を計測したトレースを示した (Fig. 2-7)。

膜電流応答は、興奮性シナプス後電流 (EPSC) と抑制性シナプス後電流 (IPSC) の重ね合わせで示される。Fig. 2-7A の一番右側のトレース (左側 (250 μ A)、中央部 (40 μ A) の2種類の刺激強度に対する固定電位 -70 mV と -30 mV の時の応答を拡大表示したもの) で示したように、脱分極電位である -30 mV で電位固定した場合、弱い刺激 (40 μ A) により、一瞬の小さな内向き EPSC に引き続き、すぐに早いフィードフォワード IPSC が引き起こされた。刺激強度を 250 μ A に増加させると、さらに遅いフィードバック IPSC (Glickfeld and Scanziani, 2006) が加算的に動員されるのが観察された。SLM 刺激でも同様であった (Fig. 2-7C)。これは、SO 刺激ではあまり明確ではなかった (Fig. 2-7B)。これらの IPSC は -70 mV での電位固定ではトレース上に明確には検出されなかった。塩素イオンの反転電位 (E_{Cl}) は約 -73 mV と計算されるので、これらの IPSC は塩素イオンによるものと考えられる。実験したすべての細胞 ($n=6$) で同様の傾向が観察された。

これは、SR 刺激 (シャツファー側枝刺激) では、特に閾値の低いフィードフォワード抑制成分が動員されるのに対して、刺激強度が大きくなると、閾値が高くより大きな電流を起こすフィードバック抑制成分が加算的に動員されることを示唆している。これは、光計測結果から見られる応答分布 (Fig. 2-5B) と同様であり、SLM 刺激においても同様である。一方、SO 刺激 ではこのようなフィードフォワード抑制成分は動員されず、光計測による応答分布と符合した。以上の結果から、これまで困難であった抑制シナプスの動員の空間分布を明らかにすることができた。

2-3. 結論

海馬 CA1 野での光計測を行った時に、数 10 mV のシナプス電位に対応する SR の計測値が大きく、100 mV に及ぶ活動電位を反映すると思われる SP の計測値がそれよりも小さいことは、いままで十分に説明できていなかった。

細胞の静止電位は細胞外液のカリウム濃度に大きく依存している。本研究では、最初に海馬スライス標本の外液のカリウム濃度を高めて化学的な電位固定をした状態を作り出して光計測を行なった。外液を高カリウム ACSF 溶液に置換すると、SP および SO では大きな光信号が現れたが、SR での光信号は一様になった。この高カリウム ACSF 溶液に電位感受性 Na⁺チャンネル阻害薬 TTX を加えて活動電位の発火を抑えると、SP および SO を含む全ての層において一様な光信号が計測された。この結果は、VSD 感度には層の違いに依存性はなく、どの層の膜においても膜電位変化と光信号の間には一定の比例関係があると考えて良いことを示した。

次に、シャッフアー側枝への電気刺激で引き起こされる光信号伝播において、SP の光信号が SR の光信号よりも小さい理由について、NEURON シミュレータを用いて検討した。このシミュレーションプログラムで、個々の膜の各成分で現実的な膜電位応答を計算し、光信号の集合電位としての性質を加味して錐体細胞に沿った応答分布を算出した。実際の光信号の応答分布と比較することで、光信号での応答分布は錐体細胞の活動電位発火率を考慮すると説明できることが明らかとなった。このシミュレーションでは、発火する細胞は 100 個に 1 個くらいと推計された。以上の研究より、光計測における集合信号としての光信号の応答分布の特性は実際の細胞の膜電位応答強度分布を反映していることを示した。

さらに、ACSF に GABA_A 受容体拮抗薬である PITX を加えた時のスライス標本の膜電位分布から、抑制性シナプスの膜電位応答に対する関与の程度を検証した。刺激応答特性と、時空間パターンから興奮性膜電位の最初のピークの PITX による変化は、フィードフォワード抑制に起因し、後の応答 (刺激後 30 ms に現れる) はフィードバック抑制に起因していることを明らかにした。

SR 刺激によるフィードフォワード抑制の空間分布は、細胞体近位および遠位の先端樹状突起領域で観察された。最も大きなフィードフォワード抑制が見られたのは細胞体近位であった。

刺激強度によるフィードフォワード抑制入力の影響の違いについても可視化した。SR 刺激において、低い刺激強度 (20 – 80 μA) では PR ratio (Fig. 2-5C) が減少したのに対し、PITX 存在下では PR ratio の増加が認められた。この結果は、低い刺激強度の順行刺激が IPSP (Andersen et al., 1969a; Turner, 1988, 1990) と IPSC (Fig. 2-7A 右端参照) を誘発するという結果と一致した。また、光計測データでの PR ratio が、シミュレーションモデルでの PR ratio よりも低い要因は、低い刺激強度の SR 刺激が誘発するフィードフォワード抑制入力による発火制御が一因と考えられた。

SLM 刺激および SO 刺激におけるコントロール光信号応答は SR 刺激と比較すると微弱である。SLM 刺激における PITX 存在下／非存在下で解析したフィードフォワード抑制は、細胞体近位および先端樹状突起領域で観察され、特に細胞体近位において、比較的広い範囲で大きなフィードフォワード抑制が観察された。刺激強度に対するフィードフォワード影響は、PR ratio による評価では、刺激強度が 120 μA を超える高い強度の刺激で認められた。

一方、SO 刺激における PITX 存在下／非存在下で解析したフィードフォワード抑制は、遠位先端樹状突起領域のみで認められた。刺激強度によるフィードフォワードの影響は、PR ratio による評価では、刺激強度が 40 μA または 80 μA 以上で有意差が認められ、SR, SO 刺激と異なり、PITX 存在下での PR ratio は反転して、PITX 非存在下よりも小さい値となった。これは遠位先端樹状突起領域に入力しているフィードフォワード入力が PITX により遮断され、SR における光信号応答が大きくなったためと考えられる。

本研究により、光計測データは信号集合であることを明らかにした上で、GABA 作動性フィードフォワード・フィードバック抑制の CA1 錐体細胞への入力分布と刺激強度に対する影響を可視化することができた。

第3章

VSD 光計測を用いた海馬 CA1 野からの長期増強 (LTP) の信号伝播パターンの網羅的解析

(本章の内容に関しては、*Front. Cell. Neurosci.* 12:389 (2019) に発表済み)

学習および記憶機能など脳機能は、脳神経回路の入出力 (I/O) 活動に応じた変化が重要な役割を担っていると考えられる。脳神経回路の動態を理解することは、健常な脳と病気の脳の生理学と病理学に取り組むために不可欠である。神経回路の機構的な理解は、検査や治療の客観的な指標としても重要である。

近年、神経回路において興奮/抑制 (E/I) バランスが重要であるという認識が高まり (Isaacson and Scanziani, 2011)、神経回路活動を直接解明することの重要性が認知されてきている。E/I バランスの崩れや不均衡は、様々な回路要素間の制御と同期に影響し、自閉症スペクトラム障害 (ASDs) (Persico and Bourgeron, 2006; Connor et al., 2016)、統合失調症 (Canitano and Pallagrosi, 2017)、アルツハイマー病 (AD) (Busche and Konnerth, 2016) など、精神障害発症に関与していることが報告されている。脳の機能不全の神経回路メカニズムを理解するためには、脳神経回路を広範囲に、さらにその時空間的動態を評価することが重要である (Uhlhaas and Singer, 2012; Anticevic and Murray, 2017)。

フィールド電位記録、細胞内記録、パッチクランプなどの従来の電気生理学的手法は、回路内の個々の神経細胞活動や要素間のシナプス接続の研究には有効な手段である。一方で、点計測であるため、脳神経回路全体の動態研究には適さない。

光計測法では、回路内の樹状突起、軸索、細胞体などの神経細胞における全ての構成要素で膜電位をプローブすることを可能とし、脳神経回路全体の時空間における機能動態の理解を可能とする。本研究で開発した光計測法は、脳の局所神経回路の I/O 関係を測定することで、回路の E/I バランスを時空間動態の差として定量的に示す重要なツールとなる。

脳神経回路全体の時空間応答動態の変化を評価するためには、定量的かつ安定した長期連続測定が必要となる。ここでは、VSD 光計測法を使用して、海馬 CA1 野におけ

るシータバースト刺激 (TBS) による長期増強 (LTP) に関連する回路動態変化を計測した。本研究で開発してきた高速光計測システムにより、海馬 CA1 野全体から、神経活動に対応する光信号を最大フレーム速度 0.1 ms / frame で 60 秒ごとに 12 時間以上測定することができた。

光信号データの評価に当たっては、スライス標本による形態の違いに依存せず、光信号データを統計処理して評価する必要がある。このために、新たな座標系を定義して導入し、スライス標本間の幾何学的な不整合の問題を解決した。光信号データをこの座標系に座標変換して投射することにより、全ての海馬 CA1 野からの光信号データが同等に評価可能となり、さらにこの座標系で光信号を正規化して評価することにより、回路活動の変化を評価可能となった。本研究では、多くの脳神経疾患病態モデル (Monday and Castillo, 2017; Monday et al., 2018) において脳機能の重要な指標である「海馬 CA1 野での LTP」 (Bliss and Gardner-Medwin, 1973; Bliss and Collingridge, 1993) の画像解析に、この新たな座標・評価系を導入することができた。

3-1 方法

光計測システム、スライス標本作成および染色に関しては 1-1 で既に説明した。第 3 章での計測ではマウス海馬標本を用いている。これは脳科学の分野において、1990 年代以降ノックアウトマウスなどの遺伝子工学の手法を用いた（その当時）マウスでしかできない研究が主流となってきたことに対応するものである。マウスとラットのスライス作成手法の差は第 1 章の方法にまとめた。尚、電気生理学的手法については、付録資料 (付録 2) に示した。

3-2 結果と考察

3-2-1 L-LTP 計測

Fig. 3-1A に、光信号記録のセットアップの模式図を示した。励起光 (LEX-2G, Brainvision, Inc., Tokyo, Japan) には、フィードバック安定化コントローラーを装備した LED 照明 (Nishimura et al., 2006) を用いた。この照明により、計測の障害となるドリフトの問題を防ぐことができ、励起光を最小限に抑えることができた。第 1 章の方法で既に述べたように、現行システムではスライス標本の保持・染色用モイストチャンバー、計測用チャンバーシステム、光学系のシステムを改良することにより、シータバースト刺激 (TBS; 100 Hz で 4 パルスを 200 ms 間隔で 10 回) によって誘発した後期 LTP (L-LTP, Fig. 3-1B-D) の長期にわたる安定した光信号記録を達成した。計測は、プログラム開発プラットフォーム (IgorPro, WaveMetrics Inc., OR) 上で独自に開発したプログラムにより自動制御で行った。コントロールと LTP 誘導後の神経興奮応答を調べるために、100 μ A (200 μ sec 双極) 刺激で応答を計測した。

Fig. 3-1B は、左側にフィールド電極で記録したフィールド興奮性シナプス後電位 (fEPSP) の代表的なトレース、右側にフィールド電極の先端のピクセル (Fig. 3-1A 右図の赤い点) で得られた光信号トレースを示した。TBS 刺激入力前のコントロール (黒)、TBS 刺激入力後、2 時間 (緑)、4 時間 (シアン)、そして 6 時間 (青) のトレース

をそれぞれ重ねて示した。Fig. 3-1C は TBS 刺激により L-LTP を誘発させたときの、刺激前から刺激後 5 時間以上にわたるフィールド電極での記録 (fEPSP 勾配 (黒)) と電極の先端に対応するピクセルでの光信号 (青) をプロットした時間経過のトレースである。Fig. 3-1D は、各時点 (コントロール、2、4、6 時間) で海馬 CA1 野に沿った神経興奮の伝播を示す一連の光信号画像 (10,000 frame / sec で記録した光信号像を 9 フレーム間隔) を示した。コントロール画像と比較して、TBS 後の興奮伝播パターン (Fig. 3-1D 2, 4 and 6 hrs) では TBS 刺激前の興奮伝播パターン (Fig. 3-1D control) に比べ大きな脱分極信号が記録された。この TBS 刺激後の活性化パターンの振幅と時間経過は、2 時間後、4 時間後、6 時間後においても安定していた。この実験結果は、本光計測システムが生理学的活動の変化を長期間追跡できることを示している。

3-2-2 海馬 CA1 野の光信号の評価法；形態に対応した座標系の導入と信号の正規化

本研究では、光信号の解析にあたり、海馬 CA1 スライス標本における個々の標本の形態的な違いがデータ評価に影響を及ぼすことのないよう、新たな座標系を導入した。海馬 CA1 野の 2 次元光信号画像データ (XY 座標) を、細胞体樹状突起軸に沿った SP からの距離 (D) と CA1-CA2 境界付近の刺激部位からの距離 (L) に対応する D-L 座標に変換した。海馬 CA1 野の錐体細胞は、円弧上に放射状に存在するという仮定のもとで、以下の関数に沿って、光信号画像平面を D-L 座標に変換した (Fig. 3-2A)。

$$r^2 = (x - x_0)^2 + (y - y_0)^2 \quad (1)$$

$$l = (x_s - x_0) \cos (L / r) - (y_s - y_0) \sin (L / r) + x_0 \quad (2)$$

$$d = (y_s - y_0) \cos (L / r) - (x_s - x_0) \sin (L / r) + y_0 \quad (3)$$

ここで、 x_s, y_s は、刺激部位の (x, y) 座標を示す。

画像内の SP の線を円弧に合わせると、円弧の中心 (x_0, y_0) と半径 ($r; r$ は (x_0, y_0) から SP までの距離) のパラメーターが決定できる。これらのパラメーターを決定後、上記の変換式を用いて、海馬 CA1 野画像を Fig. 3-2A の右下の模式図に示す長方形画像に

変換した。Fig. 3-2B に、海馬 CA1 野の蛍光画像 (Fig. 3-1A) を D-L 座標に変換した蛍光画像を示した。Fig. 3-2C には、光信号画像を D-L 座標変換したときの神経活動の伝播パターンを示した。興奮は D 軸の約 150 μm で始まり、L 軸の遠位側に向かって伝搬していく。

D-L 変換により、異なるスライス標本からの光信号画像データを効率的に統計処理し、評価可能となった。Fig. 3-2C に、4 つの異なる時点 (コントロール、2、4、6 時間) での神経活動の伝播パターンを示した。この図で、D-L 変換により、シャッフアー側枝に沿った伝搬パターンを、L 軸に沿った直線に変換できたことを示した。Fig. 3-2D は、D-L 座標の各ピクセルでの光学応答のピーク値を示し、Fig. 3-2E は D-L 座標上の異なるピクセルでの 10 時間の応答の時間変化を示した。LTP がどの部位にどのくらいおこったのか、それは D-L 座標位置によって異なる。Fig. 3-2F は LTP 誘導後の経過時間に対する LTP 誘導率の分布を、D-L 座標平面に擬似カラーコードで示したものである。D-L 光信号画像平面上の全ピクセルに対して、LTP 誘導率 (TBS 後の光信号最大振幅 / TBS 前の光信号最大振幅) を計算して、D-L 座標平面上の空間的な位置に再マッピングした。LTP 後の神経興奮増大率の空間的な差異分布を示す画像となる。Fig. 3-2G は、Fig. 3-2D の光信号最大振幅画像データより、D = -75 μm (SO, 青) および D = 150 μm (SR, 黒) における L 軸に沿った振幅のライン応答分布図 (コントロール (白抜記号)、TBS から 2、4、6 時間後 (中塗り記号)) である。Fig. 3-2H には、LTP 誘導率のライン応答分布図を示した。これは Fig. 3-2G と同様に、D = -75 μm (SO, 青) および D = 150 μm (SR, 黒) における L 軸に沿った LTP 誘導率を、Fig. 3-2F より抽出してプロットした。SO では CA1 野遠位部で LTP 誘導率増加が認められ、L = 775 μm で LTP 誘導率のピークが認められた。SR では刺激の付近を除いて LTP 誘導率の増加はほぼ同様だった。Fig. 3-2I では、SO (D = -75 μm) および SR (D = 150 μm) での光信号の時間経過トレースを L = 500 μm および L = 775 μm の位置それぞれに対して示した。SR での信号は、主に EPSP を反映し、SO の信号は活動電位の発生を反映すると考えられる。これらの結果により、LTP 誘導は EPSP 興奮への影響は CA1 領域全般 (刺激付近を除く) においてほぼ同様であることを示すとともに、遠位 CA1 野においては EPSP 興奮に対する細胞体発火確立が高くなることを示すことができた。また、本実験の結果は、LTP

誘導における回路依存性および層依存性の変化における神経活動のダイナミクスの安定性も示すことができた。

3-2-3 TBS 誘発 LTP データ

Fig. 3-3 は、4 匹のマウスから作成した 12 スライス標本 ($N=4, n=12$) からの D-L 座標における TBS 誘発 LTP を示したものである。Fig. 3-3A に示すように、LTP は、SR よりも SO および SP でより大きく計測された。Fig. 3-3C, D は、この現象をより明確に示している。LTP は空間的に不均一に誘導されており、L 軸に沿った位置に応じて、時間経過にも不均一性が現れる。LTP は L が小さい $L=225\ \mu\text{m}$ では明確には観察できないのに対し、 $L=775\ \mu\text{m}$ ではより大きな変化として計測された。CA1 錐体細胞の入出力 (I/O) 関係の変化を判断するために、SP と SR のピーク値の比率 (PR ratio; Tominaga et al., 2009 及び第 2 章を参照) を Fig. 3-3F に示した。図から明らかなように、TBS がシャッフアー側枝に与られた時点を境に PR ratio は L 軸に沿って CA1 野全体で変化した。

LTP 誘導刺激パターンの違いによる LTP 誘導と維持メカニズムの違いについては、すでに複数の論文で報告されている (Larson and Lynch, 1986; Larson et al., 1986; Huerta and Lisman, 1995; Larson and Munkácsy, 2015)。高周波刺激 (HFS ; 100 Hz, 1 sec) は、いわゆるテタヌス刺激として知られ、最も一般的な LTP 誘導刺激の 1 つである。LTP の維持段階はさまざまなメカニズムに依存する (Korte et al., 1995, 1998; Kang and human, 1996; Smith et al., 2009; Edelman et al., 2015)。LTP 誘導刺激のもう一つの代表的な刺激パターンである TBS は活動電位の発火生成を増強し、HFS は GABA_A 依存メカニズムによりスパイクを減少させる (Tominaga et al., 2000, 2002a, 2013)。そこで、CA1 野での LTP の違いを比較、検討した (TBS; Fig. 3-3, HFS; Fig. 3-4)。

LTP 誘導刺激後の数分にわたる一過性の短期増強 (STP) は、L 軸方向全体にわたって HFS 誘発 LTP でより大きく計測され、TBS 誘発 LTP では短期増強が明確に観察されなかった (Fig. 3-3A, Fig. 3-4A を比較)。TBS 誘導 LTP と HFS 誘導 LTP を比較すると、LTP の不均一な分布は同様の傾向が示された (Fig. 3-3B, C と Fig. 3-4B, C を比較)。

TBS 誘発刺激でも HFS 誘発刺激でも、LTP の大きさは SR よりも SO の方が大きかった。HFS 誘発 LTP での PR ratio (PRR; Fig. 3-4F) は、遠位 ($L = 775 \mu\text{m}$) 領域で一時的な増加を示した。これは、TBS 誘発 LTP のときの PR ratio 変化とは異なっていた (Fig. 3-3F)。TBS 誘発 LTP では PR ratio は一様に変化した。

以上の結果は、LTP を誘導する刺激の種類によって、LTP 誘導後の時空間変化に違いがあることを明らかにした。

3-2-4 TBS 誘発 LTP 時の刺激応答関係の解析

LTP 誘導の空間的不均一性は、各神経細胞要素の I/O 関係に関係している可能性がある。ここでは、刺激強度を変化させて (10, 25, 40, 60 V, Fig. 3-5) によって TBS 誘発 LTP による刺激応答の変化を測定した。Fig. 3-5A に、D-L 座標中央の代表点での光信号での応答を示した。20 秒ごとに刺激強度を変化させ、TBS 刺激前約 10 分から刺激後約 10 分までの光信号応答の変化の時間経過を Fig. 3-5A に示した。Fig. 3-5B は、D-L 座標の異なる位置での光信号記録の時間経過を示した。Fig. 3-5A,B より、TBS (刺激強度 25 V) が、I/O 関係の変化を引き起こしたことがわかる。LTP 誘発後、より小さな刺激強度に対する応答は、大きく増大したが、より強い刺激強度に対する応答は、増大の割合が小さかった。Fig. 3-5C は光信号応答のピーク値を 2D 画像に投影したものである。Fig. 3-5D に、経過時間と刺激強度に対する LTP 誘導率の解析画像を示した。刺激強度が強い (60 V) 場合、LTP 誘導は明確でなかったが、刺激強度が弱い時 (40 V (2 行目)、25 V (3 行目)) は、LTP による明確な増大が検出された。どちらの場合とも、SR よりも SO において、より LTP 誘導率が上昇し、その変化は刺激部位の近くよりも遠位領域で LTP がより顕著となった。PR ratio の変化は、中程度 (25 V, 40 V) の刺激強度では TBS の前後で大きく変化した。最も弱い刺激強度 (10 V) と最も強い刺激強度 (60 V) では明確な変化が現れなかった (Fig. 3-5E)。

3-3 結論

神経回路の入出力 (I/O) 関係における活動依存的な変化は、脳の学習および記憶機能の中心的課題である。回路全体の調整を理解するには、回路内の樹状突起、軸索、細胞体などの神経細胞のすべての要素で膜電位を計測する光計測技術が不可欠である。回路全体の活動動態の変化を評価するためには、定量的な長期連続測定が重要となる。本章では、VSD 光計測法で LTP の長期連続測定が可能になったことを示した。さらに、CA1 野のシナプス強度の LTP 誘発刺激による LTP に関連する回路活動の変化を網羅的に記録できることを明らかにした。

光学系と高速光計測システム、計測制御ソフトウェアの改良、開発により、CA1 野全体からの 60 秒ごとに 0.1 ms / frame の最大フレーム速度で 12 時間以上測定することができた。また、CA1 野の回路活性の変化を、異なる海馬スライス標本間で形態の差を超えて、網羅的に評価する方法を開発した。これらの手法を駆使して、長期間の LTP 計測における 2 種類の空間的不均一性を明確にすることができた。最初の不均一性は、刺激部位からの距離に依存して LTP 誘導率が増加する。2 番目の不均一性は、LTP が SR よりも SP、SO 領域で高いことである。また、TBS と HFS の LTP 誘導プロトコルの違いにより、LTP 誘導パターンが不均一に変化することも明らかにした。その不均一性は、回路要素の I/O 応答に依存することを実証した。通常の電気生理学的な計測法では、このような空間的不均一性は、単に実験条件の誤差と解釈されてしまう可能性が高いが、光計測で回路全体の LTP 誘導状態が可視化することにより正確に評価することができ、薬物の影響などをより詳細に検討することが可能となる。

4. 総括

「記憶・学習」など、脳の高次機能を理解するには個々の神経活動の動作とともに神経回路全体としての時空間的な機能の解明が必要となる。従来から広く用いられている電気生理学的な計測手法は電極を用いて個々の神経細胞の膜電位変化、あるいは一部の神経細胞集合の電位変化 (集合電位等) を計測するものであり、回路全体としての時空間動態を知ることは困難である。膜電位感受性色素 (Voltage Sensitive Dye: VSD) を用いた計測方法では、VSD が細胞膜に組み込まれ、個々の VSD が膜電位変化に応じた蛍光量の変化を示すことを利用する。これにより細胞の各膜区分の電位変化を蛍光量変化という光の信号に置き換えて計測することが可能となる。本研究では、ラットおよびマウスから作成した海馬スライス標本を VSD (Di-4-ANEPPS) で染色した測定系 (bulk staining measurement) において、安定した計測を行う新規な手法を開発し、また計測データの解析方法を確立することを目標とした。

