

## 嗅球神経回路の調節に関する三次元構造解析

### Three-Dimensional Structural Analysis for Regulation of Neural Circuit in the Olfactory Bulb

樋田 一徳, 清蔭 恵美, 鈴木 良典, 浜本 真一

Kazunori Toida, Emi Kiyokage, Yoshinori Suzuki and Masakazu Hamamoto

川崎医科大学解剖学

**要 旨** 脳の基本的神経回路のモデルとして注目される嗅覚系の一次中枢の嗅球は、これまで介在ニューロンを中心としたニューロン構成の解析から始まったが、最近の新たな細胞標識法や顕微鏡技術の発展などにより、従来同定できなかったニューロン、特に他の脳領域からの長距離にわたる遠心性投射系ニューロンの単一標識が可能となってきた。これらのニューロンによる神経回路調節の構造的基盤は従来推測の域を出ていなかったが、遺伝子改変動物、ウイルスベクターを用いた遺伝子導入、多重免疫染色、レーザー顕微鏡と電子顕微鏡を直接組み合わせた統合解析、デジタル単一ニューロントレース、電子線トモグラフィーを駆使することで、嗅球神経回路への遠心性調節ニューロンの存在意義が分かり始めた。本稿では最近の筆者らのセロトニンニューロンについての所見を紹介し、神経回路への調節系の三次元構造解析の有用性と意義、そして今後の発展の可能性を論じた。

**キーワード**：嗅球, 神経回路, 調節, セロトニン, ニューロン標識

#### 1. はじめに

嗅覚系の一次中枢の嗅球は、従来、脳の基本的神経回路のモデルとして注目され、カハール以来、現在に至るまで魅力的な解析の対象となってきた<sup>1)</sup>。この中で筆者らはこれまで一貫して、電子顕微鏡連続切片再構築法を基軸として、様々な手法を用いて嗅球神経回路を解析してきた。神経回路を解析する当初は、我々の研究は介在ニューロンを中心としたニューロン構成の解析から始まったが、現在では細胞標識法や顕微鏡の応用など、様々な技術的進歩がある。本稿ではこれまでの我々の研究をベースに、特に新たな手法で解析を進めた嗅球神経回路の調整系に焦点を当て、最近の知見を含めて解説したいと思う。

#### 2. 嗅球神経回路の概要

まず嗅球神経回路の概要を説明したい(図1)<sup>2)</sup>。嗅神経は嗅球に入り、表層の糸球体内で終末する。その終末の先は二次ニューロンであり、嗅球から高次中枢への投射ニューロンである僧帽細胞で、これにより嗅覚情報が高次脳中枢へ伝達される。その高次への投射の際に、糸球体において傍糸球体細胞と総称される介在ニューロン群が多様な様式でシナプス結合し、嗅覚情報の伝達調節を行っている。介在ニューロン群は、GABA系ニューロンとドーパミン系ニューロンが同定

されたが<sup>1)</sup>、小坂らはこれらの介在ニューロンを、嗅神経終末との近接度の高いtype1と近接度の低いtype2に分類し<sup>3)</sup>、この分類が現在では広く受け入れられている。筆者らは両タイプの代表的なニューロンであるcalbindin(CB)免疫陽性ニューロン(CBニューロン; type2)とtyrosine hydroxylase(TH)免疫陽性ニューロン(THニューロン; type1)について、ラット嗅球において、共焦点レーザー顕微鏡三次元解析と電子顕微鏡連続切片三次元再構築法を直接組み合わせる手法によりシナプス結合の解析を行った。その結果、CBニューロンは嗅神経から直接シナプス結合を受けず、投射ニューロンの樹状突起との間に相反性シナプス(reciprocal synapse)を形成し<sup>4)</sup>、一方THニューロンは嗅神経からの直接的なシナプス結合を頻繁に受け、投射ニューロンの樹状突起との間に相反性シナプスを形成せず、非対称性シナプスを受け、別の投射ニューロン樹状突起に対称性シナプスを形成する連続性シナプス(serial synapse)を形成することがわかった<sup>5)</sup>。以上の所見はマウスにおいても同様な傾向がある(筆者らの未発表データ)。嗅神経との直接入力の有無で、type1とtype2に分類された介在ニューロン群が化学的性質と形態的特徴が異なり、更にニューロンの神経回路内のシナプス結合が異なる事実は興味深い。この真の意味は今後の機能的解析による検証に委ねたいが、少なくとも形態学的所見から、THニューロンは匂い識別に、CBニューロンは匂い感度に関わっている可能性が示唆される<sup>2,6)</sup>。

このような嗅球神経回路は、そのニューロン構成や神経回路機能について様々な調節系の影響を受けていることがわ

〒701-0192 岡山県倉敷市松島 577  
TEL: 086-462-1111; FAX: 086-462-1199  
2015年4月22日受付

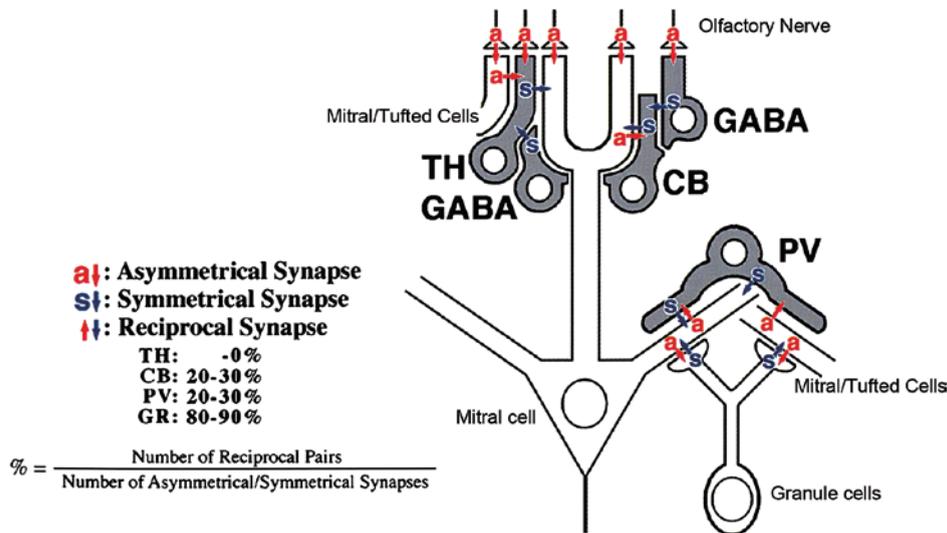


図1 化学的に同定されたニューロンによる嗅球シナプス神経回路（文献2）より転載）

かっている<sup>1)</sup>。本稿では、以前から解析が進んでいる嗅球独特の匂い刺激による神経回路調節と、最近注目が集まっている他の脳領域からの遠心性調節について、筆者らの最近のデータをもとに以下に紹介したい。

### 3. 匂い刺激による嗅球神経回路の調節

嗅球は嗅覚系の一次中枢であることから、その神経回路は一次ニューロンである嗅神経による匂い刺激が入力源となる。興味深いのは、無数の匂い刺激源となりうる化学物質の種類に関わらず、入力を完全に遮断すると神経回路内のニューロン構成が変わることである。正確には、ニューロンの存在は変わらないものの、構成ニューロンの化学的性質の発現に変化が見られるというべきであろうか。先に述べた type1 ニューロンとして前掲の TH ニューロンは GABA の主要なサブポピュレーションでもあるが<sup>3,5)</sup>、このニューロンは鼻閉や鼻粘膜傷害などによる嗅神経の物理的・機能的遮断を行うと、GABA 合成酵素の glutamate decarboxylase (GAD) の発現は変化しないものの、同じニューロンに共存する TH の発現が下がる。このことは、嗅入力遮断によって嗅神経から密接にシナプス結合を受ける TH ニューロンの化学的性質の変化の特徴として理解できるが、神経伝達物質の合成酵素の別の GAD が同じニューロン内に共存しているにもかかわらず不変であることは不思議である。従来、この現象は免疫染色などでわかっていたが<sup>7)</sup>、最近、個体レベルで TH のプロモーター下に green fluorescein protein (GFP) 遺伝子発現を導入した、TH-GFP トランスジェニックマウス (TH-GFP マウス)<sup>8)</sup> によって更に現象の詳細が明らかとなった。

マウスの外鼻孔を縫い合わせ、匂い刺激物質が鼻腔に達することのないように外気との遮断を行う機能的鼻閉は従来よく用いられてきた手法であるが、筆者らは TH-GFP マウスの長期鼻閉モデルを作り、TH 遺伝子、TH タンパク、GFP タンパクの発現の変化を解析・検討した。その結果、TH の

発現は、TH、GFP の両タンパク共に低下しているものの、低下する TH と共存する GAD のタンパク発現は低下せず不変であった。以上は従来の結果を指示する所見であるが<sup>7)</sup>、興味深いことに TH-GFP モデルマウスでは、TH 遺伝子発現を標識した GFP タンパクの低下が顕著でないこと、そして TH タンパクの発現では比較的小型の細胞体の TH ニューロンで低下の度合いが著しく、逆に大型の細胞体の TH ニューロンでは長期鼻閉によっても発現が比較的温存されていることである<sup>9)</sup>。この多様な、わずかな変化の違いの理由は、組み替え遺伝子が挿入されたゲノム領域の影響による異所的発現や TH プロモーターの GFP 発現効率の影響、TH と GFP の合成・分解サイクルの違いなどが考えられるが、詳細は不明である。一方で、筆者らの TH ニューロンの電気的特性と形態の解析から、TH ニューロンには嗅神経刺激に対する反応性に高低の多様性があり、比較的大型のニューロンに反応性の低いものが認められたことから<sup>10)</sup>、TH という同じ化学的性質のニューロンで、形態の特徴と電気的特性に加えて、遺伝学的背景も加味すると、神経回路内での TH ニューロンの更に詳細な存在意義が明らかになる可能性がある。