本論文において、第 1 章では光計測の定量的計測方法を確立した。神経回路活動を計測するための光計測システムを確立するためには様々な技術要件を満たす必要がある。(1) ダイナミックレンジが広く、高い時間空間分解能を満たすカメラシステムの開発、(2) 低倍率で高い開口数を実現し、できるだけ蛍光量を大きく捕捉する顕微鏡システムの開発、(3) 長時間生理活性を保って安定して計測を行うためのスライス標本作成の確立、(4) VSD の検討及び染色手順の確立、(5) 計測用チャンバーシステムの開発など、多くの課題を乗り越えて、安定して長時間計測可能なシステムを構築、開発した。この方法を駆使して、生理学的状態に影響を与えることなく、安定した信頼性の高い定量的な計測を行うことが可能となった。その光信号の時間経過と振幅は、電気生理学的手法による細胞内および細胞外の記録と一致した長時間の安定した計測することができた。

第 2 章では、第 1 章において確立させた計測方法を元に光計測データについての検討を行った。海馬 CA1 野での光計測では、数 10 mV のシナプス電位に対応する放射状層 (SO) の計測値が大きく、100 mV に及ぶ活動電位を反映すると思われる錐体細胞層 (SP) の計測値がそれよりも小さいことは、それまで十分に説明されていなかった。最

初に、VSD の感度に組織依存性・層依存性がないことを示すために、海馬スライス標本を高カリウム溶液を用いて組織非依存的に電位固定し、活動電位も起こさないように電位感受性ナトリウムチャンネル阻害薬 (TTX) を加えた状態で計測すると、海馬 CA1 野全体においてほぼ一様な光信号が検出できることを示した。この結果より、VSD 感度には部位または層依存性はなく、どの部位・層の膜においても、光信号は膜電位の大きさに応じた振幅で検出されることが明らかとなった。

次に、シャッファ側枝への電気刺激で錐体細胞層 (SP) の光信号が放射状層 (SO) の光信号に比べて小さい理由を解明するために、NEURON シミュレータによる膜区分毎の膜電位応答を算出した。これを集合信号 (population signal) として考えた場合に予想できる応答分布を計算し、それぞれの錐体細胞の活動電位発火の発火率が 1/100、すなわち 100 個に 1 個くらいの発火率であると考えれば光信号の応答分布が説明できることを示した。すなわち、放射状層 (SO) の光信号の振幅の方が錐体細胞層 (SP) の光信号の振幅よりも大きい理由は、光信号が集合信号であることが要因であることを明らかにした。

この結果を用いることにより、本計測法から得られる錐体細胞に沿った応答分布への GABA_A 受容体阻害剤 (PITX) の作用を調べることにより、フィードフォワード抑制とフィードバック抑制の入力部位とその影響の大きさを可視化して示すことができた。

第 3 章では、第 1 章および第 2 章で示した VSD 光計測法の改良、信号の検証を基礎として、マウス海馬スライス標本の CA1 野における LTP 誘導に伴う変化を測定した。これまでの VSD 光計測法の開発により、0.1 ms / frame で 400 ms の記録を達成するために必要な励起光を反復して露光しても CA1 野の神経活動の変化を長時間 (12 時間) にわたって定量的に追跡できた。すなわち、海馬スライス標本の L-LTP (後期長期増強: Huang et al., 1996; Kandel, 2001) も計測できることを明らかにした。さらに、CA1 野の形態学的な差異を空間的に校正する方法を開発することで異なるスライス標本のデータを同じ座標軸で評価した。この手法により、TBS と HFS による LTP 誘導の違いを示すことが可能となった。また、LTP が刺激応答関係に及ぼす時空間的影響を明らかにした。

海馬 LTP は、アルツハイマー型認知症 (AD) や自閉症スペクトラム症候群 (ASD) を含む精神神経疾患動物モデルの神経機能を評価するための重要な指標の 1 つである (Monday and Castillo, 2017; Monday et al., 2018)。本研究で開発した光計測法を用いた LTP 測定は、精神神経疾患の発症機構やそれに関与する分子、薬物の影響を詳細に検討できることが期待される。従来の電気生理学的な点計測では、LTP の時空間的な違いは計測できないため誤った結論を導く可能性があるが、本光計測法を用いて、LTP の正確な時空間パターンを検出し、正しい評価を行うことができる。

LTP の時空間的差異は、回路の E / I バランスを反映し、AD、ASD などの精神神経疾患は、E / I バランスと密接に関係している (Gogolla et al., 2009; Takesian and Hensch, 2013; Murray et al., 2014)。したがって、LTP 誘導中の時空間パターンの変化 (Jackson, 2013; Stepan et al., 2015) は、これらの脳精神神経疾患の病態を検討するための重要なターゲットになる可能性があり、本計測法は大変有用である。

ASD を含め、脳の発生発達への外来化学物質の影響が注目されている。特に、環境物質としての化学物質暴露や、治療薬 (抗てんかん薬等) としての化学物質投与の発生初期に影響を与えると考えられている。このような外来化学物質の早期暴露による神経回路動作の変調・改変のターゲットは、未だ解明されておらず、回路全体を調べる技術として、本研究で開発された技法はとても重要である。現在、本計測法を用いて、抗てんかん薬であるバルプロ酸を安全基準にのっとり摂取量で妊婦へ投与したときの仔への影響について評価や、環境ホルモンといわれるビスフェノールや農薬 (ネオニコチノイド) などの妊娠期の摂取における仔への影響などの評価も行うことができる。さらに、アルツハイマー病等の認知症治療薬としての新薬の効果についても (小野薬品株式会社との共同研究)、遂行中である。本光計測法を用いた評価法は、脳神経回路、とくに海馬における環境ホルモンや薬剤投与などの影響の有力な機構解析法となりうる。

【海馬での光計測について】

哺乳類の脳組織に VSD イメージングを適用する先駆的な試み (Grinvald et al., 1982) 以来、海馬スライス標本は頻繁に用いられてきた。海馬の層構造のおかげで、海馬スライス標本を使うことで光信号を細胞体および樹状突起の特定の膜要素に簡単に割り当てることができる (Witter, 1993)。光計測の比較的初期には吸光色素 (RH-155, RH-482 など) が、しばしばシナプスの薬理的性質の検証に使われてきた (Ratzlaff and Grinvald, 1991; Barish et al., 1996; Nakagami et al., 1997; Sekino et al., 1997; Kojima et al., 1999; Jin et al., 2002)。また 2000 年以降は蛍光色素が多く用いられるようになった (Tominaga et al., 2000, 2002b, 2013; Mann et al., 2005; Suh et al., 2011; Juliandi et al., 2016; Tominaga and Tominaga, 2016)。長期記録に関しては、吸光色素 (主に Momose-Sato et al., 1999; Mochida et al., 2001; Jin et al., 2002; Chang and Jackson, 2006; Chang et al., 2007; Wright and Jackson, 2014) および蛍光色素 (Tominaga et al., 2000) で試されている。

第 1 章、第 2 章でも紹介したようにいくつかの試験の結果、我々は Di-4-ANNEPS (Fluhler et al., 1985; Loew et al., 1992) の使用を推奨している。この色素は、水溶液よりも脂質に非常に溶けやすく、色素が膜内により長く残ることができる。この特性は、特に生理的溶液を脳スライスに継続的に灌流し、色素の「脱染色 (wash out)」を引き起こす *in vitro* 標本の場合、長期の記録を達成するのに必須である。スライス標本の脱染色と不均等な染色は、生理学的活動によるものではない信号の大きさの変化を引き起こす可能性がある。蛍光色素は、吸光色素に比べ信号が初期光量で校正でき、これらの問題を避ける上で有利である。また、Di-4-ANEPPS で得られた光信号の時間経過が、吸光色素で記録された時間経過と異なることも注目に値する (Grinvald et al., 1982 (RH-155) および Momose-Sato et al., 1999 (NK3630/RH482))。吸光色素記録、特に RH-155 はジヒドロカイネート (DHK、グリアグルタミン酸トランスポーターGLT-1 の阻害剤) の適用に敏感な光学成分を持っているため、グリア性の信号が含まれると考えられる (Kojima et al., 1999)。Di-4-ANEPPS を使用した光信号には、このような成分はみとめられなかった (Tominaga et al., 2002b)。一方、吸光色素はその性質により光毒性が少ない可能性がある。そのため、測定の実験の目的と結果に応じて、実験に適した色素の

種類を選択する必要がある。計測システムが重大な光毒性を引き起こさないように注意深く設計できている場合は、グリア性信号およびその他の固有の光学信号の混入が少ないため、蛍光色素の方が優れていると考えられる。

【LTP の空間分布の不均一性】

第3章に示したように LTP の程度には少なくとも 2 つの空間的な違いがあった。1 つ目は、SO-SP と SR の違いである。つまり、SO-SP は常に SR よりも高い LTP を示した。SO-SP 光信号は、細胞体の膜電位イベントを主に反映し (Tominaga et al., 2009)、これは活動電位発火特性を反映するため、刺激と反応の関係は、樹状突起部のシナプス電位を反映する SR での信号よりもより急な勾配を持つ (Tominaga et al., 2000) ことを反映している。

他の空間的な違いは L 軸である。つまり、遠位部位の LTP は近位部位よりも大きかった。このような刺激部位からの距離に応じた LTP の増加は、回路活動における介在神経細胞の関与の増加を反映している可能性がある。遠方の細胞は、近位の細胞よりも多くの障害を受けると考えられるためである。この可能性は、今後の研究でさらなる検討が必要である。

【シータバースト刺激とテタヌス刺激 (高頻度刺激)】

海馬の LTP は、学習と記憶のシナプスモデルであると考えられている (Bliss and Gardner-Medwin, 1973; Bliss and Collingridge, 1993)。テタヌス (高頻度刺激: HFS) は、海馬回路で LTP を誘発するために使用された最初の刺激パラダイムである。しかし、永らくこの刺激パターンは人工的なものであるという議論がある。なぜなら、そのような活動は生体脳内では発生しないからである。一方、げっ歯類は、新規物、新規空間を探索しながらシータ活動を示すが、場所細胞 (Place cell) はこのシータ振動に伴って形成されることが知られている (O'Keefe and Dostrovsky, 1971; Larson and Munkácsy, 2015)。このシータ活動を模倣する刺激パラダイム、すなわちシータバースト刺激

(TBS) は、CA3-CA1 シナプスで LTP を正常に誘導する (Larson and Lynch, 1986; Larson et al., 1986)。TBS はさまざまなタイプの LTP を誘発すると考えられている (Larson and Munkácsy, 2015)。

LTP の誘導期中、TBS はより多くの活動電位を誘発するが、HFS は刺激中に活動電位を抑制することを報告した(Tominaga et al., 2002)。両方の応答には、GABA_A 受容体の活性化を介した GABA 作動系が関与している (Tominaga and Tominaga, 2010、2016)。HFS は、主に長時間持続する脱分極性 GABA_A 電位 (depolarizing GABA_A receptor potential)を誘導し (Kaila et al., 1997, 2014; Voipio and Kaila, 2000)、コンダクタンスの増加は短絡による活動電位発火を抑制する (Tominaga and Tominaga, 2010)。

【今後の光計測法の課題】

遺伝的にコード化された膜電位インジケータ (GEVI) を使用すると、細胞タイプ固有の発現を通じてこの分野が大幅に進歩する可能性がある (Vranesic et al., 1994; Knöpfel, 2008, 2012; Knöpfel and Song 2019)。これを含めた膜電位の可視化解析の重要性はますます大きくなってきており、今後もさらなる技術革新が求められている。脳神経回路全体の挙動を捉える必要がある一方で、個々の神経細胞活動を把握することも必要である。これまでで確立してきた光計測法および解析法を利用しつつ、遺伝的にコード化された膜電位インジケータ (GEVI) を使用し、細胞タイプ固有の発現を通じて、脳神経回路全体の挙動とともに、個々の神経細胞挙動も同時に計測できるシステムを確立し、研究を進めていきたい。

図表一覧

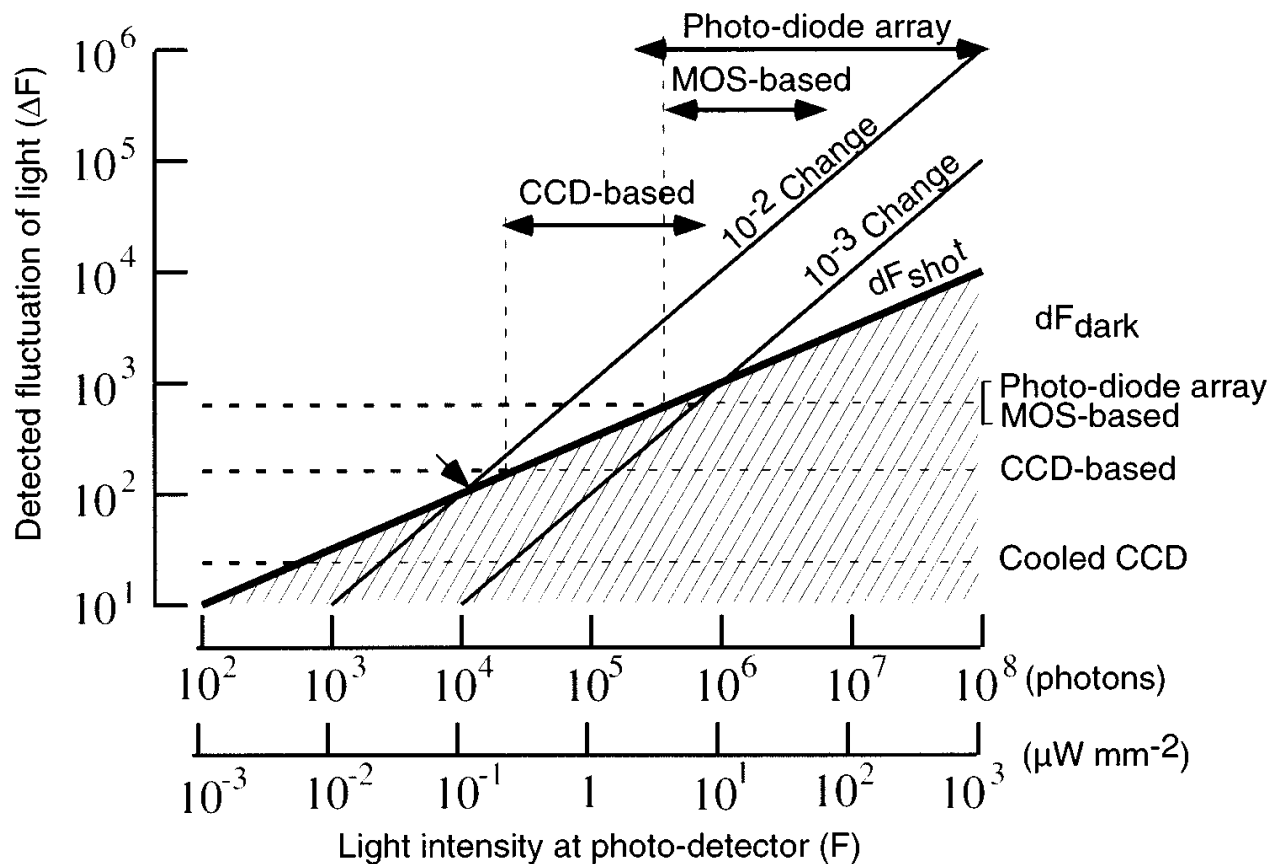


Fig. 1-1. 光強度の関数としての2つの異なる感度 (10^{-2} および 10^{-3} の変化) とフォトンショットノイズ (dF_{shot}) の電位感受性色素によって引き起こされる光検出器での光強度の変化を示す概略図。各イメージングデバイス (フォトダイオードアレイ、MOS ベースのモノリシックアレイ、CCD ベースのカメラ、Cooled CCD) に固有のダークノイズレベルをそれぞれ点線で示した。各デバイスのダイナミックレンジは、プロットの上部に示してある。下側にある単位面積あたりのエネルギーの光強度のスケールは、光の波長が 720 nm のときに有効な光検出器面積が $3 \times 10^{-5} \text{ mm}^{-2}$ であると仮定して近似した。(T.

Tominaga, Y. Tominaga, et al., *J Neurosci. Methods* 2000)

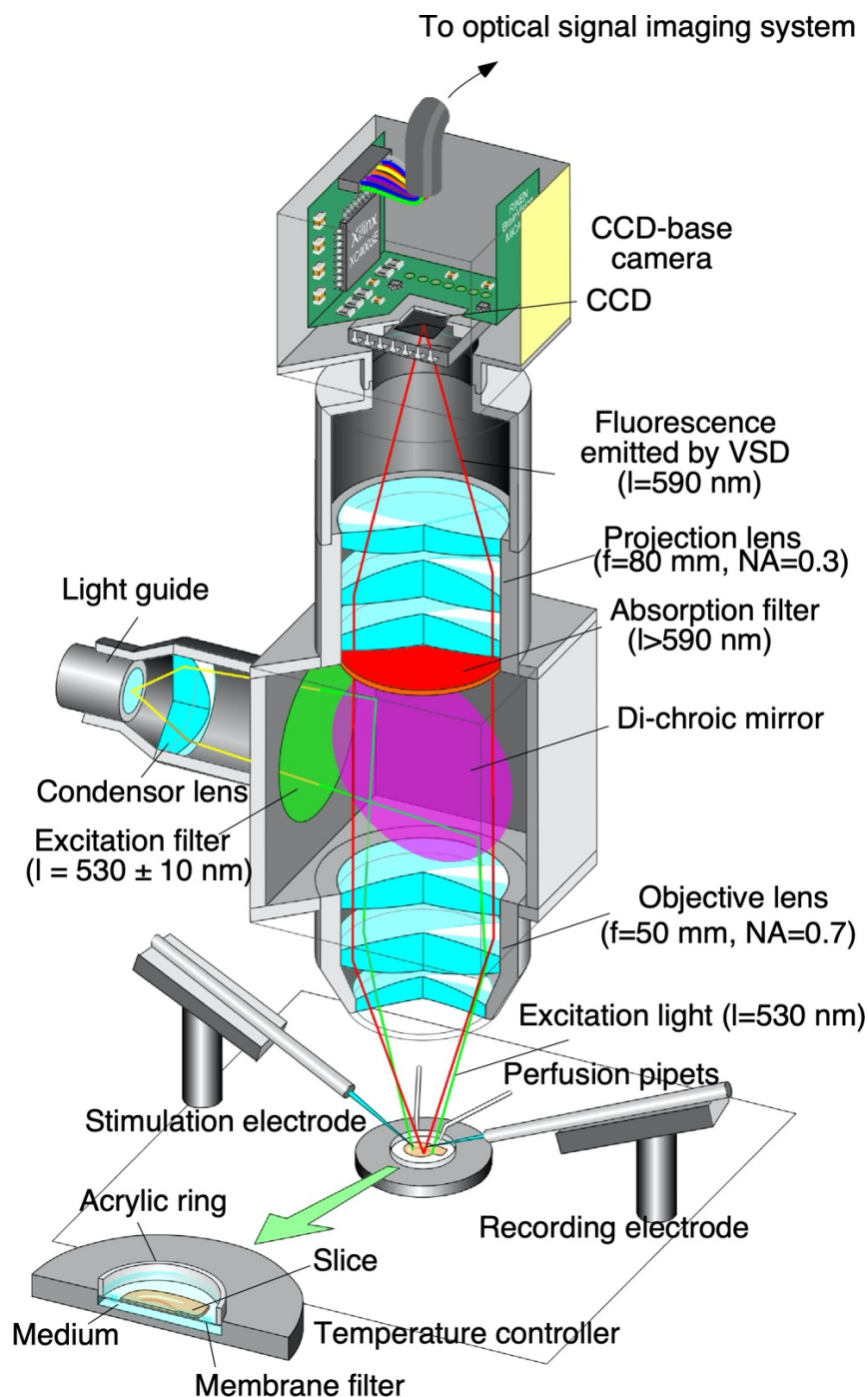


Fig. 1-2. 高開口数の落射蛍光光学系、カメラシステム、セットアップの概略図。変更を加えた 35 mm カメラレンズ ($f=50$ mm, $F/1.4$, Nikon) を対物レンズとして使用し、双眼顕微鏡の対物レンズ ($f=55$ mm, $\times 1.0$ for Leica MZ-APO, Leica Microsystems) を投影レンズとして使用した。システムの最終倍率は 1.5 倍。ハロゲン光源 (150 W; MHF-G150LR, Moritex Corp.) 使用。入力光は励起フィルター ($\lambda = 530 \pm 10$ nm) を通した後、ダイクロイックミラーで反射され対物レンズを通してスライスに到達。VSD からの蛍光はダイクロイックミラーを透過して吸収フィルター ($\lambda > 590$ nm) を通って CCD センサーに投影される。(T. Tominaga, Y. Tominaga, et al., *J Neurosci. Methods* 2000)

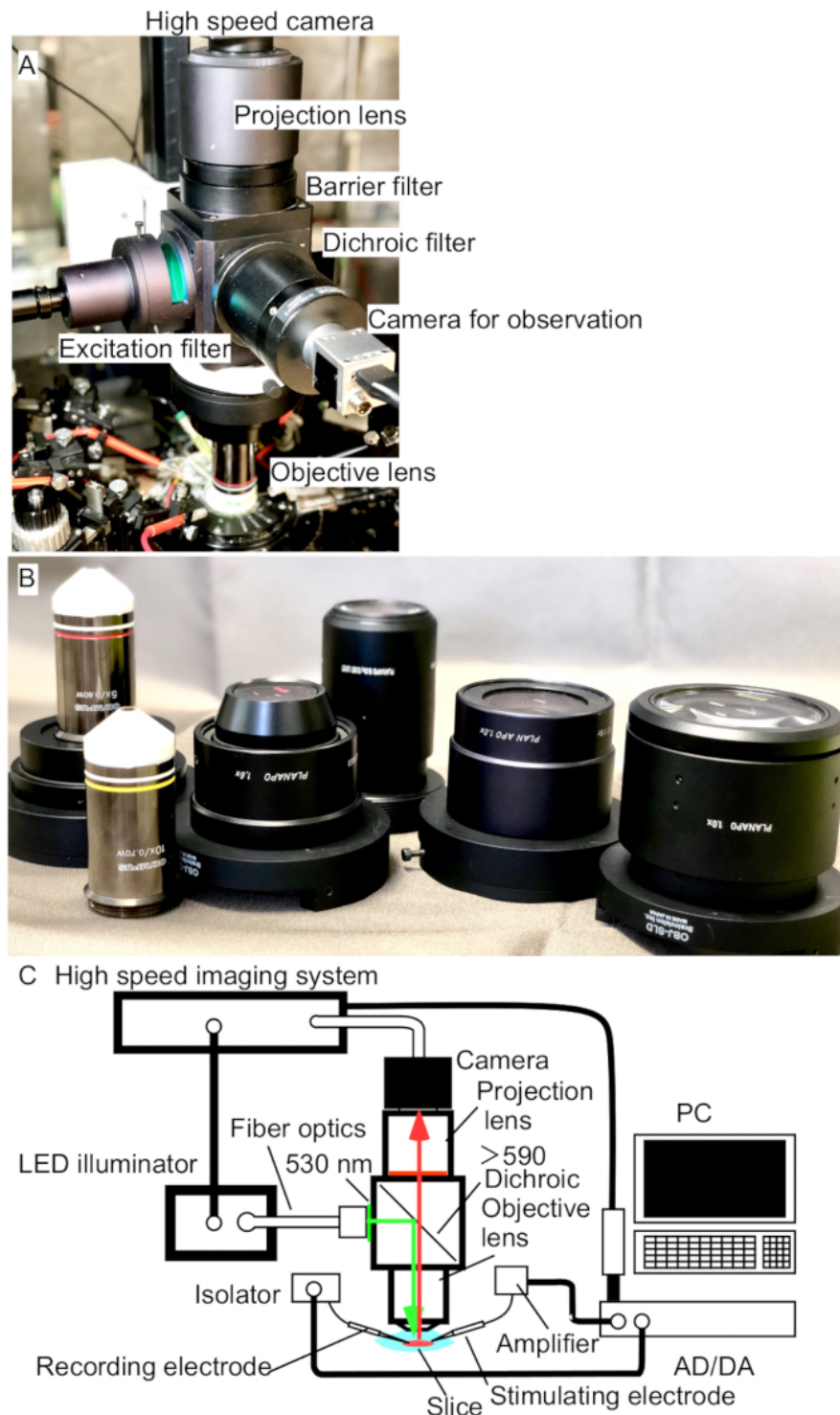


Fig. 1-3. スライス標本からの光信号記録システム。(A) 現行システムの顕微鏡部分の写真。光学系は、対物レンズ (x5 NA 0.60)、ダイクロイックフィルター用ミラーボックス (580 nm)、および投影 (チューブ) レンズ (PLAN APO x1.0) で構成。高速カメラは、C マウントで投影レンズの上部に取り付けてある。励起光は、光ファイバーを使用して投射される。(B) ミラーボックスと互換性のあるレンズ群。(C) 記録システムの概略図。イメージングシステムおよび電気生理記録システムとも、PCで制御している。現在は光源として、フォトダイオードフィードバック制御システムを備えたLED照明システムを使用。(Y Tominaga, et al., *J Vis Exp.*, 2019)

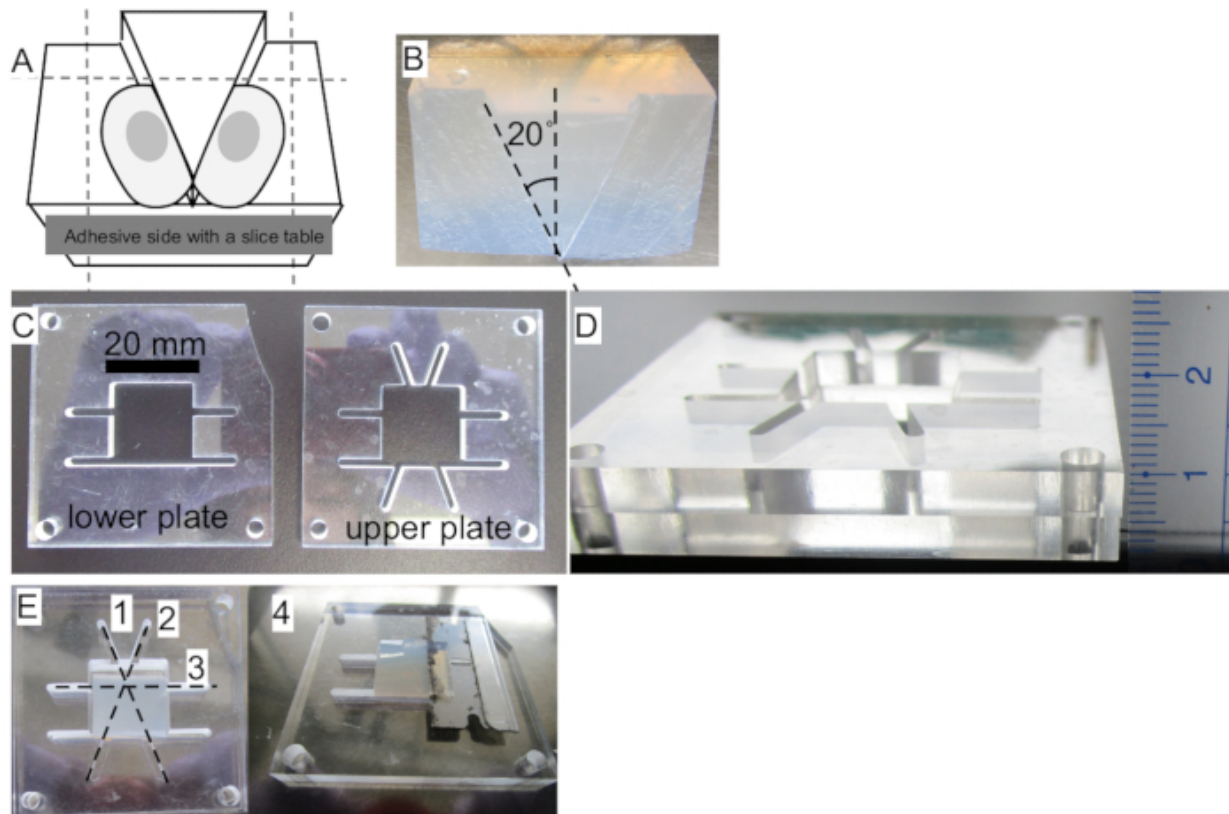


Fig. 1-4. マウス脳スライス作成時の脳組織をマウントするために使用する寒天ブロックとブロックを作成するための治具 (テンプレート)。(A) 脳ブロックを4%寒天ブロック (B) にのせた時の概略図。(C、D) 寒天ブロックを作成するための治具。アクリルプレート (厚さ 5 mm) の治具を研究室で作成し、この治具にそって寒天ブロックを作成する。その寒天ブロック上に脳ブロックを置いてスライスを作成することにより、どの実験でも常に同質のスライスが作れるように工夫した。(E) 寒天ブロックをトリミングして、(A)、(B) の形に成形する。(Y Tominaga, et al., *J Vis Exp.*, 2019)

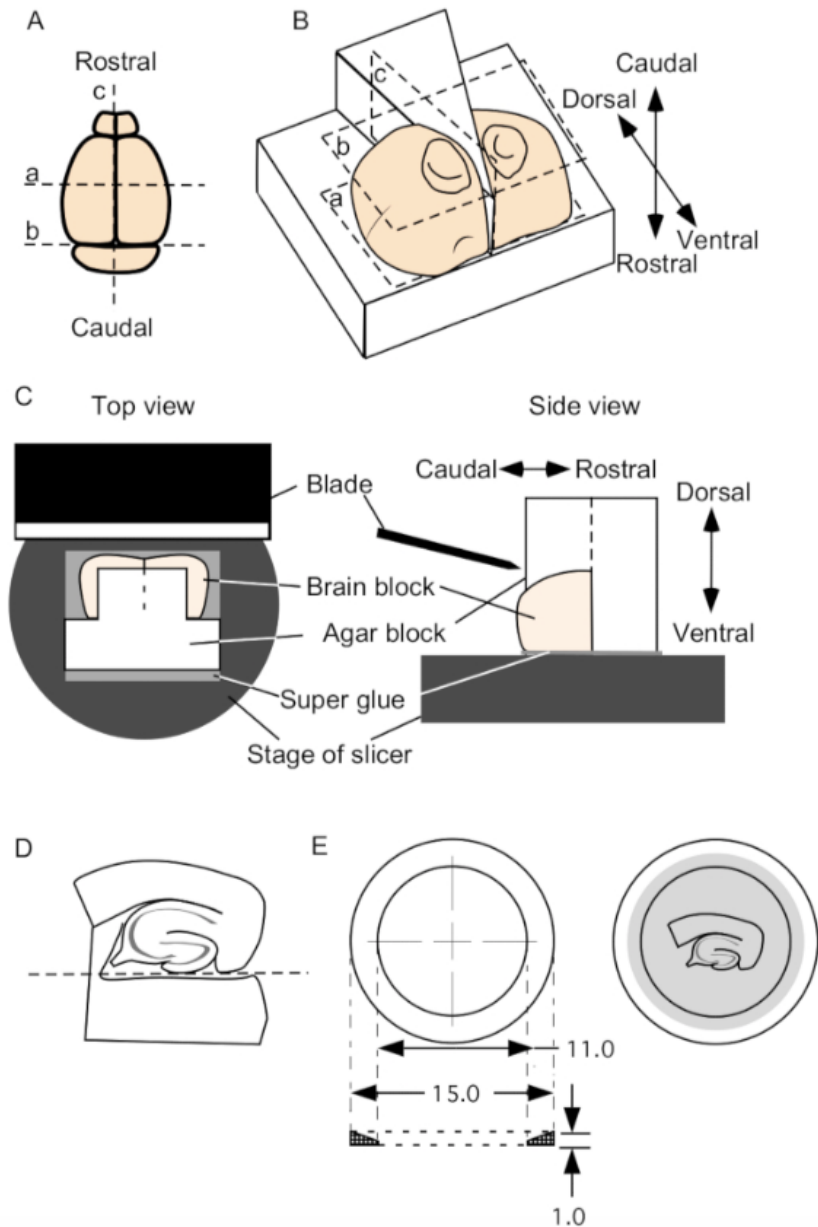


Fig. 1-5. マウス脳からの海馬スライス標本作成。(A) マウスの脳を取り出し、破線 (a), (b) で切断する。最後に、線 (c) に沿って切断する。底に対して垂直に切断すること。(B) 脳ブロックを寒天ブロックにマウントする。(C) Rostral (吻) 側が寒天面につくように脳ブロックを寒天ブロックにのせ、寒天ブロック全体をリングピンセットでつかんで、Ventral (腹) 側が下 (グルーにつく) ようにし、脳ブロックがブレード側になるようにセットする。(D) スライサーでスライスしたもので、余分な組織がついているので、破線で切断する。(E) アクリルホルダー (外径 15 mm、内径 11 mm。直径 13 mm のポリテトラフルオロエチレン (PTFE) メンブレンフィルター (ポアサイズ 0.45 μm) を貼ったもの) にスライスをのせる。計測しやすいよう、メンブレンフィルターの中央に配置する。メンブレンフィルターは ACSF に浸すと半透明になり、明視野照明でスライスを確認できる。リングは薄く作ってあるため、電気生理測定が可能である。スライスはメンブレンフィルターに自然に付着するため、水没型の記録チャンバーにスライスを固定するための特別な仕組みは必要ない。(Y Tominaga, et al., *J Vis Exp.*, 2019)

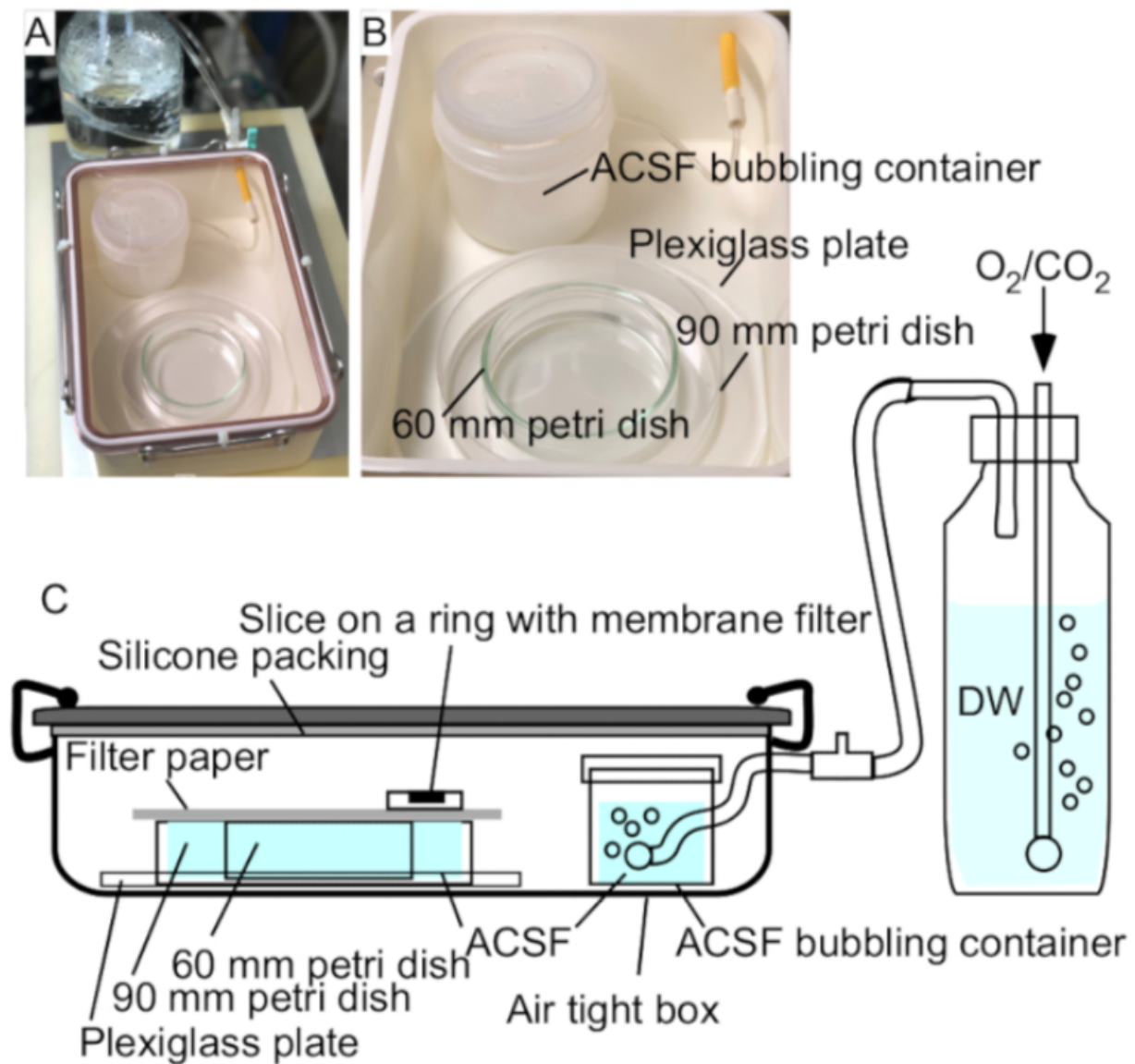


Fig. 1-6. スライスの生理機能を維持するためのチャンバー。 (A) システムの全体図。 (B) チャンバー内部。 (C) モイストチャンバーの模式図。 90 mm および 60 mm のペトリ皿に ACSF を満たし、その上にろ紙を敷く。ろ紙は ACSF で十分に湿るので、その上にスライスを置く。ペトリ皿と ACSF バブリング用コンテナは、アクリルプレートで固定する。O₂ (95%) / CO₂ (5%) は、バブリングボトルを通して十分加湿した後に、チャンバー内に供給する。 (Y Tominaga, et al., *J Vis Exp.*, 2019)

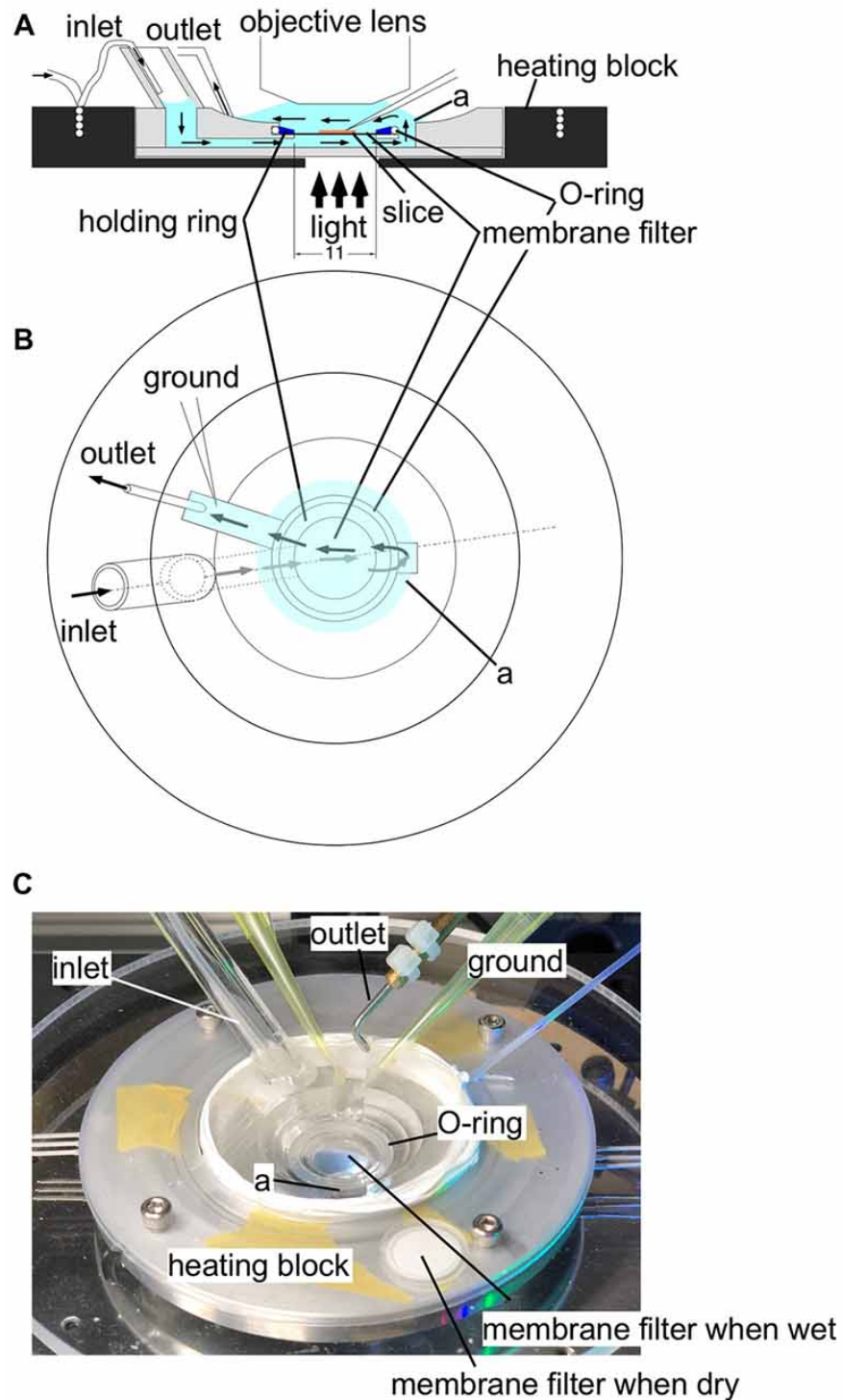


Fig. 1-7. 計測用チャンバーシステム。(A) チャンバーの側面図。アクリル製のチャンバーを、アルミニウム製の温度調節用加熱ブロック (黒) で囲んでいる。ACSF は試料の下を流れた後、接続チャンネルを流れて試料の上を流れる。スライスをしたアクリルリングは O リングでチャンバーに密着させるため、ACSF は常に一定方向に流れ、ガスとグルコースの十分な供給が可能となる。その後、ACSF はアウトレットチューブで吸い出す。(B) チャンバーシステムの上面図。矢印は、ACSF の流れを表す。(C) 実験記録システムの写真。(Y Tominaga, et al., *Front. Cell. Neurosci.*, 2018)

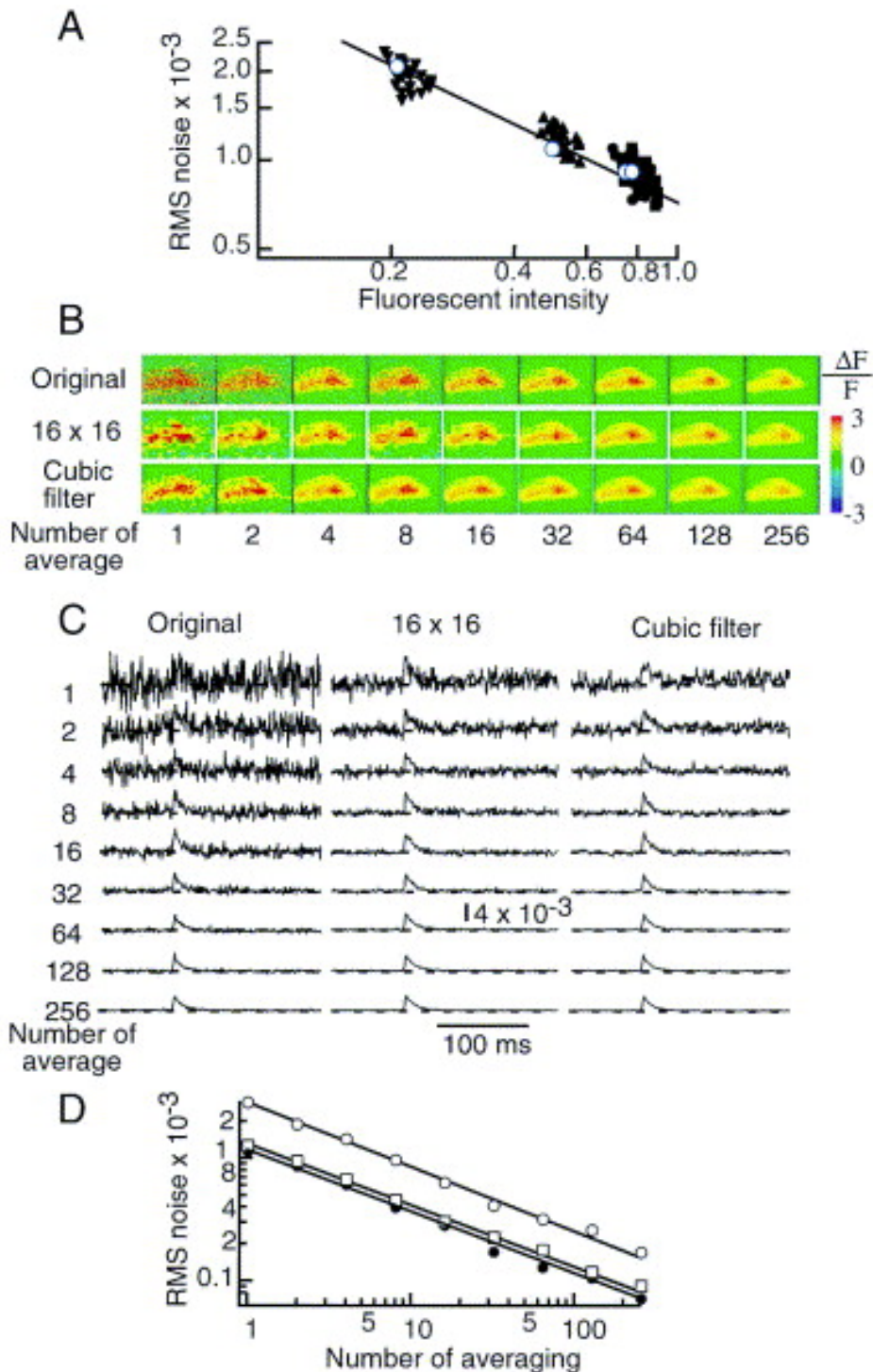


Fig. 1-8. 光信号のノイズ。(A) 光信号 ($\Delta F/F$) の二乗平均平方根 (RMS) ノイズと蛍光強度 (F) の関係。白抜き記号は、各光強度に対する画像の RMS ノイズ (記録領域の中央にある 10×10 ピクセル領域) を示している。黒塗り記号 ($\blacktriangledown, \blacktriangle, \blacksquare, \bullet$) は、記録領域の中心でのベースライン光信号の RMS ノイズである (刺激の 70 msec 前)。各黒塗り記号は、ベースラインの絶対光強度に対してプロットした。これは、それぞれの部位での組織学的差異によって異なる。黒塗り記号の回帰直線を示した: 傾き = -0.59 ± 0.02 , $r = 0.94$, $n = 60$ (n は各ピクセルでの測定値の数)。(B) 刺激後 11 ms のフレーム画像に対して、最上行がオリジナル画像データ、中間行は最大 16×16 ピクセルにビンングした画像データ、最下行はキュー

ビックソフトウェアフィルターでフィルタリングした画像データである。それぞれに対し、異なる試行回数 (1~256) の平均化 (加算平均) を行った画像データを並べた。右に行くにつれて加算平均回数が増えている。(C) 各トレースは、最左列がオリジナル画像データ、中間列が 16 x 16 ビニング画像データ、最右列がキュービックフィルターでフィルタリングした画像データから記録領域の中心 (放射状層) での光信号の時間経過を抽出したものである。下に行くにつれて、それぞれ加算平均回数が増加した時のトレースを示す。(D) 加算平均手法を用いて平均化した試行回数に対する各データセットのベースラインの RMS ノイズの関係をプロットした。○：オリジナルデータのベースライン RMS ノイズ。●：キュービックフィルター処理したデータの RMS ノイズ。□：ビンニングしたデータの RMS ノイズ。直線は回帰直線である。勾配は、オリジナルデータでは -0.51 ± 0.01 , $r = 0.99$ 、キュービックフィルター処理したデータでは -0.51 ± 0.01 , $r = 0.99$ 、ビンニングしたデータでは -0.48 ± 0.01 , $r = 0.99$ であった。(T. Tominaga, Y. Tominaga, et al., *J Neurosci. Methods* 2000)