なお、鼻閉はヒトの場合に問題になるのは慢性鼻炎などである。アレルギーなどで長期鼻閉の後、アレルギーが治まり鼻閉症状が改善しても嗅覚を失う、あるいは機能が改善しないケースが多い。シナプス結合からみれば嗅神経からの入力再開を考えると、理解しづらい現象である。このように、身近な疾患や発症の謎にも、動物モデルを用いた嗅球神経回路の解析は有用であろう<sup>11)</sup>。

### 4. 遠心性入力による嗅球神経回路の調節

#### 4.1 遠心性調節について

嗅球神経回路の調節系として、次に高次中枢、あるいは他の脳領域からの遠心性調節について述べたい。一般に感覚系は感覚器官から末梢神経を経て中枢に入り、中枢神経系内の

伝導路を通り、様々な脳領域、すなわち一次中枢、二次中枢、あるいは中継領域を経て、高次中枢へ向かう<sup>12)</sup>。この間に、それぞれの脳領域において情報は適切に処理される。一方、情報処理は個々の脳領域の介在ニューロンを中心とした局所の神経回路によって処理されるが、他の脳領域から投射してくるニューロン系によっても調節される。嗅覚系のように、感覚系は情報伝達が脳の上位中枢へ向かうため、その方向性から上行性あるいは求心性である。この観点からすれば、他の脳領域から投射してくるニューロン系は遠心性調節入力といえる。嗅覚系では古典的なトレーサー実験によって、嗅球へ向かう3種の遠心性調節入力の存在がわかっている<sup>1)</sup>。すなわち、青斑核からのノルアドレナリンニューロン<sup>13)</sup>、縫線核からのセロトニンニューロン<sup>14)</sup>、ブローカ対角帯水平脚からのアセチルコリンニューロン<sup>15)</sup>である。これらのニューロンは、注意、学習、記憶、感情、脳機能賦活、自律神経系への影響など多彩な機能を持つ生理活性物質を含有するが、嗅覚系にどのように影響を及ぼすかは長らく謎であった。理由は、それぞれのニューロンが起始核からどのような脳内経路によって嗅球へ至るのか、途中でどこに分枝し、またどこからか影響を受けるのか、そして嗅球へ至った後、どのようなメカニズムで標的となるニューロンや局所回路にそれぞれの物質が影響を及ぼすのか、など不明な点は数多く、存在がわかっているにもかかわらずこの長距離にわたる脳内投射系の全貌は把握できず、解析の糸口さえつかめなかったのが事実のようである。しかし古典的とは言え、先人の苦勞は事実を物語っている。起始核から標的領域への順行性投射実験、逆に標的領域に逆行性トレーサーを注入して起始核を探索する解析など、トレーサー実験は興味深い示唆を我々に与えてくれたが、やはり点と点の関係以上の解釈は推測の域を超えず、horse-radish peroxidase (HRP) のような可視化像の連続標本も、群としてのニューロン投射像としては十分な解明を得るに至らなかった。このような中で、標識ニューロンのより選択的な標識の必要性が高まってきた。

#### 4.2 単一セロトニンニューロンの選択的標識

古田らはリコンビナントウイルス (Sindbis virus; シンビスウイルス) を定位脳固定法により特定の脳領域に注入し、標的ニューロンを感染させることによって遺伝子を導入し、

膜タンパクシグナルに蛍光標識を行うことで、単一のニューロンを細胞体から軸索末端まで可視化することに成功した<sup>16)</sup>。この方法の神経科学史上の位置づけは当誌前号に掲載された優れた解説論文にわかりやすく述べられているが<sup>12)</sup>、脳内に数少ないニューロンが浮かび上がる形態像は、ゴルジ銀染色によく似ている。第113回日本解剖学会全国学術総会において京都大学の金子武嗣教授がシンポジウムの口演で“遺伝工学を用いた現代のゴルジ法”と解説されことは印象深い<sup>17)</sup>。そこで筆者らは金子教授との共同研究を進め、嗅球への長距離遠心性投射ニューロン系の解析を行った。