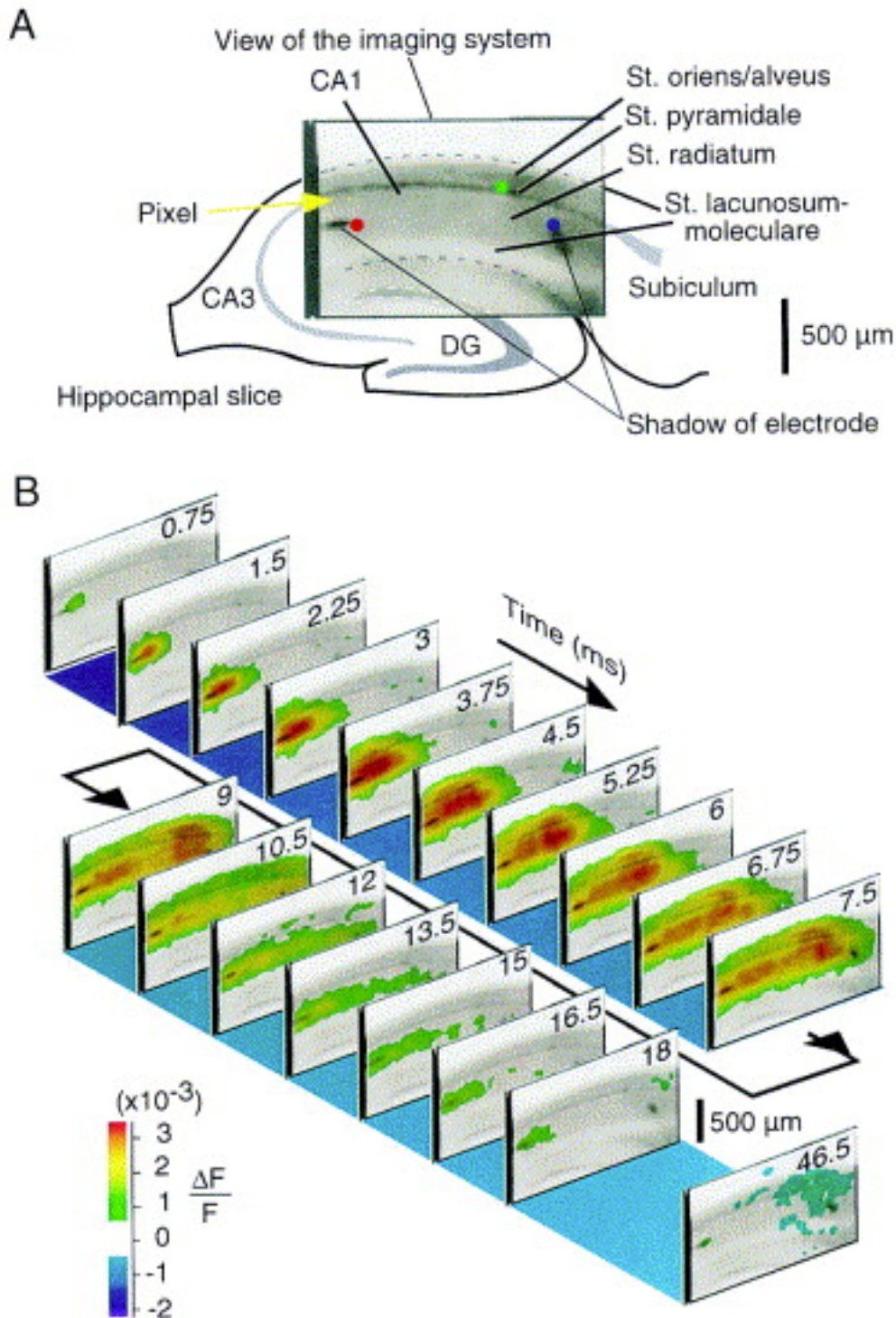


Fig. 1-9. VSD 染色したラット海馬 CA1 領域の蛍光画像 (対物面で 2 x 1.3mm) と光信号で捉えた海馬神経活動が時間経過。(A) 光計測システムで得られた蛍光画像を、海馬の横断面の概略図に重ねた。色付きのドットは、電極先端の位置を示しています。赤: 刺激電極、緑: 細胞内電極、青: 細胞外電極。(B) シャーファー側路に単発の電気刺激を入力した時の応答を $\Delta F/F$ で蛍光強度の変化を示した連続画像。ラット海馬スライス CA1 各層に沿って応答が広がっていくことがわかる。画像上の数字は、刺激後の時間 (msec) を示す。左下のスケールバーに表示した擬似カラーは、信号の振幅の変化を表す。(T. Tominaga, Y. Tominaga, et al., *J Neurosci. Methods* 2000)

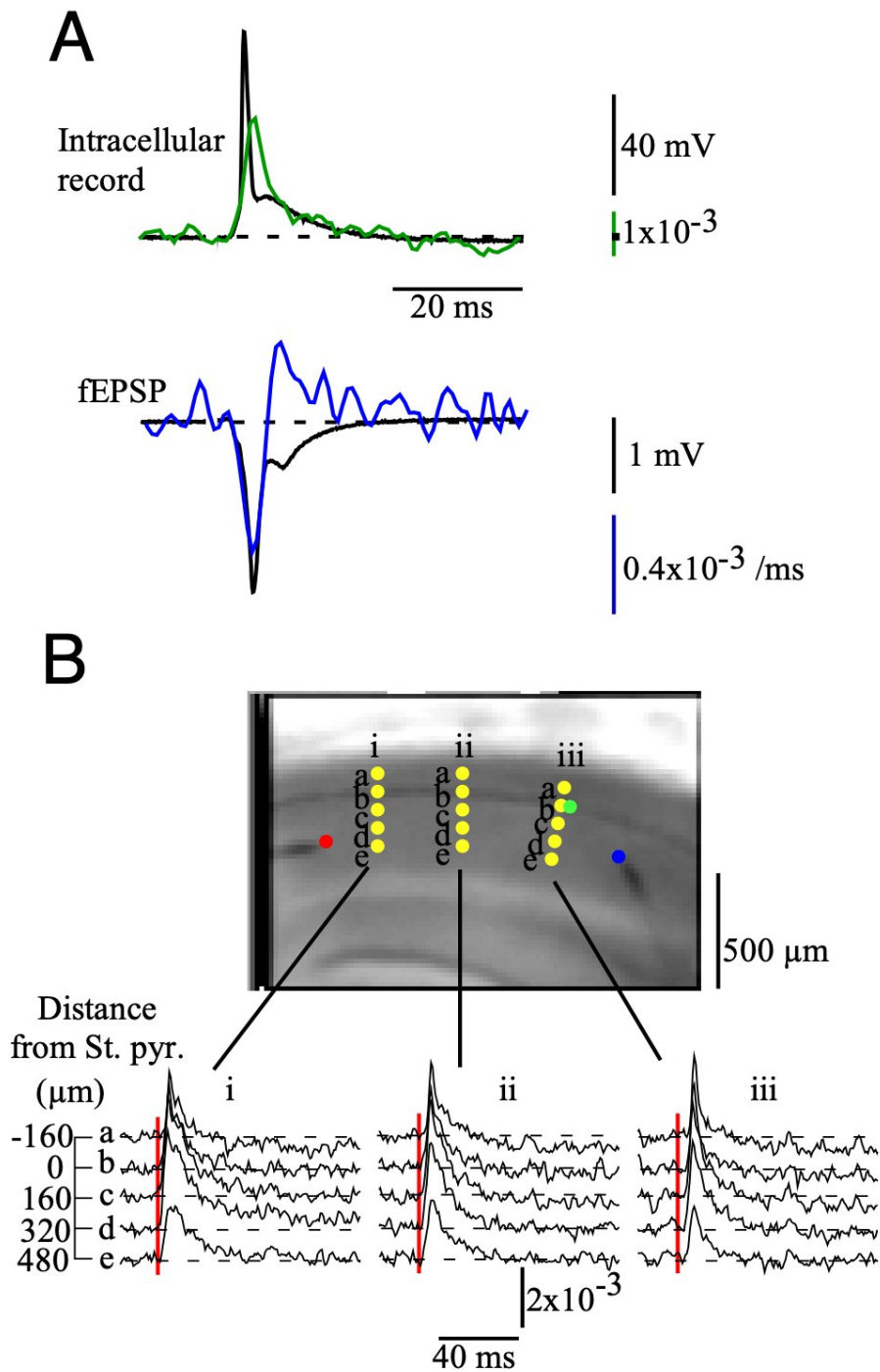


Fig. 1-10. VSD シグナルで捉えた海馬 CA1 の各部位における時間経過のトレースと細胞内記録のデータおよびフィールド電位記録のデータとの比較。(A) 細胞内電極 (細線、上部のトレース) および細胞外電極 (細線、下部のトレース) で記録した電気信号と光信号 (上下それぞれの図に重ねた太線トレース) の比較。(B) CA1 の縦軸に沿った3つの異なる位置 (i、ii、および iii) 上の画像の点 (a-e) で示した部位の代表的なトレース (光信号)。(T. Tominaga, Y. Tominaga, et al., *J Neurosci. Methods* 2000)

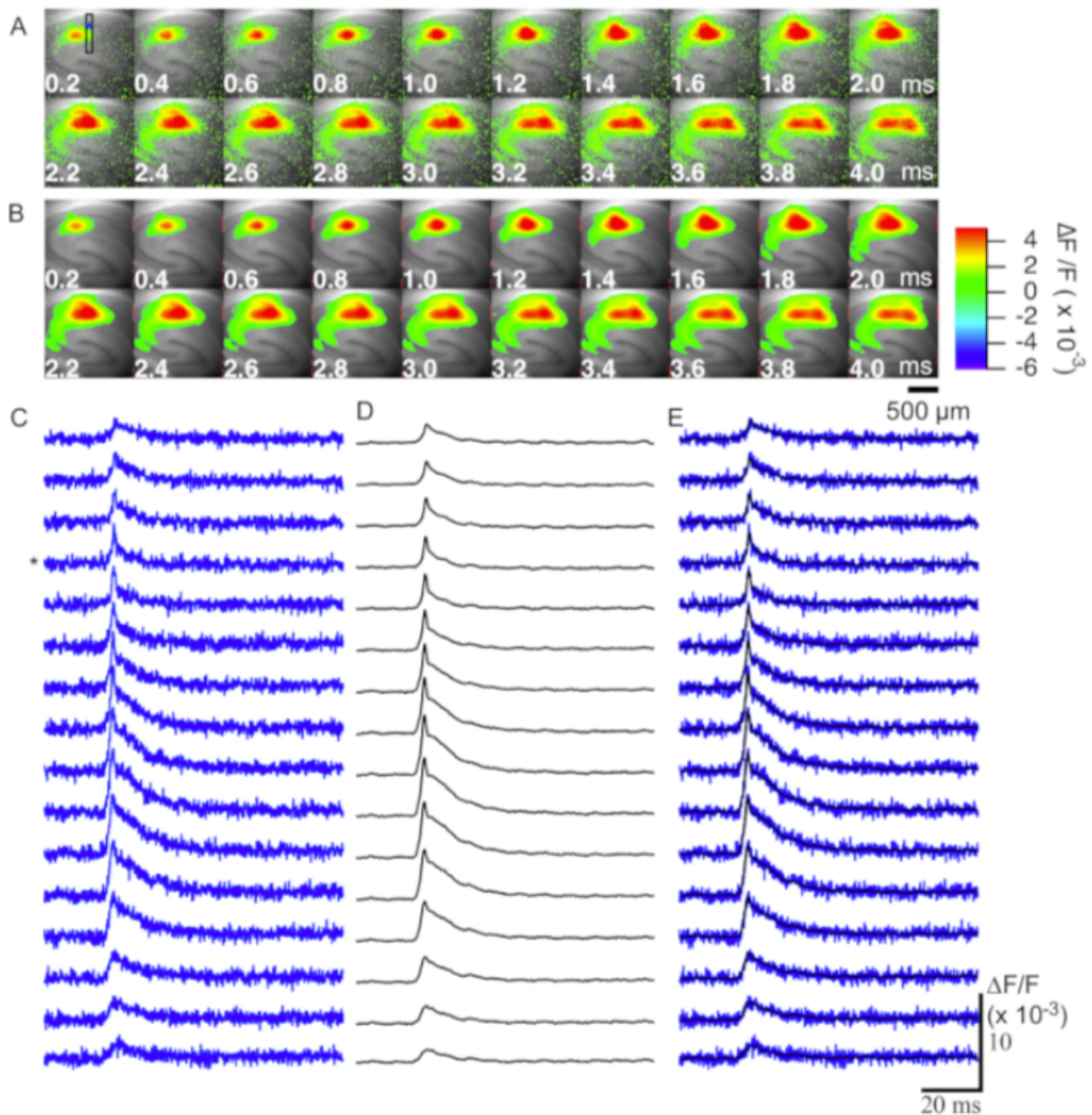


Fig. 1-11. 1回の試行におけるマウス海馬 CA1 領域の代表的な光信号。(A) フィルターをかけていない光計測データ。フレームレート 0.1 ms / frame。連続画像は 0.2 ms ごとに表示した。(B) フィルターとして $5 \times 5 \times 5$ のキュービックフィルター (3次元ガウシアンカーネル) を 2回適用した後の同じデータ。(C、D) 代表的なピクセルの光信号のトレース。*は錐体細胞層 (SP)。CA1 中央の縦軸 (錐体細胞の細胞体樹状軸) に沿って 2 ピクセル ($36 \mu\text{m}$) 間隔のトレースを表示 ((A) の矩形部)。(E) C の上に D のトレースを重ね合わせて示す。C、D のトレースはきれいに重なり合うことが確認できる。(Y Tominaga, et al., *J Vis Exp.*, 2019)

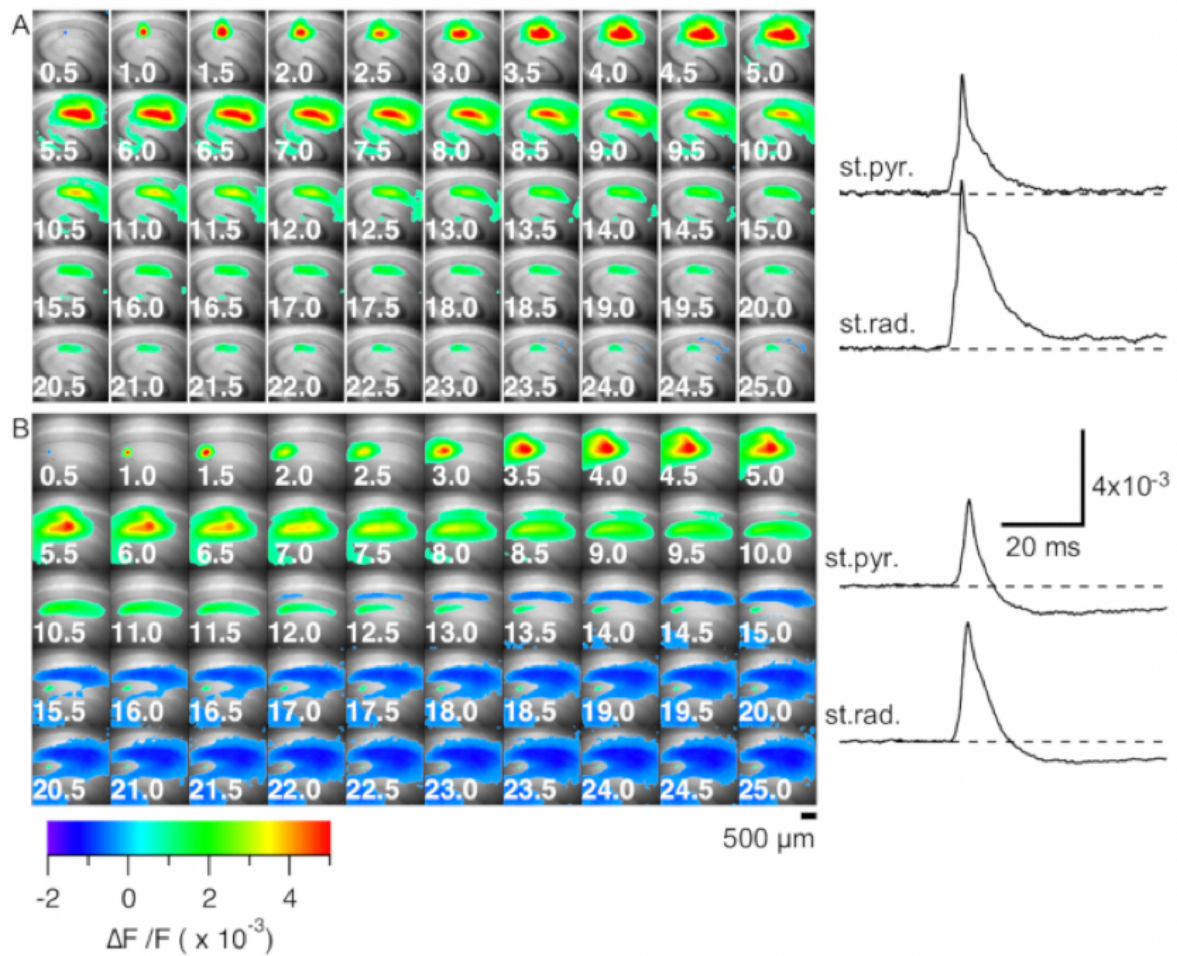


Fig. 1-12. マウスとラットの海馬スライスにおける光信号の比較。 マウス (A) およびラット (B) 海馬スライスにおいて CA3 / CA1 境界付近のシャプアー側枝へ電気刺激を与えた時の代表的な連続画像。錐体細胞層 (SP) および放射状層 (SR) での CA1 中央の光信号のトレース (時間変化の様子) を、図の右側に示す。 (Y Tominaga, et al., *J Vis Exp.*, 2019)

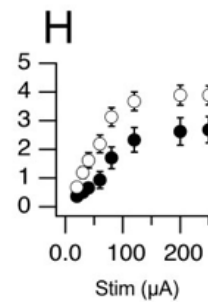
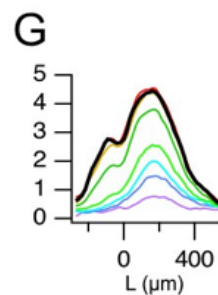
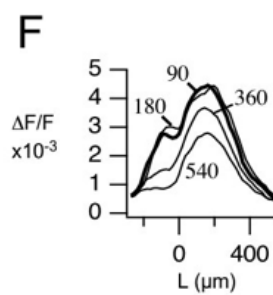
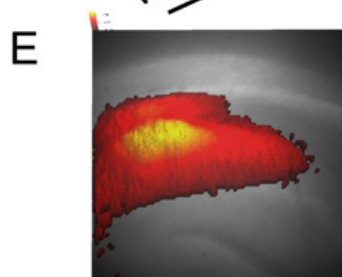
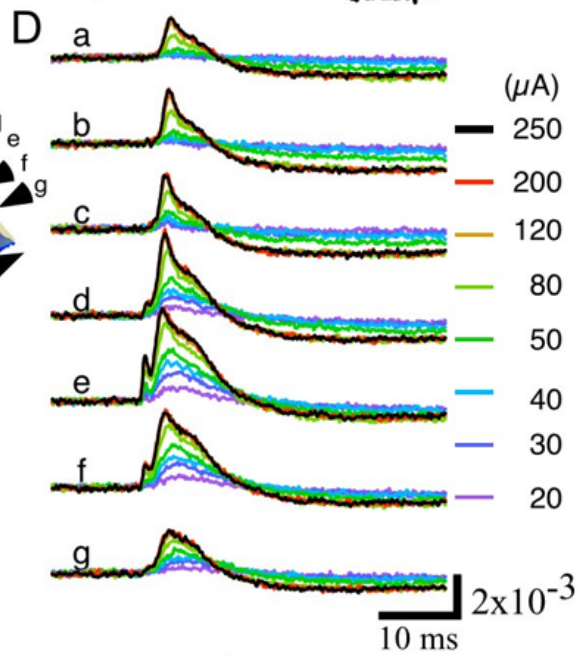
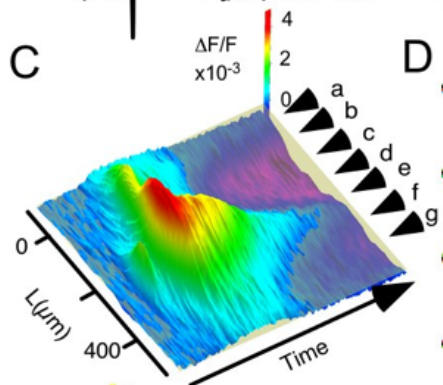
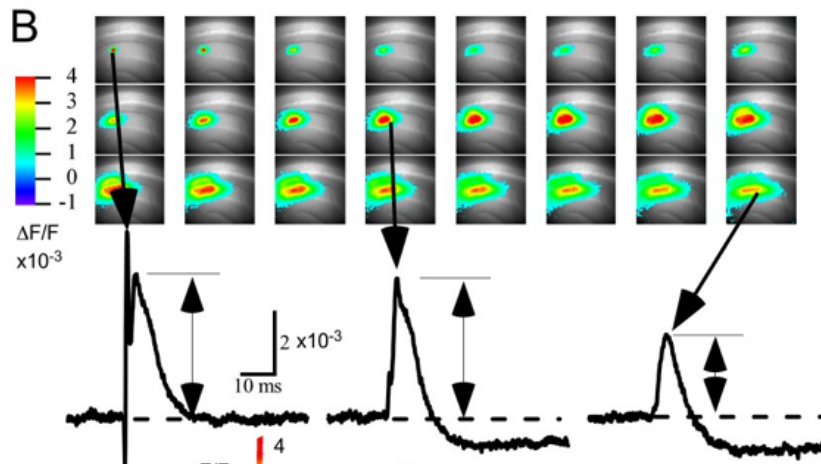
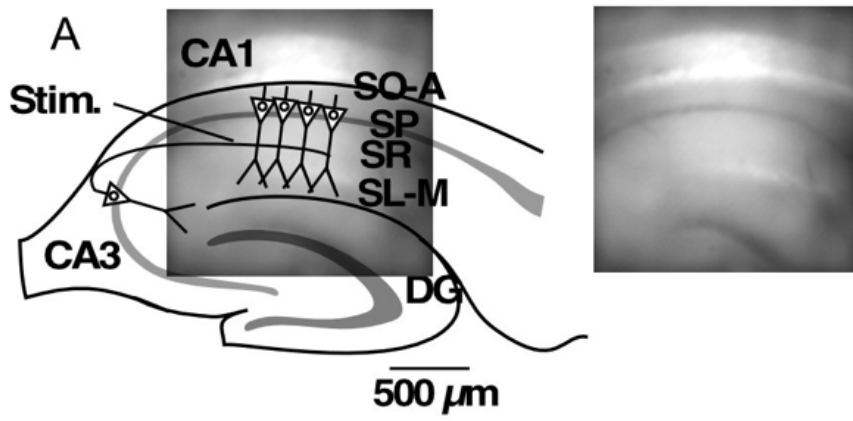


Fig. 2-1. ラット海馬スライス標本の CA1 領域におけるシャフター側枝での光信号の振幅分布。(A) 記録領域の蛍光画像にラット海馬スライスの模式図を重ねた。画像システムのサンプル領域は約 1.8 mm × 1.8 mm。Stim., 刺激電極; SO-A, 上層層-白板; SP, 錐体細胞層; SR, 放射状層; SLM, 網状分子層; DG: 海馬歯状回 (B) 刺激から開始して、0.2 ms ごとに取得した光信号を示す連続画像。1 行目の左から右へ向かって、時間経過が進み、続いて 2 行目の左から右へ、さらに 3 行目の左から右へと時間経過が進んでいる。下のトレースは、視野内のピクセルで得られた代表的なトレースである。(C) 刺激電極から約 90 μm 離れた位置で (B) のデータを錐体細胞の軸に沿ってスリット状に切り出し、信号の時間変化を 3D で表した。(D) パネル C に示した a~g から記録した光信号の代表的なトレース。a~g の色別トレースは、異なる刺激強度 (20, 30, 40, 50, 80, 120, 200, 250 μA) に対応している。(E) 各ピクセルでの最大応答の投影の擬似カラー画像。(F) C (太いトレース) および刺激電極からの距離が遠くなった時 (90, 180, 360, 540 μm) の錐体細胞の軸に沿ったスリットでのスライス画像の最大応答プロファイル。(G) 異なる刺激強度に対する刺激電極から 90 μm での応答プロファイル。色は、パネル D に示されている応答に対応。(H) SR (○、細胞体から 200 μm) および SP (●) から記録された刺激と反応の関係 ($n = 6$, エラーバーは SEM)。データは、10 kHz フレームレートで取得した (MicamUltima, ブレインビジョン社)。(Y Tominaga et al., *Neurosci Res.*, 2009)

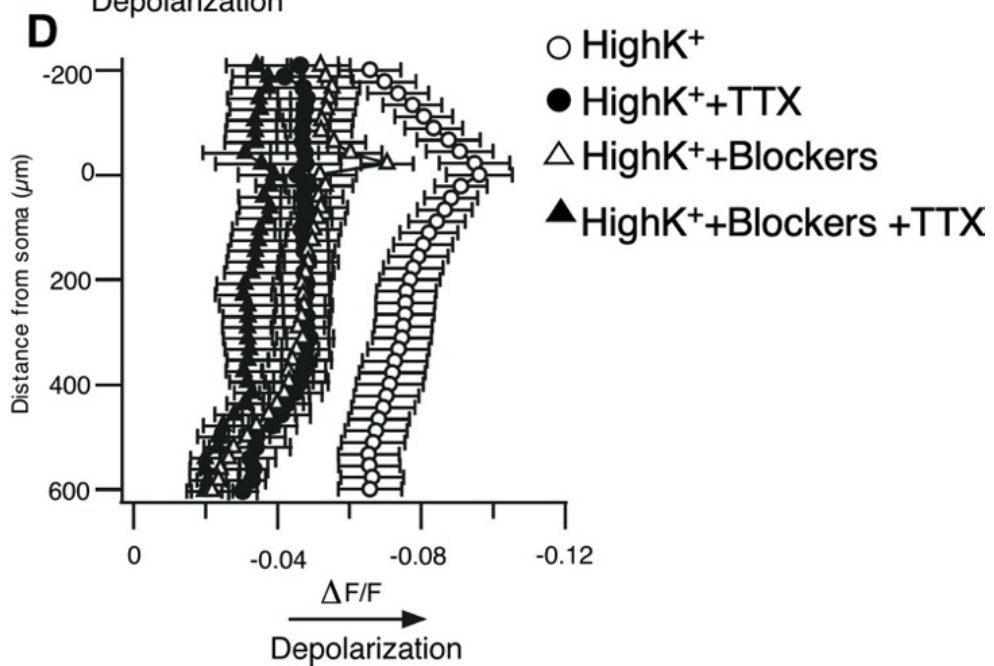
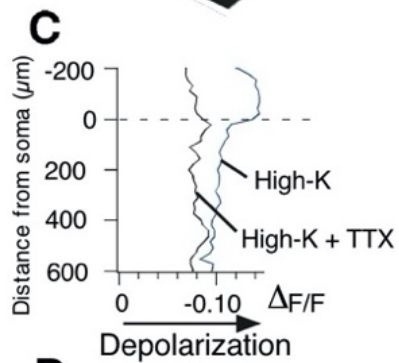
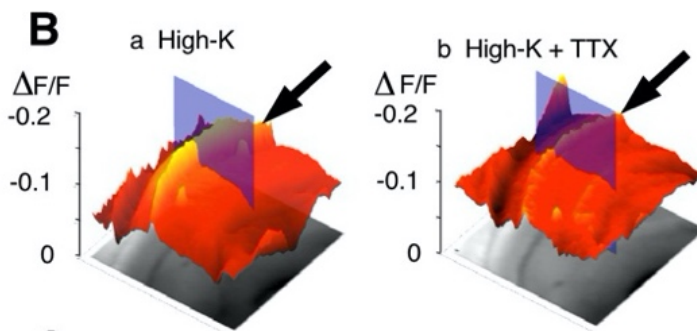
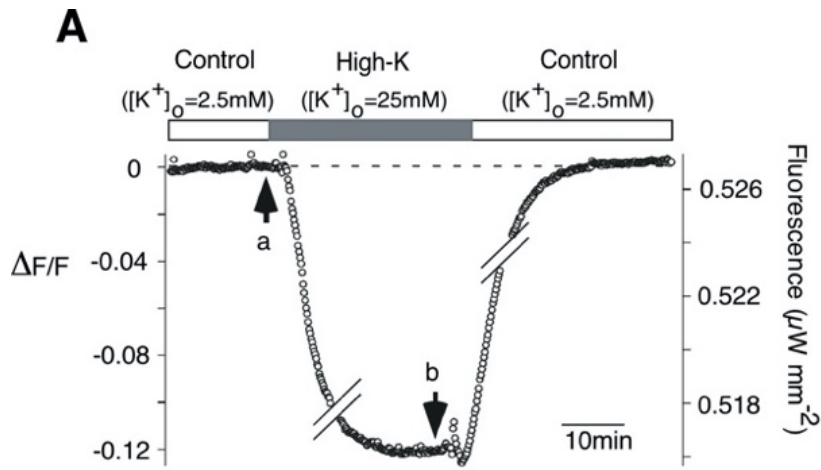


Fig. 2-2. CA1 領域の SR の中央で測定された VSD 蛍光の変化。 (A) 相対蛍光強度 ($\Delta F/F$) を測定し、時間に対してプロットした。各点は、1 ms/フレームのレートで 10 秒間隔で取得した 85 フレームの蛍光画像の平均。計測開始時は通常の ACSF ($[K^+]_o = 2.5$ mM) を還流し、その後、高濃度 K^+ (High- K^+) の ACSF 溶液 ($[K^+]_o = 25$ mM) を 30 分間還流した。絶対蛍光強度を右軸に示す。 a および b の矢印は、B の画像に使用した代表的なフレームを示す。 (B) 高濃度 K^+ 溶液による刺激に応答した蛍光変化の分布に対する TTX の影響。 TTX の非存在下 (a) および存在下 (b) での高濃度 K^+ 溶液に対する応答の振幅を示す 3 次元グラフ。 TTX は応答の振幅を減少させた (蛍光が減少した)。特に、矢印で示した SP/SO 層に対応する部位の応答において、(a) では黄色い擬似カラーで表されるように応答振幅が大きかったが、(b) ではその応答がほとんど消失した。 (C) TTX の非存在下 (High- K^+) および存在下 (High- K^+ + TTX) での錐体細胞の体細胞樹状軸に沿った蛍光変化のプロファイル。 (D) High- K^+ (○) および High- K^+ + TTX (●) 条件下での蛍光変化データ。さらに High- K^+ 溶液に APV、CNQX、ビククリンを加えた時の TTX 非存在下 (Δ) と TTX 存在下 (\blacktriangle) のデータも示した。データは平均 \pm SEM (n = 4-9 スライス)。(Y Tominaga et al., *Neurosci Res.*, 2009)

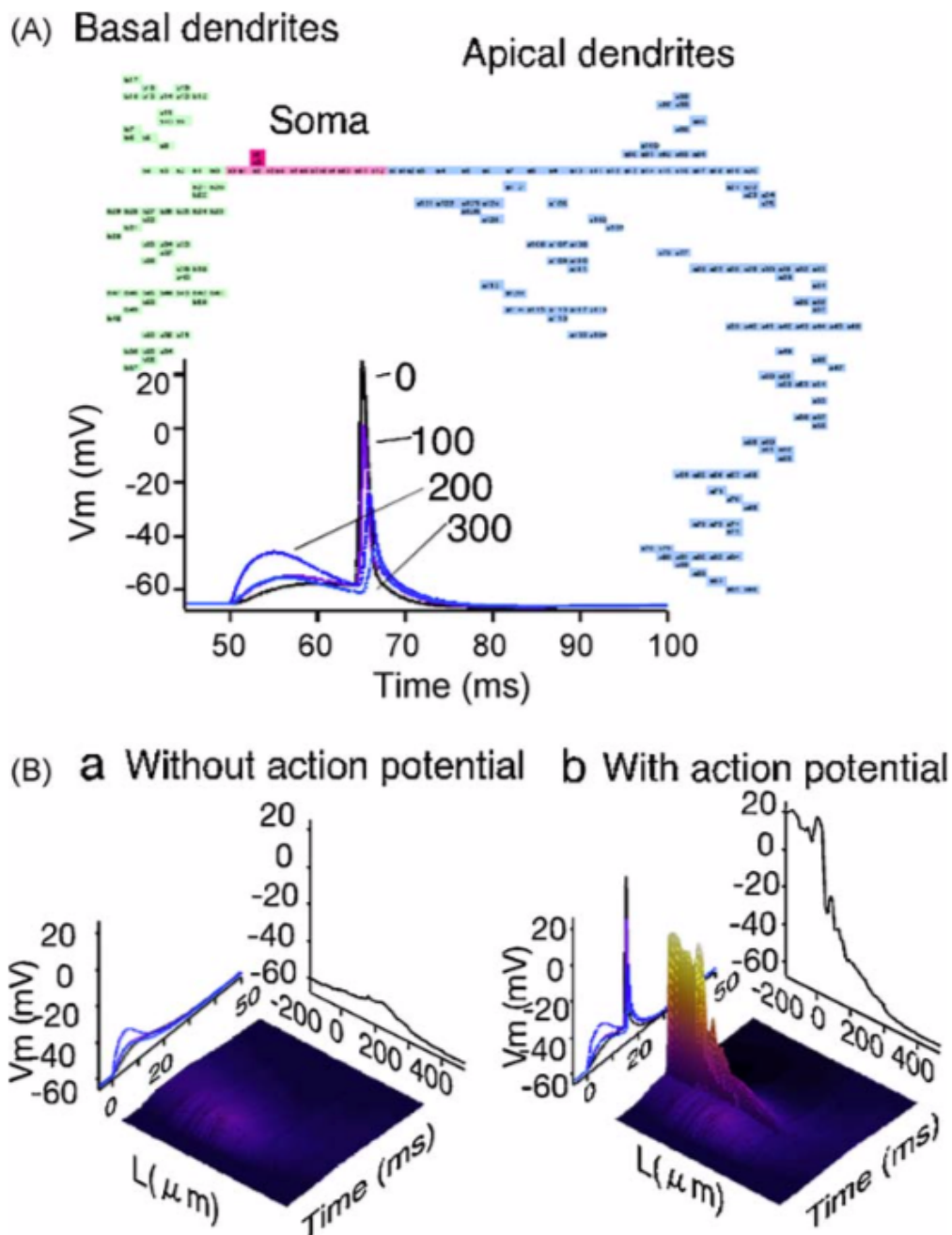


Fig. 2-3. (A) 海馬 CA1 錐体細胞の現実的なマルチコンパートメントモデル。各セグメントごとに電気生理学的特性が割り当てられている (Migliore, 2003)。グラフは、細胞体から異なる距離に位置する異なるセグメントの膜電位応答を示す。膜電位応答は、NEURON シミュレータプログラム(Hines and Carnevale, 1997)を使用してモデルから計算した。(B) CA1 錐体細胞の細胞体樹状突起軸に沿った膜電位変化の代表的なプロファイルの時間経過。細胞体で活動電位を生じさせない弱いシナプス入力 (a) と細胞体で活動電位を引き起こす入力 (b) があつた時の計算結果の 3D グラフ。これらのプロファイルは、ニューロンモデルの各コンパートメントから測定された膜電位応答を平均することによって計算した。各 3D グラフには、膜電位の時間変化 (左) とピーク膜電位プロファイル (右) を示す線形プロットも示した。(Y Tominaga et al., *Neurosci Res.*, 2009)

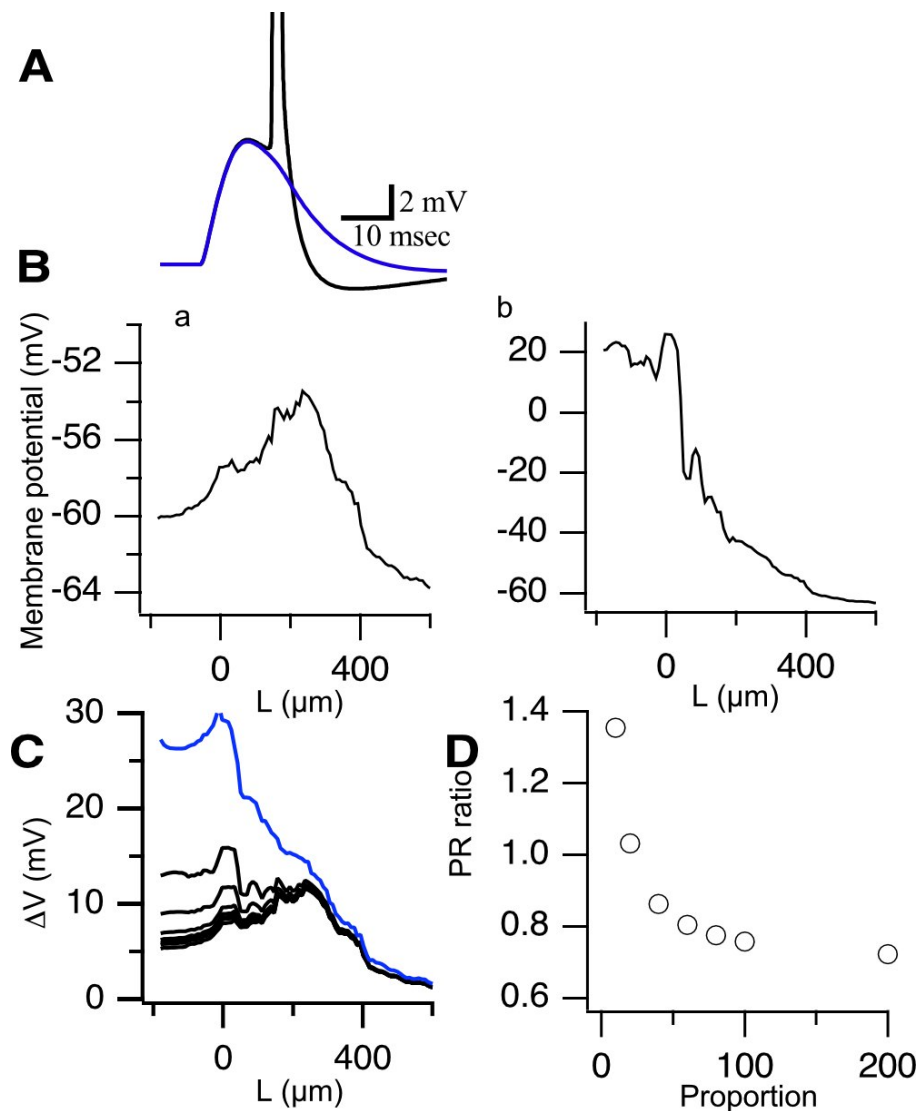


Fig. 2-4. シミュレートで得られたシナプス入力に対する膜電位応答のプロファイル。(A) NEURON を使用してシミュレートした、細胞体での膜電位の変化を表すトレース。黒いトレースは、閾値をわずかに超えたシナプス入力に対する応答を、青いトレースは、閾値をわずかに下回る入力に対する応答を示す。(B) 閾値以下の入力 (a) および閾値以上の入力 (b) を受け取ったときの錐体細胞モデルの細胞体樹状突起軸に沿った膜電位プロファイル。(C) 黒いトレースは、発火細胞と非発火細胞、すなわち、活動電位を発火させるニューロン (Bb) と活動電位を発火させないニューロン (Ba) を異なる比率で含んだ場合の錐体細胞モデル集合の平均膜電位プロファイルを示した (1 : 10, 1 : 20, 1 : 40, 1 : 60, 1 : 80, 1 : 100, 1 : 200)。青色のトレースは、活動電位発火が 16 ミリ秒の範囲内でランダムに発火を示す場合の膜電位プロファイルである。(D) 発火した細胞と発火しなかった細胞の割合を変化させた時の PR 比 (SP ($L = 0 \mu\text{m}$) と SR ($L = 250 \mu\text{m}$) の膜電位応答の比)。発火した神経細胞の割合を減らしていくと光計測で得られた膜電位プロファイルに似た形を示した。(Y Tominaga et al., *Neurosci Res.*, 2009)

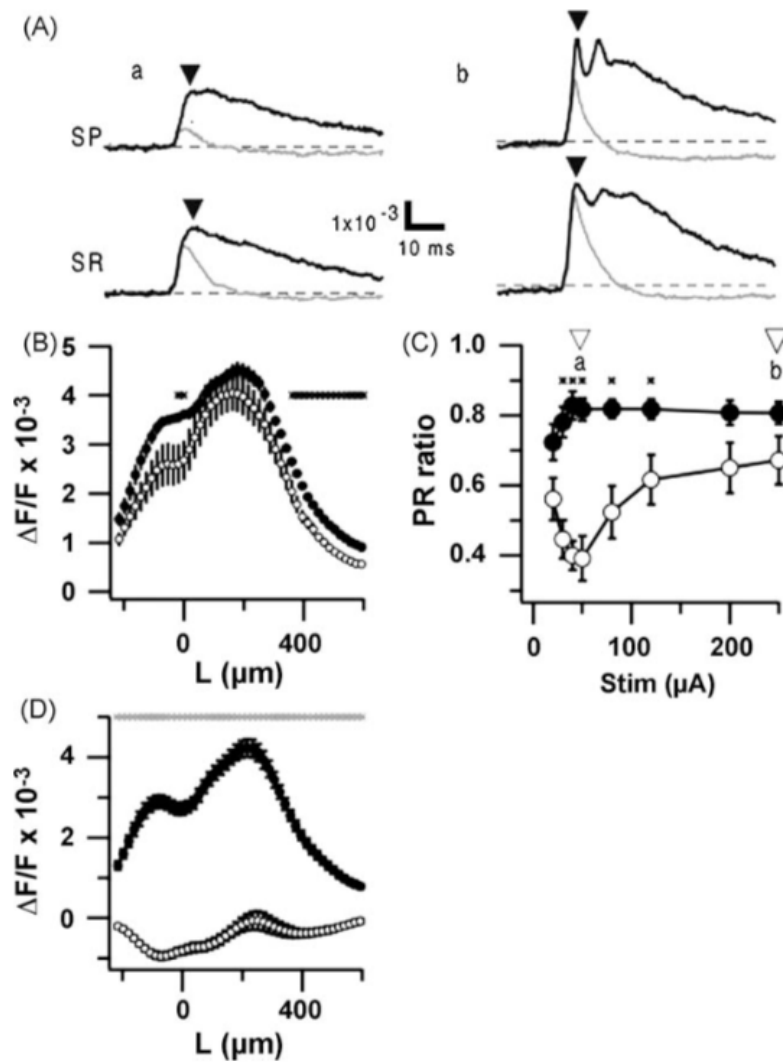


Fig. 2-5. (A) ACSF を還流した海馬 CA1 スライス標本と、ACSF に PITX を加えた時の標本で記録された光信号の時間経過。弱い刺激に対する応答 (50 μA) (a) と強い刺激に対する応答 (250 μA) (b) を示す。ACSF 還流下 (灰色のトレース) と PITX 存在下 (黒いトレース)。SP: 錐体細胞層 (SP) に対応するピクセルで取得されたトレース。SR: 放射状層 (SR) の中央のピクセルで得られたトレース。(B) 光計測データから得られた膜電位プロファイル。刺激部位から 90 μm 離れた位置での細胞体樹状突起軸に沿った信号をプロットした。○: ACSF (コントロール); ●: ACSF + 100 μM PITX (C) 刺激強度の関数としての光信号の PR ratio の変化 (n=6 スライス, error bar = SEM)。○: ACSF (コントロール); ●: ACSF + 100 μM PITX。矢印 (a および b) は、A のトレースに対応する刺激強度を示す。(D) SR 刺激後 25~30 ms の膜電位プロファイル。○: ACSF (コントロール); ●: ACSF + 100 μM PITX。トレース上の* (B, C, D) は、コントロールプロファイルと PITX 存在下での有意差を示す (ANOVA, $P < 0.05$)。 (Y Tominaga et al., *Neurosci Res.*, 2009)

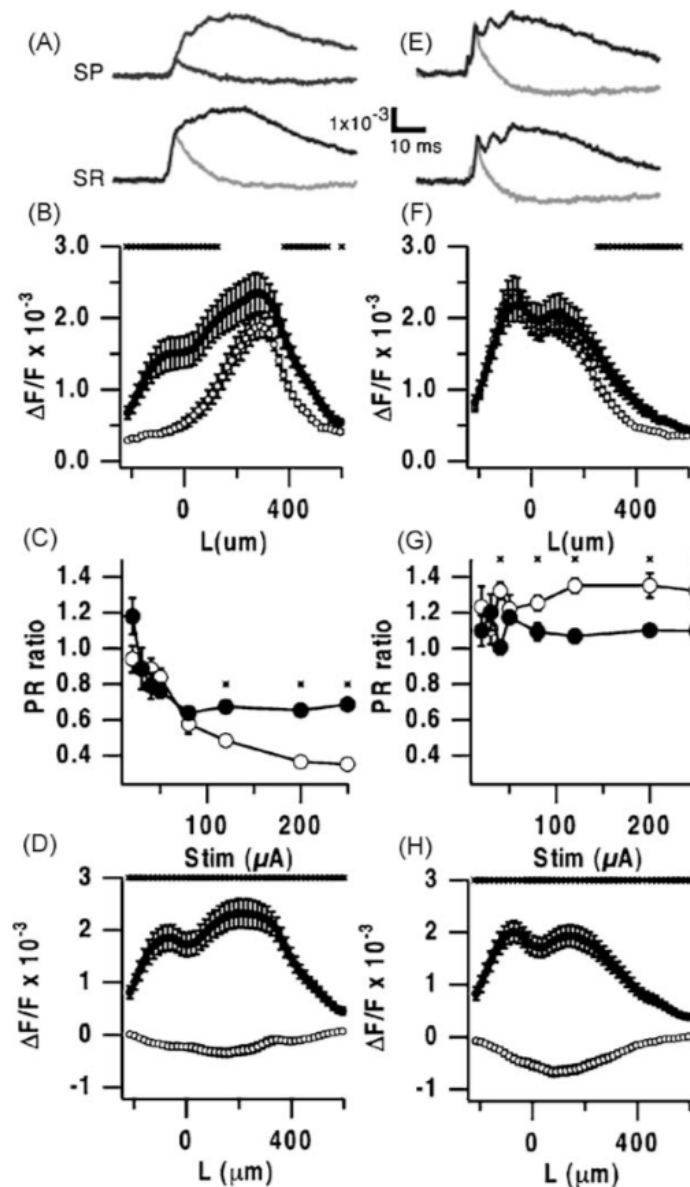


Fig. 2-6. (A, E) SLM 刺激時 (A) および SO 刺激時 (E) の海馬 CA1 スライス標本における光信号の時間経過。ACSF 還流下 (灰色のトレース) と PITX 存在下 (黒いトレース)。SP: SP に対応するピクセルで取得されたトレース。SR: SR の中央のピクセルで得られたトレース。(B, F) SLM 刺激 (B) および SO 刺激 (F) 時の光計測データから得られた膜電位プロファイル。刺激部位から 90 μm 離れた位置での細胞体樹状突起軸に沿った信号をプロットした。○は ACSF 還流時(コントロール); ●は ACSF + 100 μM PITX。(C, G) 刺激強度の関数としての SLM 刺激 (C) および SO 刺激 (G) 後の PR ratio の変化 (n = 7 スライス、error bar = SEM)。○: ACSF (コントロール); ●: ACSF + 100 μM PITX。(D, H) SLM 刺激 (D) および SO 刺激 (H) 後 25~30 ms の膜電位プロファイル。○: ACSF (コントロール); ●: ACSF + 100 μM PITX。これらのプロファイルは、光計測データから取得した。トレースの* (B, C, D, F, G, H) は、コントロールと P PITX 存在下での有意差を示す (ANOVA、 $P < 0.05$)。 (Y Tominaga et al., *Neurosci Res.*, 2009)

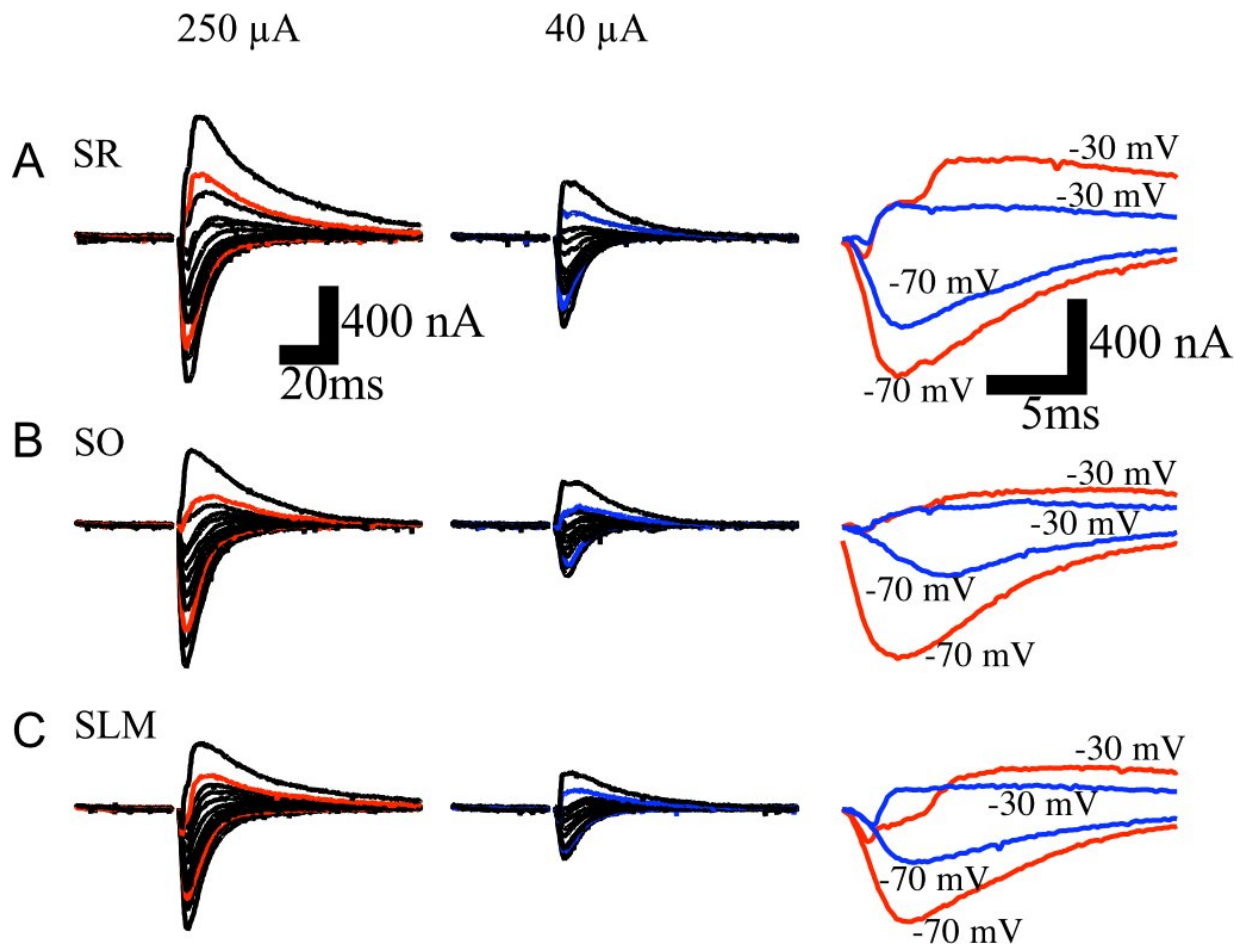


Fig. 2-7. 2つの異なる刺激強度 (250 μ A;左列) および (40 μ A;中央) でのSR刺激 (A)、SO刺激 (B) およびSLM刺激 (C) に応答した錐体細胞からのボルテージクランプ記録。-80, -75, -70, -65, -60, -55, -50, -45, -40, -35, -30 および-20 mVの異なる保持電位で計測した。一番右の列の拡大したトレースは、強い刺激 (250 μ A;赤) と弱い刺激 (40 μ A;青) での脱分極状態 (-30 mV) および静止膜電位 (-70 mV) 付近の電流応答を示す。刺激した錐体細胞から約90 μ mの錐体細胞をホールセルクランプ条件で計測した。スケールバー横軸はそれぞれ20 ms, 5ms。(Y Tominaga et al., *Neurosci Res.*, 2009)

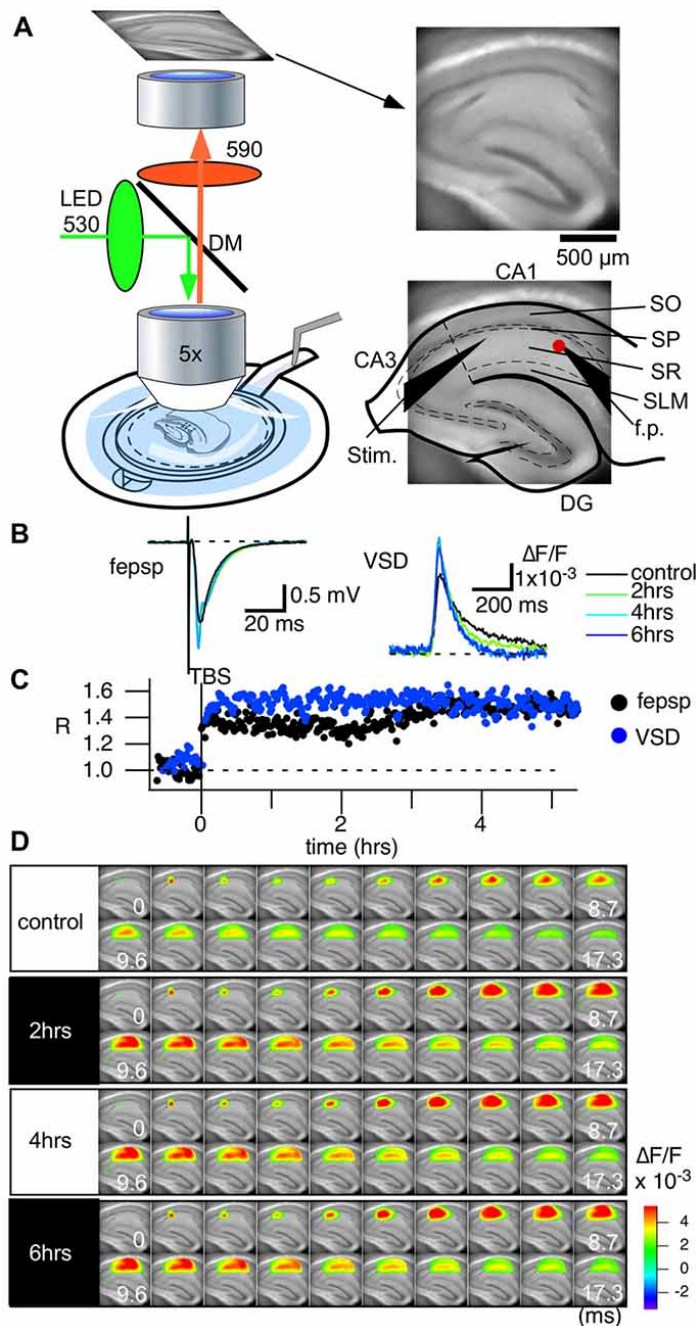


Fig. 3-1. 電圧感受性色素 (VSD) 光計測で、シータバースト刺激 (TBS) によって引き起こされる海馬スライスの長期的な回路活動の変化。(A) 光計測システムの模式図。電極の構成 (Stim.: 刺激電極、f.p.: フィールドポテンシャル記録電極)。略語 SO: stratum oriens-alveus, SP: stratum pyramidale, SR: stratum radiatum, SLM: stratum lacunosum-moleculare (B) TBS 誘発長期増強 (LTP) 時のフィールド電極で記録されたフィールド興奮性シナプス後電位 (fEPSP) のトレースと、電極の先端に対応するピクセルでの光信号のトレース。(C) フィールド電極での記録 (fEPSP 勾配 (黒)) と電極の先端に対応するピクセルでの光信号 (青) をプロットした LTP 後の時間経過のトレース。(D) コントロール、2 時間、4 時間、6 時間後の光計測で得られた画像を表示した。フレームレートは 0.1 ms / frame、60 秒ごとに光信号を記録した。(Y Tominaga, et al., *Front. Cell. Neurosci.*, 2018)

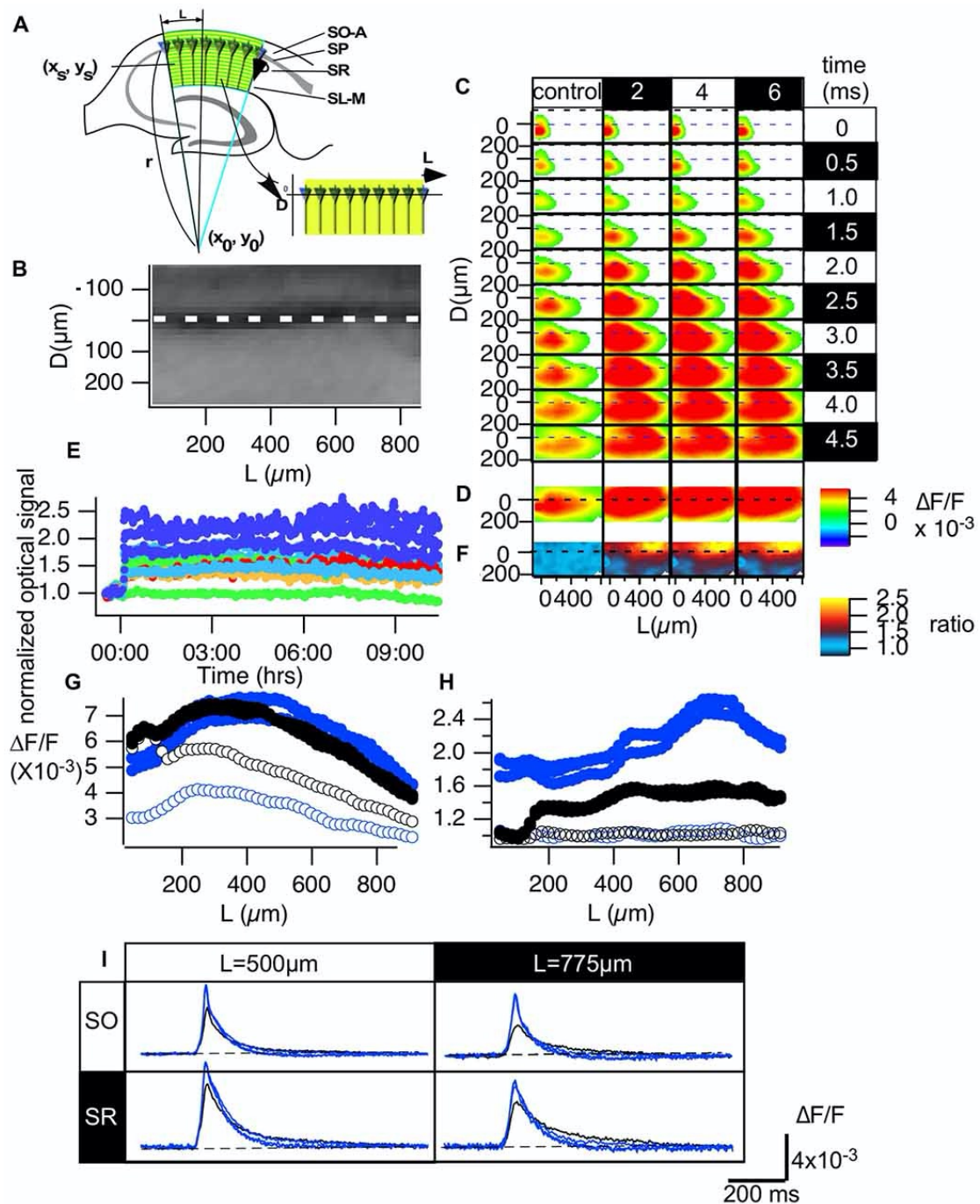


Fig. 3-2. 正規化による海馬スライスのCA1領域の光信号の評価。(A) 海馬CA1領域をCA1の始点からの距離(L)と細胞層(D)平面からの距離(B)に変換した図。(C) 制御記録およびTBSから2、4、6時間に行われた記録の各時間フレームでD-L平面に変換されたCA1エリアに沿って広がる光信号の代表的な伝搬パターン。(D) D-L平面内の各ピクセルのピーク値。(E) 10時間のD-L平面のピクセルにおける正規化された光信号の時間経過。(F) 各時点でD-L平面にマッピングされたLTPの正規化された次数の振幅。(G) 各時点でのD = -75 μm (SO, 青) およびD = 150 μm (SR, 黒) のラインに沿った光信号のラインプロファイル (コントロール, 2, 4, 6時間)。(H) 同じラインに沿ったLTP誘発率のラインプロファイル。(I) 各時点でのSO (D = -75 μm) およびSR (D = 150 μm) の各ラインの代表点 (それぞれL = 500 および775 μm) での光信号の時間経過。(Y Tominaga, et al., *Front. Cell. Neurosci.*, 2018)

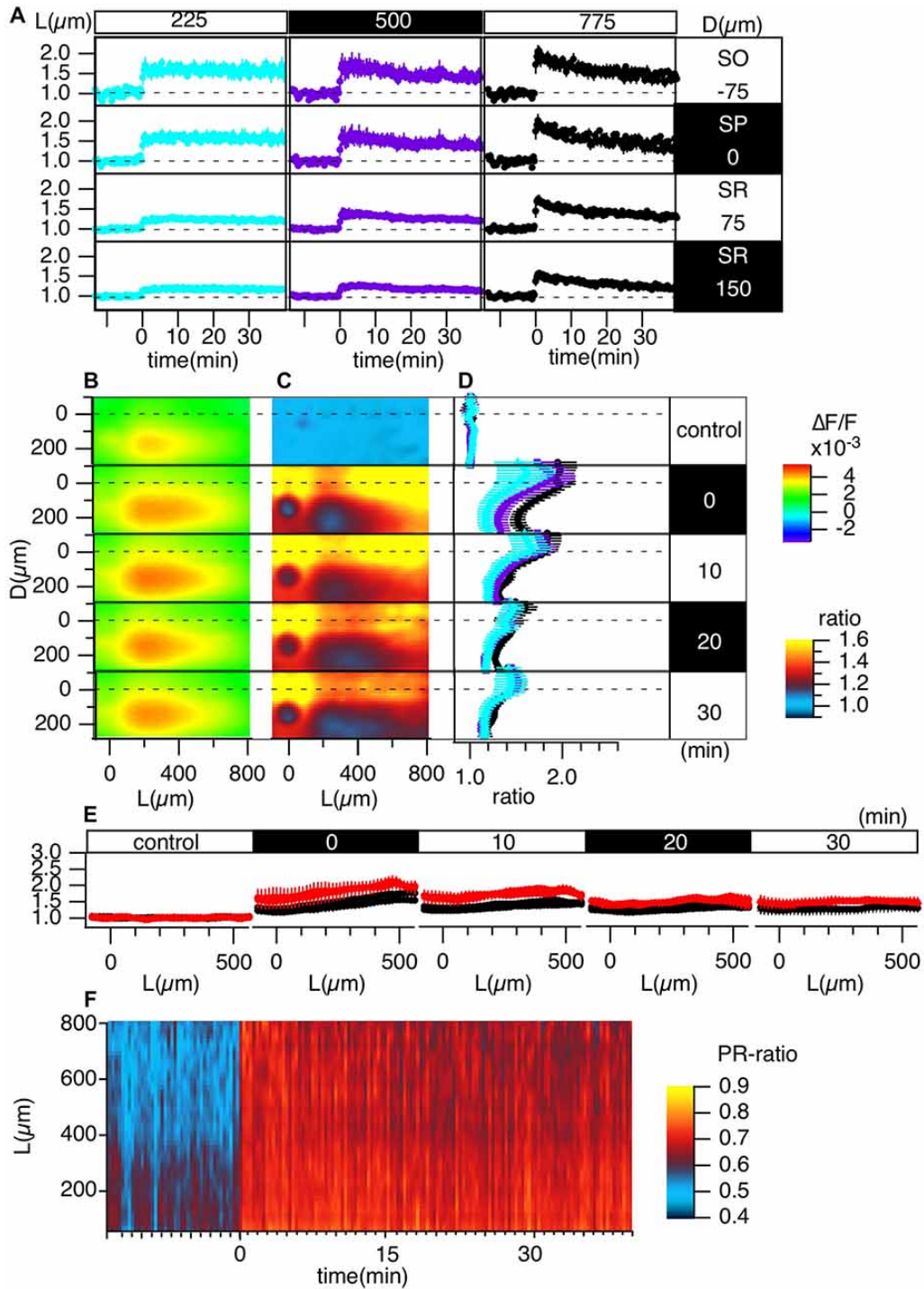


Fig. 3-3. TBS 誘発 LTP の分析。 (A) 3つの異なる L 位置 [L = 225 (シアン), 500 (紫), 775 (黒) μm] および 4つの異なる D 位置 (D = -75, 0, 75, 150 μm)。 (B) D-L 座標にマッピングされたピーク値。 (C) D-L 座標の LTP 比。 (D) 各時点での異なる L 位置 [225 (シアン), 500 (紫), 775 (黒) μm] での C のラインプロファイル。 (E) コントロールの記録と TBS 入力後、0, 10, 20, および 30 分の L 軸に沿ったラインプロファイル (F) SO (D = -75) 対 SR (D = 150)、PRratio でのラインプロファイルの比率の L 軸に沿った時間変化。 N = 4, n = 12, (A, D, E) のバーは SEM を示す。 (Y Tominaga, et al., *Front. Cell. Neurosci.*, 2018)

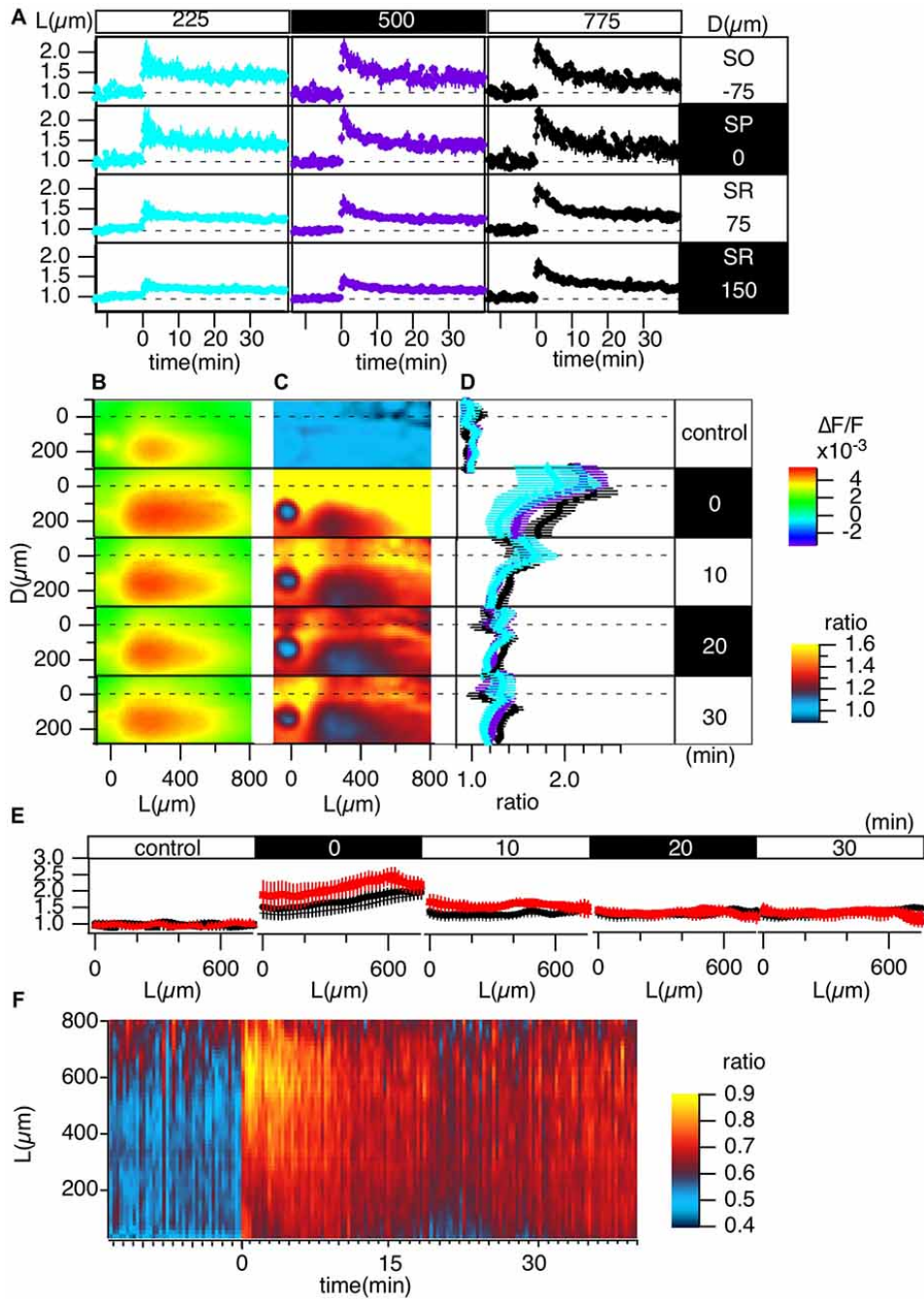


Fig. 3-4. 高周波刺激 (HFS) 誘発 LTP の分析。 LTP 誘導プロトコルは 100 Hz で 100 パルス (HFS) 入力している。(A) 3 つの異なる L 位置 [L = 225 (シアン), 500 (紫), 775 (黒) μm] および 4 つの異なる D 位置の代表点での光信号の正規化したピーク振幅の時間変化 (D = -75, 0, 75, 150 μm)。 (B) D-L 座標にマッピングされたピーク値。(C) D-L 座標の LTP 比。(D) 各時点での異なる L 位置 [225 (シアン), 500 (紫), 775 (黒) μm] での C のラインプロファイル。(E) コントロールおよび TBS から 0 分、10 分、20 分、30 分の L 軸に沿ったラインプロファイル。(F) SO (D = -75 μm) 対 SR (D = 150 μm) 比。L 軸に沿った PR ratio でのラインプロファイルの比率の時間変化。 N = 2, n = 7, (A, D, E) のバーは SEM を示す。(Y Tominaga, et al., *Front. Cell. Neurosci.*, 2018)

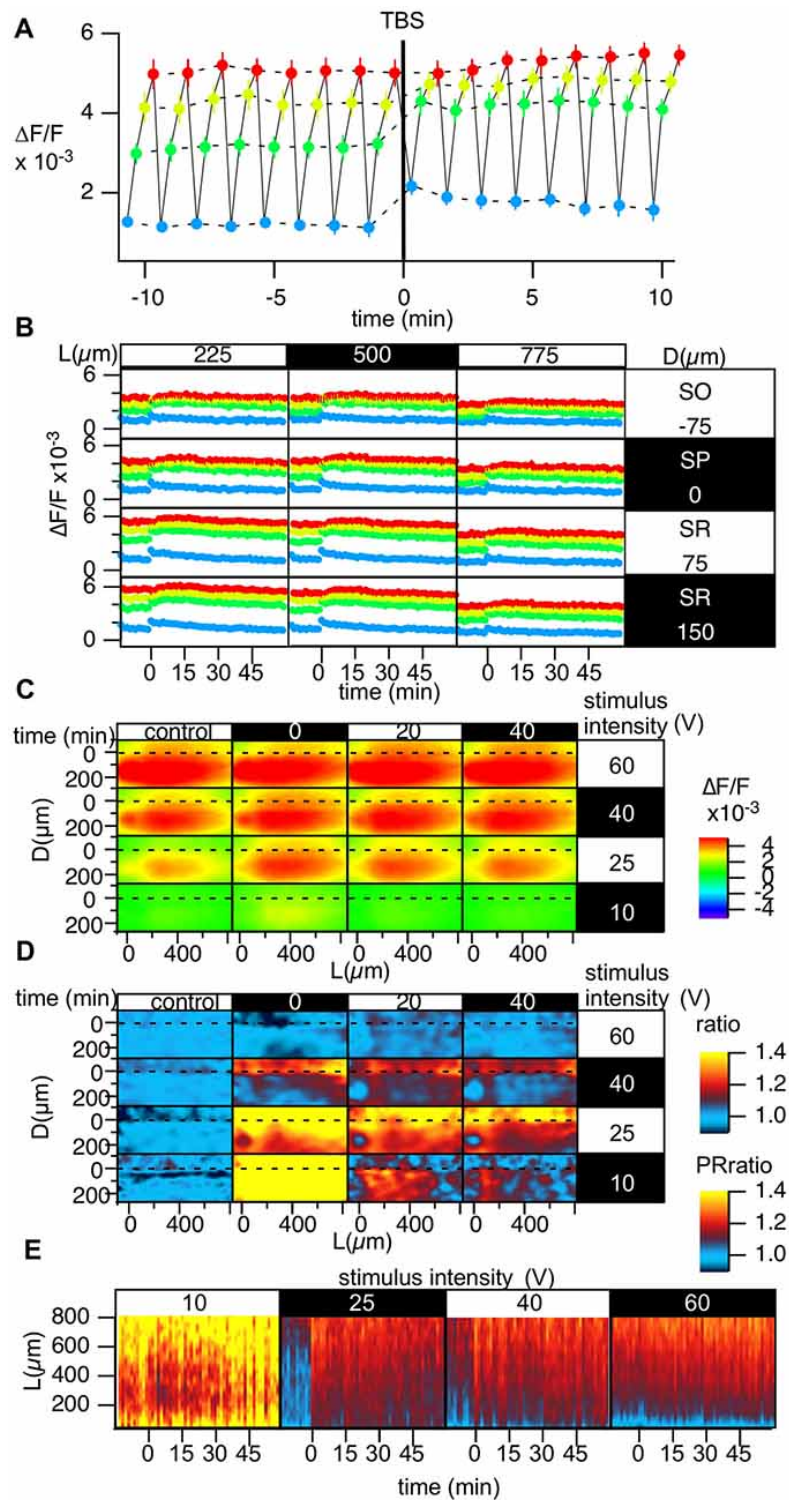


Fig. 3-5. TBS によって引き起こされた刺激反応関係の変化。(A) 代表点での LTP の誘導を含む時間経過の記録。(B) 刺激強度を変化させながら、D-L 座標の代表点での光信号の時間経過。刺激強度 [10 (青), 25 (緑), 40 (黄色), および 60 V (赤)] に対応。(C) 異なる刺激強度と異なる時間で D-L 座標に投射された光信号のピーク値。(D) 刺激強度に対応する D-L 座標平面の LTP の割合。(E) 各刺激強度に対する PRRatio の時間変化。N=2, n=10, (A, B) のバーは SEM を示す。(Y Tominaga, et al., *Front. Cell. Neurosci.*, 2018)

付録資料

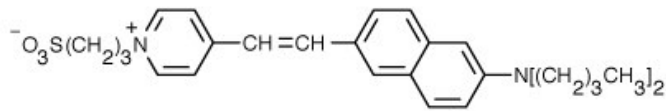
【付録 1 Di-4-ANEPPS】

Di-4-ANEPPS の化学構造を以下に示す。

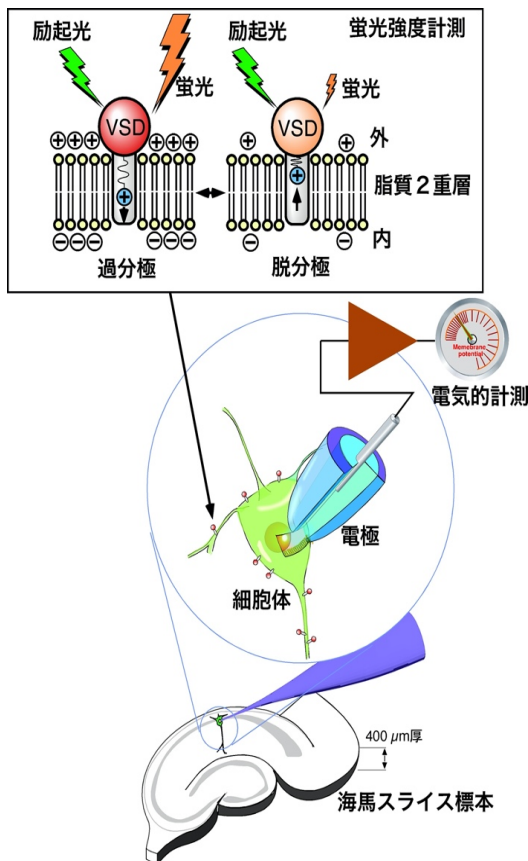
分子式：C₂₈H₃₆N₂O₃S、 分子量：480.66

CAS 番号: Pyridinium, 4-(2-(6-(dibutylamino)-2-naphthalenyl)ethenyl)-1-(3-sulfopropyl)-, hydroxide, inner salt 90134-00-2

A



B



付録 Fig. 1 脳海馬スライス標本における VSD による計測の概念図。A. VSD 構造式。B. VSD のはたらき方を示す模式図。VSD の蛍光は膜内の電界強度に依存して変化する(Tominaga and Tominaga, 生物物理 2011)。

【付録 2 電気生理学的記録】

単極刺激電極およびフィールド電位記録用の記録電極としてガラス微小電極（開口径 5 μm , 電極内液: ACSF, 電気抵抗約 1 $\text{M}\Omega$ ）を用いた。細胞内電位記録には、4 M 酢酸カリウムを電極内液とした先端の細いガラス微小電極（電気抵抗約 100 $\text{M}\Omega$ ）を使用した。これらのガラス電極は主に Flaming–Brown ピペットプーラー（Sutter Instruments, Novato, CA）を用いて作成した。アンプには Axoclamp-2B、200B、700B アンプ（Axon Instruments, Foster City, CA）または Model 3100(A-M systems, WA)を使用した。電気生理学的記録システムは、Igor Pro（WaveMetrics Inc., OR）で開発したマクロプログラムで制御した。プログラムの一部は PULSE XOPS（Herrington et al., 1995）を使用して開発している。

ほとんどの実験において、シャプアー側枝に 0.017 - 0.05 Hz で刺激を与え、常にフィールド電位を記録した。IgorPro 上で開発したマクロプログラムにより、ITC-18（Instrutech, Longmont, CO, USA）または ESTM-8（Brainvision Inc., Tokyo, Japan）を制御して刺激パターンを入力した。刺激装置は双方とも D/A, A/D コンバーターを内蔵している。ITC-18 は、線形アイソレーター (A395, WPI Inc., Sarasota, FL, USA; 0 – 250 μA , 正負方向に 200 μs) と組み合わせて使用した。ESTM-8 は線形アイソレーターを内蔵しており、プログラムで刺激パルス (0 - 60 V を正負方向に 300 μs) を生成するように制御した。

第 2 章におけるホールセルモードパッチクランプ記録用電極は P-97 Flaming–Brown ピペットプーラー（Sutter Instruments, Novato, CA）を使用してガラス微小電極（3～5 $\text{M}\Omega$ ）を作成した。電極内液は、130 mM Cs-MeSO₃, 10 mM Hepes, 4 mM MgCl₂, 4 mM NaATP, 0.4 mM NaGTP, 10 mM Na-Phosphocreatine, 10 mM EGTA, PH 7.2 に調整した。5 mM QX-314 を必要に応じて加えている。ホールセル記録は、ローパスフィルターを 3 kHz に設定し、10 kHz でデジタル化した。データはデジタイザー（ITC-18, Instrutech Inc., NY）でデジタル化し、独自に開発した IgorPro ソフトウェア（WaveMetrics Inc., OR, USA）でオフラインで分析した。電気刺激は、SO、SR、および SLM に配置したガラス電極で定電流刺激装置（A395、WPI）で加えた。正立顕微鏡（BX-51WI、オリン

パス東京、日本)に取り付けた CMOS カメラ (SKDCE-2EX、Sigma Koki Co., Tokyo) に対して、斜光照明によってコントラスト強調して、神経細胞を視覚化した。ボルテージクランプモードでは、電気刺激の前に常に試験膜電位ステップ (-10 mV) を実施し、直列抵抗 (R_s) が 20 M Ω より低いデータのみ採用した。

【付録 3 NEURON シミュレータ】

数値シミュレーションは、Macintosh コンピューター (Mac OSX) で NEURON (ver. 5.7) (Hines and Carnevale, 1997) を使用した。モデルとして CA1 錐体細胞の現実的な形態学的・電気生理学的な多区画モデルを採用した (Migliore et al., 1999; Migliore, 2003)。このモデルは、ニューロンの軸索、細胞体、樹状突起を表す 202 の区画で構成されている。アクティブコンダクタンス (g_{Na} 、 g_{KDR} 、 g_{KA} および g_h) の分布と動態の詳細、およびモデルに埋め込まれたコンポーネント、シナプス接続の受動的電気特性については、Neuron Model DB (<http://senselab.med.yale.edu/modeldb/ShowModel.asp?model=19696>) を参照のこと。各コンパートメントで膜電位応答をシミュレート・分析し、IgorPro ソフトウェア上で本研究用に開発したマクロプログラムを使用して膜電位プロファイルを計算し、描画した。

シミュレーションにあたって、2つの異なる膜電位プロファイルをもつ神経細胞モデルを用意した。どちらの神経細胞モデルもほぼ同じ振幅の EPSP を起こすが、一方は閾値をわずかに超えて活動電位を発生させ、もう一方は閾値にわずかに到達しないため活動電位を発生しない。この2つの異なる膜電位プロファイルを持つモデルを作成するために、モデルの重みを変更して神経細胞モデルの発火の閾値を求めた。それぞれの神経細胞モデル興奮時の時間経過は Fig.2-4A に示した。また、そのときの膜電位プロファイルを Fig.2-4Ba (閾値以下。ウエイト $1.231e^{-2}$) , Fig. 2-4Bb (閾値以上。ウエイト $1.24e^{-2}$) に示した。

細胞集団の膜電位プロファイル (Fig. 2-4C) は、細胞体からの距離 (L) と興奮した細胞に対する非興奮細胞の数の割合 (p) の関数としての膜電位の平均 ($V_{m,avg}$) として以下の式で計算した。

$$\frac{Vm_{avg}(L, p) = [(p - 1)Vm_{e\text{psp}}(L) + Vm_{AP}(L)]}{p} \quad (1)$$

ここで、 $Vm_{e\text{psp}}(L)$ と $Vm_{AP}(L)$ は、それぞれ Fig.2-4Ba (閾値以下) と Bb (閾値以上) で示した膜電位プロファイルに対応する膜電位である。

Fig. 2-4D の PR 比は、比率 (p) の関数として、SP ($L = 0 \text{ mm}$) の応答と SR ($L = 250 \text{ }\mu\text{m}$) の応答の比率として計算した。

$$\text{PR ratio}(p) = \frac{Vm_{avg}(0, p)}{Vm_{avg}(250, p)} \quad (2)$$

光信号の PR 比は $L = 0 \text{ }\mu\text{m}$ での光信号の振幅と $L = 250 \text{ }\mu\text{m}$ での光信号の振幅である。

【本論文に掲載の図について】

本論文の図はそれぞれ図、および付録図の説明に付記した論文からの転載であり、Elsevier 社(J. Neuroscience Method, Neuroscience Research)、Frontiers.org, Journal of Visual Experiments, 日本生物物理学会「生物物理」編集室の許可を得ている。

謝辞

本研究は、理化学研究所、徳島文理大学を通して、現在、神経科学研究所教授の 冨永貴志の指導の元に行ったものです。

今回、博士論文としてまとめるにあたり、お忙しい中、快く主査をお引き受けくださった香川薬学部薬物治療学講座教授の伊藤康一先生、紹介教員および副査をお引く受けくださった徳島文理大学香川薬学部分子生物学講座教授の宮澤宏先生、同じく副査をお引き受けくださった生命物理化学講座教授の岸本泰司先生にも心より深く御礼申し上げます。理化学研究所時代からお世話になっている東北大学大学院農学研究科動物生殖科学分野教授の種村健太郎先生には、遠方にも関わらず、快く副査をお引き受けくださり、深く感謝申し上げます。

本研究を進めるにあたり、徳島文理大学神経科学研究所で研究補助として共に働き、研究にご協力いただいた竹歳麻紀子さん、前田直子さん（現在、森永製菓株式会社研究所勤務）、谷口愛さん、1年半研究員として所属されていた Pooja Gusain さん、また研究室メンバーの皆様にも御礼申し上げます。

本研究は、理化学研究所脳科学総合研究センター脳型デバイス・ブレインウエイ研究グループ脳創成デバイスチームでテクニカルスタッフとして研究に携わったときに遡ります。光計測法の研究に迎え入れてくださり、ご指導くださった、当時のグループリーダー故松本元先生、チームリーダー市川道教先生（現在、ブレインビジョン株式会社代表取締役）、研究員 山田整先生（現在、トヨタ自動車株式会社 未来創成センター T-フロンティア部センター統括室 第2基盤研究グループ主幹）を始め、共に同じグループ・チームで研究を進め、あるいはサポートしてくださった皆様、またグループを越えて交流し、お世話になった皆様に感謝いたします。

博士論文着手にあたり、心を砕いてくださった産業技術総合研究所人間情報研究部門 高島一郎先生、明治大学理工学研究科准教授 梶原利一先生にも感謝申し上げます。

また、徳島文理大学の先生方、動物舎の皆様、事務の皆様にもいつも暖かくサポートいただきました。この場を借りて、御礼申し上げます。

私は筑波大学第二学群生物学類を卒業し、富士通株式会社で8年間勤務したのちに、米国ハワイ州立大学マノア校情報学科 SEAL 研究室（当時）にリサーチアシスタントとして約2年間所属させていただきました。大学・研究室における学究活動や会社での実務において、数多くの先生方、先輩後輩方、友人、上司や同僚の皆様、本当にたくさんの方々から教えていただき、育てていただきました。ここに感謝申し上げます。

MBL（ウッズホール海洋生物学研究所）での光計測研究会への参加を快く迎え入れてくださったイエール大学教授 Lawrence B. Cohen 先生、遺伝的にコード化された膜電位インジケーター（GEVI）の導入についてご教授くださった Imperial College London 教授の Thomas Knöpfel 先生、新規の Fast Intrinsic Optical Signal (FIOS)を用いた脳活動計測法の開発研究でお世話になった MBL Associate Scientist の谷 知己先生（現 国立研究開発法人産業技術総合研究所 生命工学領域 主任研究員）、谷 真紀先生（現 関西大学 国際共同研究担当）にも心より深く御礼申し上げます。

本研究で培ってきた技術をもとに、VSD を使用しない無染色スライス標本からの新規の光信号計測、『新規の Fast Intrinsic Optical Signal (FIOS)を用いた脳活動計測法の開発』研究を開始し、科学研究費補助金として2019年奨励研究に採択いただきました。ここに感謝申し上げ、今後、さらに研究を発展させていきたいと考えております。

個別にお名前をあげさせていただいておりませんが、共同研究、学会や会議等、その他いろいろな場面で、ご助言やご意見をくださった先生方、お世話になった数多くの皆様にも心から御礼申し上げます。

論文博士という高いハードルを乗り越えることに怖気付いていた私の背中を押して応援してくれた家族にも感謝します。夫であり、徳島文理大学神経科学研究所の教授でもある富永貴志には、研究上の指導やアドバイスをもらうだけでなく、家事分担など、家庭内でのサポートもしてもらいました。娘の富永結理果も、くじけそうになる私をいつも応援してくれました。ここに、感謝の意を表し、謝辞とさせていただきます。

参考文献

Aihara T, Kobayashi Y, Tsukada M (2005) Spatiotemporal visualization of long-term potentiation and depression in the hippocampal CA1 area. *Hippocampus* 15.

Alger B, Nicoll R (1982a) Pharmacological evidence for two kinds of GABA receptor on rat hippocampal pyramidal cells studied in vitro. *The Journal of physiology* 328:125–141.

Alger B, Nicoll R (1982b) Feed-forward dendritic inhibition in rat hippocampal pyramidal cells studied in vitro. *The Journal of physiology* 328:105–123.

Andersen P, Bliss T, Lomo T, Olsen L, Skrede K (1969b) Lamellar organization of hippocampal excitatory pathways. *Acta physiologica Scandinavica* 76:4A-5A.

Andersen P, Dingledine R, Gjerstad L, Langmoen I, Laursen A (1980) Two different responses of hippocampal pyramidal cells to application of gamma-amino butyric acid. *The Journal of physiology* 305:279–296.

Andersen P, Eccles J, Loynning Y (1963) Recurrent inhibition in the hippocampus with identification of the inhibitory cell and its synapses. *Nature* 198:540–542.

Andersen P, Eccles J, Loynning Y (1964) Pathway of postsynaptic inhibition in the hippocampus. *Journal of neurophysiology* 27:608–619.

Andersen P, Gross GN, Lomo T, Sveen O (1969a) Participation of inhibitory and excitatory interneurons in the control of hippocampal cortical output. *Ucla Forum Medical Science* 11: 415–65

Antic S (2003) Action potentials in basal and oblique dendrites of rat neocortical pyramidal neurons. *The Journal of Physiology* 550:35–50.

Antic S, Zecevic D (1995) Optical signals from neurons with internally applied voltage-sensitive dyes. *The Journal of Neuroscience* 15:1392-405.

Anticevic A, Murray JD (2017) Rebalancing Altered Computations: Considering the Role of Neural Excitation and Inhibition Balance Across the Psychiatric Spectrum. *Biological Psychiatry* 81:816–817.

Balestrino M, Somjen G (1986) Chlorpromazine protects brain tissue in hypoxia by delaying spreading depression-mediated calcium influx. *Brain Research* 385:219–226.

Barish ME, Ichikawa M, Tominaga T, Matsumoto G, Iijima T (1996) Enhanced Fast Synaptic Transmission and a Delayed Depolarization Induced by Transient Potassium Current Blockade in Rat Hippocampal Slice as Studied by Optical Recording. *The Journal of Neuroscience* 16:5672–5687.

Bliss T, Collingridge G (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361:31–39.

Bliss T, Gardner-Medwin A (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of Physiology* 232:357–374.

Bonhoeffer T, Staiger V, Aertsen A (1989) Synaptic plasticity in rat hippocampal slice cultures: local “Hebbian” conjunction of pre- and postsynaptic stimulation leads to distributed synaptic enhancement. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86:8113–8117.

Brown T, Johnston D (1983) Voltage-clamp analysis of mossy fiber synaptic input to hippocampal neurons. *Journal of Neurophysiology* 50:487–507.

Busche M, Konnerth A (2016) Impairments of neural circuit function in Alzheimer's disease. *Philosophical Transactions Royal Soc Lond Ser B Biological Sci* 371:20150429.

Buskila Y, Breen PP, Tapson J, van Schaik A, Barton M, Morley JW (2015) Extending the viability of acute brain slices. *Scientific Reports* 4:srep05309.

Buzsaki G (1984) Feed-forward inhibition in the hippocampal formation. *Progress in neurobiology* 22:131–153.

Canitano R, Pallagrosi M (2017) Autism Spectrum Disorders and Schizophrenia Spectrum Disorders: Excitation/Inhibition Imbalance and Developmental Trajectories. *Frontiers in Psychiatry* 8:69.

Chang PY, Jackson MB (2006) Heterogeneous spatial patterns of long-term potentiation in rat hippocampal slices. *The Journal of Physiology* 576:427–443.

Cohen L, Hille B, Keynes R (1970) Changes in axon birefringence during the action potential. *The Journal of Physiology* 211:495–515.

Cohen L, Keynes R, Hille B (1968) Light Scattering and Birefringence Changes during Nerve Activity. *Nature* 218:438–441.

Cohen L, Leshner S (1986) Optical monitoring of membrane potential: methods of multisite optical measurement. In: DeWeer P, Salzberg BM, editors. *Optical Methods in Cell Physiology*,

vol. 40. pp 71–99. New York: Wiley.

Cohen L, Izberg B, Grinvald A (1978) Optical Methods for Monitoring Neuron Activity. *Annual Reviews of Neurosci* 1:171–182.

Connor SA, Ammendrup-Johnsen I, Chan AW, Kishimoto Y, Murayama C, Kurihara N, Tada A, Ge Y, Lu H, Yan R, LeDue JM, Matsumoto H, Kiyonari H, Kirino Y, Matsuzaki F, Suzuki T, Murphy TH, Wang Y, Yamamoto T, Craig A (2016) Altered Cortical Dynamics and Cognitive Function upon Haploinsufficiency of the Autism-Linked Excitatory Synaptic Suppressor MDGA2. *Neuron* 91: 1052–1068.

Curtis DM, Takashima I, Iijima T (1999) Optical recording of cortical activity after in vitro perfusion of cerebral arteries with a voltage-sensitive dye. *Brain Research* 837:314–319.

Davie J, Kole M, Letzkus J, Rancz E, Spruston N, Stuart G, Häusser M (2006) Dendritic patch-clamp recording. *Nature protocols* 1:1235–1247.

Davila, H. V., Salzberg, B. M., Cohen, L. B., and Waggoner, A. S. (1973). A large change in axon fluorescence that provides a promising method for measuring membrane potential. *Nat. New Biol.* 241, 159–160.

Demir R, Haberly L, Jackson M (1999) Sustained and accelerating activity at two discrete sites generate epileptiform discharges in slices of piriform cortex. *The Journal of Neuroscience* 19:1294–1306.

Dingledine R, Gjerstad L (1980) Reduced inhibition during epileptiform activity in the in vitro hippocampal slice. *The Journal of physiology* 305:297–313.

Dingledine R, Langmoen I (1980) Conductance changes and inhibitory actions of hippocampal recurrent IPSPs. *Brain research* 185:277–287.

Edelmann E, Cepeda-Prado E, Franck M, Lichtenecker P, Brigadski T, Leßmann V (2015) Theta Burst Firing Recruits BDNF Release and Signaling in Postsynaptic CA1 Neurons in Spike-Timing-Dependent LTP. *Neuron* 86:1041–1054.

Fluhler, E., Burnham, V. G., and Loew, L. M. (1985) Spectra, membrane binding, and potentiometric responses of new charge shift probes. *Biochemistry* 24:5749–5755.

Freund T, Buzsaki G (1996) Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6: 347-470

Glickfeld LL, Scanziani M (2006) Distinct timing in the activity of cannabinoid-sensitive and cannabinoid-insensitive basket cells. *Nature Neuroscience* 9:807–815.

Gogolla, N., Leblanc, J. J., Quast, K. B., Südhof, T. C., Fagiolini, M., and Hensch, T. K. (2009). Common circuit defect of excitatory-inhibitory balance in mouse models of autism. *J. Neurodev. Disord.* 1:172–181.

Griffith W, Brown T, Johnston D (1986) Voltage-clamp analysis of synaptic inhibition during long-term potentiation in hippocampus. *Journal of Neurophysiology* 55:767–775.

Grinvald A, Cohen L, Leshner S, Boyle (1981) Simultaneous optical monitoring of activity of many neurons in invertebrate ganglia using a 124-element photodiode array. *Journal of Neurophysiology* 45:829–840.

Grinvald, A., Manker, A., and Segal, M. (1982). Visualization of the spread of electrical activity

in rat hippocampal slices by voltage-sensitive optical probes. *The Journal of Physiology*. 333: 269–291.

Grinvald A, Frostig R, Lieke E, Hildesheim R (1988) Optical imaging of neuronal activity. *Physiol Rev* 68:1285–1366.

Grinvald A, Hildesheim R (2004) VSDI: a new era in functional imaging of cortical dynamics. *Nature reviews Neuroscience* 5:874–885.

Haugland RP (1996) Probes for membrane potential. In: Haugland RP, editor. *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals.*, pp 585–594. Eugene, OR: Molecular probes, Inc.

Herrington J, Newton KR, Bookman R. (1995) Pulse Control V4.6: Igor Xops for Patch Clamp Data Acquisition and Capacitance Measurements. Miami, FL: University of Miami,.

Hill D, Keynes R (1949) Opacity changes in stimulated nerve. *The Journal of Physiology* 108:278–281.

Hines M, Carnevale N (1997) The NEURON Simulation Environment. *Neural Comput* 9:1179–1209.

Hirota A, Sato K, Momose-Sato Y, Sakai T, Kamino K (1995) A new simultaneous 1020-site optical recording system for monitoring neural activity using voltage-sensitive dyes. *Journal of Neuroscience Methods* 56:187–194.

Homma R, Baker BJ, Jin L, Garaschuk O, Konnerth A, Cohen LB, Zecevic D (2009) Wide-field and two-photon imaging of brain activity with voltage- and calcium-sensitive dyes. *Philosophical Transactions Royal Soc Lond Ser B Biological Sci* 364:2453–2467.

Huang, Y. Y., Nguyen, P. V., Abel, T., and Kandel, E. R. (1996). Long-lasting forms of synaptic potentiation in the mammalian hippocampus. *Learning and Memory*. 3:74–85.

Huerta PT, Lisman JE (1995) Bidirectional synaptic plasticity induced by a single burst during cholinergic theta oscillation in CA1 in vitro. *Neuron* 15:1053–1063.

Ichikawa M, Iijima T, Matsumoto G, Ono T (1993) Real-Time optical recording of neuronal activities in the Brain. In: Ono T et al., editors. *Brain Mechanisms of Perception and Memory*. New York: Oxford UP, pp 638–648.

Iijima T, Witter M, Ichikawa M, Tominaga T, Kajiwara R, Matsumoto G (1996) Entorhinal-hippocampal interactions revealed by real-time imaging. *Science* (New York, NY) 272:1176–1179.

Inoue M, Hashimoto Y, Kudo Y, Miyakawa H (2001) Dendritic attenuation of synaptic potentials in the CA1 region of rat hippocampal slices detected with an optical method. *The European Journal of Neuroscience* 13:1711–1721.

Isaacson JS, Scanziani M (2011) How Inhibition Shapes Cortical Activity. *Neuron* 72:231–243.

Jackson, M. B. (2013). Recall of spatial patterns stored in a hippocampal slice by long-term potentiation. *The Journal of Neurophysiology* 110:2511–2519.

Jin, W., Zhang, R.-J., and Wu, J. Y. (2002). Voltage-sensitive dye imaging of population neuronal activity in cortical tissue. *Journal of Neurosci. Methods* 115:13–27.

Johnston D, Christie B, Frick A, Gray R, Hoffman D, Schexnayder L, Watanabe S, Yuan L

(2003) Active dendrites, potassium channels and synaptic plasticity. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 358:667–674.

Juliandi B, Tanemura K, Igarashi K, Tominaga T, Furukawa Y, Otsuka M, Moriyama N, Ikegami D, Abematsu M, Sanosaka T, Tsujimura K, Narita M, Kanno J, Nakashima K (2016) Reduced Adult Hippocampal Neurogenesis and Cognitive Impairments following Prenatal Treatment of the Antiepileptic Drug Valproic Acid. *Stem Cell Reports* 5:996–1009.

Kaila, K., Lamsa, K., Smirnov, S., Taira, T., and Voipio, J. (1997). Long-lasting GABA-mediated depolarization evoked by high-frequency stimulation in pyramidal neurons of rat hippocampal slice is attributable to a network-driven, bicarbonate-dependent K⁺ transient. *The Journal of Neuroscience*. 17:7662–7672.

Kajiwara R, Tominaga Y, Tominaga T (2019) Network Plasticity Involved in the Spread of Neural Activity Within the Rhinal Cortices as Revealed by Voltage-Sensitive Dye Imaging in Mouse Brain Slices. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 13:20.

Kandel E, Spencer W, Brinley F (1961) Electrophysiology of hippocampal neurons. I. Sequential invasion and synaptic organization. *Journal of Neurophysiology* 24:225–242.

Kandel, E. R. (2001). The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* 294:1030–1038.

Kang H, human E (1996) A Requirement for Local Protein Synthesis in Neurotrophin-Induced Hippocampal Synaptic Plasticity. *Science* 273:1402–1406.

Karnup S, Stelzer A (1999) Temporal overlap of excitatory and inhibitory afferent input in guinea-pig CA1 pyramidal cells. *The Journal of Physiology* 516 (Pt 2):485–504.

Knöpfel T (2012) Genetically encoded optical indicators for the analysis of neuronal circuits. *Nature Reviews Neuroscience* 13:687.

Knöpfel, T. (2008). Expanding the toolbox for remote control of neuronal circuits. *Nature Methods* 5:293–295.

Knöpfel T, Song C. Optical voltage imaging in neurons: moving from technology development to practical tool. *Nature Reviews Neurosci* 20: 719–727, 2019.

Kojima S, Nakamura T, Nidaira T, Nakamura K, Ooashi N, Ito E, Watase K, Tanaka K, Wada K, Kudo Y, Miyakawa H (1999) Optical Detection of Synaptically Induced Glutamate Transport in Hippocampal Slices. *The Journal of Neuroscience* 19:2580–2588.

Korte M, Carroll P, Wolf E, Brem G, Thoenen H, Bonhoeffer T (1995) Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92:8856–8860

Korte M, Kang H, Bonhoeffer T, Schuman E (1998) A role for BDNF in the late-phase of hippocampal long-term potentiation. *Neuropharmacology* 37:553–559.

Lacaille J, Schwartzkroin P (1988a) Stratum lacunosum-moleculare interneurons of hippocampal CA1 region. I. Intracellular response characteristics, synaptic responses, and morphology. *Journal of Neuroscience* 8: 1400–1410

Lacaille J, Schwartzkroin P (1988b) Stratum lacunosum-moleculare interneurons of hippocampal CA1 region. II. Intracellular and intradendritic recordings of local circuit synaptic interactions. *Journal of Neuroscience* 8: 1411–24

Larson J, Lynch G (1986) Induction of synaptic potentiation in hippocampus by patterned stimulation involves two events. *Science* 232:985–988.

Larson J, Munkácsy E (2015) Theta-burst LTP. *Brain Research* 1621:38–50.

Larson J, Wong D, Lynch G (1986) Patterned stimulation at the theta frequency is optimal for the induction of hippocampal long-term potentiation. *Brain Research* 368:347–350.

Loew L, Cohen L, Dix J, Fluhler E, Montana V, Salama G, Jian-young W (1992) A naphthyl analog of the aminostyryl pyridinium class of potentiometric membrane dyes shows consistent sensitivity in a variety of tissue, cell, and model membrane preparations. *The Journal of Membrane Biology* 130:1–10.

Loew LM, Cohen LB, Salzberg BM, Obaid AL, Bezanilla F (1985) Charge-shift probes of membrane potential. Characterization of aminostyrylpyridinium dyes on the squid giant axon. *Biophysical Journal* 47:71–77.

Magee JC, Johnston D (1995) Synaptic activation of voltage-gated channels in the dendrites of hippocampal pyramidal neurons. *Science* (New York, NY) 268:301–304.

Mann EO, Tominaga T, Ichikawa M, Greenfield SA (2005) Cholinergic modulation of the spatiotemporal pattern of hippocampal activity in vitro. *Neuropharmacology* 48:118–133.

Megias M, Emri Z, Freund T, Gulyás A (2001) Total number and distribution of inhibitory and excitatory synapses on hippocampal CA1 pyramidal cells. *Neuroscience* 102:527–540.

Mennerick S, Chisari M, Shu H-J, Taylor A, Vasek M, Eisenman LN, Zorumski CF (2010)

Diverse voltage-sensitive dyes modulate GABAA receptor function. *The Journal of Neuroscience* 30:2871–2879.

Migliore M (2003) On the integration of subthreshold inputs from Perforant Path and Schaffer Collaterals in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Journal of Computational Neuroscience* 14:185–192.

Migliore M, Hoffman DA, Magee JC, Johnston D (1999) Role of an A-type K⁺ conductance in the back-propagation of action potentials in the dendrites of hippocampal pyramidal neurons. *Journal of Computational Neuroscience* 7:5–15.

Mochida H, Sato K, Sasaki S, Yazawa I, Kamino K, Momose-Sato Y (2001) Effects of anisomycin on LTP in the hippocampal CA1: long-term analysis using optical recording. *Neuroreport* 12:987–991.

Momose-Sato Y, Sato K, Arai Y, Yazawa I, Mochida H, Kamino K (1999) Evaluation of Voltage-Sensitive Dyes for Long-Term Recording of Neural Activity in the Hippocampus. *Journal of Membrane Biology* 172:145–157.

Monday HR, Castillo PE (2017) Closing the gap: long-term presynaptic plasticity in brain function and disease. *Current Opinion in Neurobiology* 45:106–112.

Monday HR, Younts TJ, Castillo PE (2018) Long-Term Plasticity of Neurotransmitter Release: Emerging Mechanisms and Contributions to Brain Function and Disease. *Annual Review of Neuroscience* 41:299–322.

Mullah S, Komuro R, Yan P, Hayashi S, Inaji M, Momose-Sato Y, Loew LM, Sato K (2013) Evaluation of Voltage-Sensitive Fluorescence Dyes for Monitoring Neuronal Activity in the

Embryonic Central Nervous System. *Journal of Membrane Biology* 246:679–688.

Murray, J. D., Anticevic, A., Gancsos, M., Ichinose, M., Corlett, P. R., Krystal, J. H., et al. (2014). Linking microcircuit dysfunction to cognitive impairment: effects of disinhibition associated with schizophrenia in a cortical working memory model. *Cerebular Cortex* 24:859–872.

Nakagami Y, Saito H, Matsuki N (1997) Optical recording of trisynaptic pathway in rat hippocampal slices with a voltage-sensitive dye. *Neuroscience* 81:1–8.

Nevian T, Larkum ME, Polsky A, Schiller J (2007) Properties of basal dendrites of layer 5 pyramidal neurons: a direct patch-clamp recording study. *Nature Neuroscience* 10:206–214.

Nishimura M, Shirasawa H, Song W-J (2006) A light-emitting diode light source for imaging of neural activities with voltage-sensitive dyes. *Neuroscience Research* 54:230–234.

O'Keefe, J., and Dostrovsky, J. (1971). The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Research*. 34:171–175.

Persico AM, Bourgeron T (2006) Searching for ways out of the autism maze: genetic, epigenetic and environmental clues. *Trends in Neurosciences* 29:349–358.

Peterka, D. S., Takahashi, H., and Yuste, R. (2011). Imaging voltage in neurons. *Neuron* 69, 9–21.

Popovic M, Gao X, Zecevic D (2012) Voltage-sensitive dye recording from axons, dendrites and dendritic spines of individual neurons in brain slices. *Journal of visualized experiments: JoVE*.

Pouille F, Scanziani M (2004) Routing of spike series by dynamic circuits in the hippocampus. *Nature* 429:717–723.

Ratzlaff EH, Grinvald A (1991) A tandem-lens epifluorescence microscope: Hundred-fold brightness advantage for wide-field imaging. *Journal of Neurosci Methods* 36:127–137.

Ross WN, Salzberg BM, Cohen LB, Davila HV (1974) A large change in dye absorption during the action potential. *Biophysical Journal* 14:983–986.

Saggau P, Galvan M, ten Bruggencate G (1986) Long-term potentiation in guinea pig hippocampal slices monitored by optical recording of neuronal activity. *Neuroscience letters* 69:53–58.

Sakmann B, Stuart G (1995) Single-Channel Recording. :199–211.

Salzberg B (1989) Optical recording of voltage changes in nerve terminals and in fine neuronal processes. *Annual Review of Physiology* 51:507–526.

Salzberg B, Davila H, Cohen L (1973) Optical Recording of Impulses in Individual Neurones of an Invertebrate Central Nervous System. *Nature* 246:246508a0.

Sayer R, Redman S, Andersen P (1989) Amplitude fluctuations in small EPSPs recorded from CA1 pyramidal cells in the guinea pig hippocampal slice. *The Journal of Neuroscience* 9:840–850.

Schaffer P, Ahammer H, Muller W, Koidl B, Windisch H (1994) Di-4-ANEPPS causes photodynamic damage to isolated cardiomyocytes. *Pflügers Archive European Journal of Physiology* 426:548–551.

Schwartzkroin PA (1986) Regulation of excitability in hippocampal neurons. In: Issacson RL, Pribram KH, editors. *The Hippocampus*, vol. 3, pp 113–136. New York: Plenum Press.

Sekino Y, Obata K, Tanifuji M, Mizuno M, Murayama J (1997) Delayed signal propagation via CA2 in rat hippocampal slices revealed by optical recording. *Journal of Neurophysiology* 78:1662–1668.

Smith JP, Lal V, Bowser D, Cappai R, Masters CL, Ciccotosto GD (2009) Stimulus pattern dependence of the Alzheimer's disease amyloid-42 peptide's inhibition of long term potentiation in mouse hippocampal slices. *Brain Research* 1269:176–184.

Stepan J, Dine J, Eder M (2015) Functional optical probing of the hippocampal trisynaptic circuit in vitro: network dynamics, filter properties, and polysynaptic induction of CA1 LTP. *Frontiers in Neuroscience* 9:160.

Stuart G, Dodt H, Sakmann B (1993) Patch-clamp recordings from the soma and dendrites of neurons in brain slices using infrared video microscopy. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 423:511–518.

Suh J, Rivest AJ, Nakashiba T, Tominaga T, Tonegawa S (2011) Entorhinal Cortex Layer III Input to the Hippocampus Is Crucial for Temporal Association Memory. *Science* 334:1415–1420.

Takashima I, Ichikawa M, Iijima T (1999) High-speed CCD imaging system for monitoring neural activity in vivo and in vitro, using a voltage-sensitive dye. *Journal of Neuroscience Methods* 91:147–159.

Takesian, A. E., and Hensch, T. K. (2013). Balancing plasticity/stability across brain development. *Progress in Brain Research* 207:3–34.

Tanemura K, Murayama M, Akagi T, Hashikawa T, Tominaga T, Ichikawa M, Yamaguchi H, Takashima A (2002) Neurodegeneration with Tau Accumulation in a Transgenic Mouse Expressing V337M Human Tau. *The Journal of Neuroscience* 22:133–141.

Tanifuji M, Sugiyama T, Murase K (1994) Horizontal propagation of excitation in rat visual cortical slices revealed by optical imaging. *Science* (New York, NY) 266:1057–1059.

Tasaki I, Carnay L, Watanabe A (1968) Changes in fluorescence, turbidity, and birefringence associated with nerve excitation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 64:1362–1368.

Tominaga T, Ichikawa M (2002a) Experimental apparatus for sliced specimen of biological tissue and specimen holder. US Patent US 6,448,063 B2.

Tominaga T, Kajiwarra R, Tominaga Y (2013) VSD Imaging Method of Ex Vivo Brain Preparation. *Journal of Neuroscience and Neuroengineering* 2:211-219(9).

Tominaga T, Tominaga Y (2011) Practices for the VSD Optical Recording Method of Neuronal Circuit Analysis. *Seibutsu Butsuri* 51:092–095.

Tominaga T, Tominaga Y, Ichikawa M (2002b) Optical imaging of long-lasting depolarization on burst stimulation in area CA1 of rat hippocampal slices. *Journal of Neurophysiology* 88:1523–1532.

Tominaga T, Tominaga Y, Ichikawa M (2001) Simultaneous multi-site recordings of neural

activity with an inline multi-electrode array and optical measurement in rat hippocampal slices. *Pflügers Archive European Journal of Physiology* 443:317–322.

Tominaga T, Tominaga Y, Yamada H, Matsumoto G, Ichikawa M (2000) Quantification of optical signals with electrophysiological signals in neural activities of Di-4-ANEPPS stained rat hippocampal slices. *Journal of Neurosci Methods* 102:11–23.

Tominaga Y, Ichikawa M, Tominaga T (2009) Membrane potential response profiles of CA1 pyramidal cells probed with voltage-sensitive dye optical imaging in rat hippocampal slices reveal the impact of GABAA-mediated feed-forward inhibition in signal propagation. *Neuroscience Research* 64:152–161.

Tominaga Y, Taketoshi M, Maeda N, Tominaga T (2019) Wide-field Single-photon Optical Recording in Brain Slices Using Voltage-sensitive Dye. *Journal of Visual Experiments Jove*. e59692, 1-12

Tominaga Y, Taketoshi M, Tominaga T (2018) Overall Assay of Neuronal Signal Propagation Pattern With Long-Term Potentiation (LTP) in Hippocampal Slices From the CA1 Area With Fast Voltage-Sensitive Dye Imaging. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 12:389.

Tominaga, T., and Tominaga, Y. (2016). Paired burst stimulation causes GABA_A receptor-dependent spike firing facilitation in CA1 of rat hippocampal slices. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 10:9.

Tominaga, T., and Tominaga, Y. (2010). GABAA receptor-mediated modulation of neuronal activity propagation upon tetanic stimulation in rat hippocampal slices. *Pflügers Archive European Journal of Physiology* 460:875–889.

Turner D (1988) Waveform and amplitude characteristics of evoked responses to dendritic stimulation of CA1 guinea-pig pyramidal cells. *The Journal of Physiology* 395:419–439.

Turner D (1990) Feed-forward inhibitory potentials and excitatory interactions in guinea-pig hippocampal pyramidal cells. *The Journal of Physiology* 422:333–350.

Uhlhaas PJ, Singer W (2012) Neuronal Dynamics and Neuropsychiatric Disorders: Toward a Translational Paradigm for Dysfunctional Large-Scale Networks. *Neuron* 75:963–980.

Voipio, J., and Kaila, K. (2000). GABAergic excitation and K⁺-mediated volume transmission in the hippocampus. *Progress in Brain Research* 125:329–338.

Vranesic I, Iijima T, Ichikawa M, Matsumoto G, Knöpfel T (1994) Signal transmission in the parallel fiber-Purkinje cell system visualized by high-resolution imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91:13014–13017.

Waggoner A, Salzberg B, Davila H, Cohen L (1973) A Large Change in Axon Fluorescence that Provides a Promising Method for Measuring Membrane Potential. *Nat New Biology* 241:159.

Watanabe D, Inokawa H, Hashimoto K, Suzuki N, Kano M, Shigemoto R, Hirano T, Toyama K, Kaneko S, Yokoi M, Moriyoshi K, Suzuki M, Kobayashi K, Nagatsu T, Kreitman R, Pastan I, Nakanishi S (1998) Ablation of cerebellar Golgi cells disrupts synaptic integration involving GABA inhibition and NMDA receptor activation in motor coordination. *Cell* 95:17–27.

Witter, M. P. (1993). Organization of the entorhinal—hippocampal system: a review of current anatomical data. *Hippocampus* 3:33–44.

Wright, B. J., and Jackson, M. B. (2014). Long-term potentiation in hilar circuitry modulates

gating by the dentate gyrus. *The Journal of Neuroscience* 34:9743–9753.

Yuste R, Tank D, Kleinfeld D (1997) Functional study of the rat cortical microcircuitry with voltage-sensitive dye imaging of neocortical slices. *Cerebral cortex* 7:546–558.

Zecevic D (1995) Multiple spike-initiation zones in single neurons revealed by voltage-sensitive dyes. *Nature* 381:322–325.

発表論文

1. Hirashima K, Tominaga T, Tominaga Y, Fengming Y, Tomotsune D, Sasaki K Analysis of the cellular membrane modality of cancer stem-like cells generated by reprogramming technique with a novel optical measurement technology. (*Submitted*)
2. Tominaga Y, Taketoshi M, Maeda N, *Tominaga T Wide-field single-photon optical recording in brain slices using voltage-sensitive dye, *J. Vis. Exp.* (148), e59692, doi:10.3791/59692 (2019).
3. *Kajiwara R, Tominaga Y, Tominaga T (2019) Network plasticity involved in the spread of neural activity within the rhinal cortices as revealed by voltage-sensitive dye imaging in mouse brain slices *Front. Cell. Neurosci.* doi: 10.3389/fncel.2019.00020 2019 年 1 月
4. Tominaga Y, Taketoshi M., Tominaga, T.* (2018) Overall assay of neuronal signal propagation pattern with long-term potentiation (LTP) in hippocampal slices from the CA1 area with fast voltage-sensitive dye imaging *Front. Cell Neurosci.*, 12:389 doi: 10.3389/fncel.2018.00389
5. Yoshimura, H.*, Sugai, T., Kato, N., Tominaga, T., Tominaga Y, Hasegawa, T., Yao, C., and Akamatsu, T. (2016). Interplay between non-NMDA and NMDA receptor activation during oscillatory wave propagation: Analyses of caffeine-induced oscillations in the visual cortex of rats. *Neural Networks*. (2016) DOI: 10.1016/j.neunet.2016.03.012
6. Tominaga T* and Tominaga Y (2016). Paired burst stimulation causes GABAA receptor-dependent spike firing facilitation in CA1 of rat hippocampal slices. *Front. Cell. Neurosci.* 10:9. doi: 10.3389/fncel.2016.00009
7. Tominaga T* and Tominaga Y. (2013) A new non-scanning confocal microscopy module for functional voltage-sensitive dye and Ca²⁺ imaging of neuronal circuit activity *Journal of Neurophysiology* *J Neurophysiol* 110, 553-561
8. Tominaga T, Kajiwara R, Tominaga Y (2013) VSD Imaging Method of Ex Vivo Brain Preparation. *J Neurosci Neuroeng* 2:211-219(9).
9. Tominaga T* and Tominaga Y (2011) Practices for the VSD Optical Recording Method of Neuronal Circuit Analysis. *Seibutsu Butsuri* 51:092–095.

10. Tominaga T*, and Tominaga Y (2010) GABA(A) receptor-mediated modulation of neuronal activity propagation upon tetanic stimulation in rat hippocampal slices. *Pflugers Arch* 460: 875-889.
11. Tominaga Y, Ichikawa M, Tominaga T* (2009) Membrane potential response profiles of CA1 pyramidal cells probed with voltage-sensitive dye optical imaging in rat hippocampal slices reveal the impact of GABAA-mediated feed-forward inhibition in signal propagation *Neurosci Res.* 64: 152-161
12. Tominaga T*, Tominaga Y, Ichikawa M (2002) Optical imaging of long-lasting depolarization on burst stimulation in area CA1 of rat hippocampal slices. *Journal of Neurophysiology* 88:1523-1532.
13. Tominaga T*, Tominaga Y, Ichikawa M (2001) Simultaneous multi-site recordings of neural activity with an inline multi-electrode array and optical measurement in rat hippocampal slices. *Pflügers Arch* 443:317-322.
14. Tominaga T*, Tominaga Y, Yamada H, Matsumoto G, Ichikawa M (2000) Quantification of optical signals with electrophysiological signals in neural activities of Di-4-ANEPPS stained rat hippocampal slices. *Journal of Neuroscience Methods* 102:11-23.