#### 4.3 嗅球へのセロトニンニューロンの投射

セロトニンニューロンは、抗セロトニン抗体で免疫染色することで、細胞体、軸索、樹状突起は一応染まる。しかし起始核の細胞体はよく識別できても、樹状突起、そして軸索の細い線維は脳内全体に観察され、その線維がどのように走行しているかは実際判別が不可能であるが、線維分布の密度はわかり、起始核の縫線核と投射先の嗅球に濃染するのがわかる(図2)。これでようやく、点(縫線核)と点(嗅球)、その間の線(軸索)が把握できるが、これも連続性の点では推測にすぎない。わずかな距離であるが、嗅球内に分布するセロトニン免疫陽性線維をNeuroLucida<sup>18)</sup>によってデジタル立体トレースすることが出来た(図3)。点(嗅球)から線(軸索)がつながり始めた。これによって嗅球の各層を横断して線維を伸ばし、特定の領域(嗅球糸球体層)で分枝していることがわかった。次に実際にこのニューロンが縫線核から投射しているか否かを検証するために、シンビスウイルスを用いて解析することにした。そして鈴木らは条件設定の試行を繰り返し、ようやく至適な標識条件を得て単一のセロトニンニューロンの縫線核からの投射の全体像を明らかにすることに成功した(図4)<sup>19)</sup>。

方法を簡単に説明する。生体マウスを麻酔下で定位脳装置に固定し、目的の縫線核にカニューレを挿入し、微小注入器によってシンビスウイルスを注入した。注入後に頭皮を縫合して覚醒し、数日間の生存後に固定液で灌流固定する。固定後に脳を取り出し、ビブラトームで50 μm厚の連続スライスを作製し、個々のスライスを蛍光顕微鏡で観察すると、感染したニューロンがGFPなどの蛍光標識によって同定で

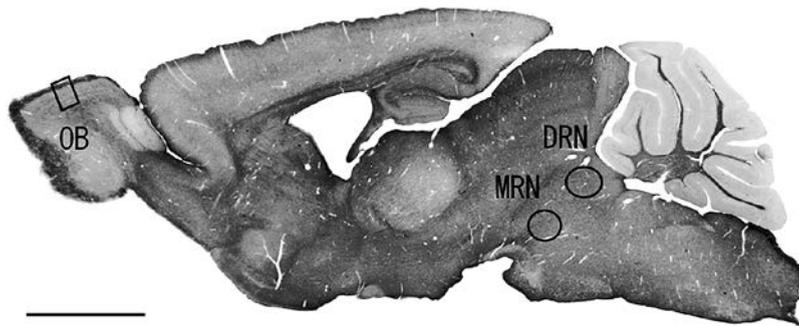


図2 抗セロトニン抗体を用いた免疫染色をしたマウス脳傍矢状断スライス (50 μm厚)。起始核 (DRN; 背側縫線核, MRN; 内側縫線核) と嗅球 (OB; 特に表層) に免疫陽性が高い。Bar = 2 mm. (文献20)より転載)

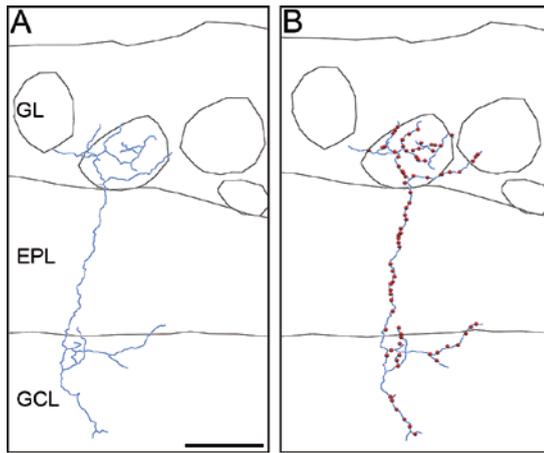


図3 マウス嗅球において免疫染色されたセロトニンニューロン線維のNeuroLucidaによるデジタルトレース像. 左右で $\pm 8^\circ$ のステレオ像となる. 右図の線維上の赤い点は、シナプス結合が存在すると考えられる varicosity. 分枝, varicosity の分布と数が層によって異なっている. Bar = 50  $\mu\text{m}$ . (文献 19)より転載)

きる. しかしこの感染ニューロンがセロトニンニューロンであるかはこの段階ではわからず, これらのスライスに抗セロトニン抗体を多重染色させて, はじめて細胞体レベルでのセロトニンの同定が可能となる (図 4A). その後, セロトニンニューロンが確認されたスライス全シリーズで抗 GFP 抗体を用いて DAB 発色し (図 4B), スライドガラス上にエポキシで包埋して永久標本とした. 感染したニューロンの線維が認められる全てのスライス標本を並べ, セロトニンニューロンと同定された細胞体から順次 NeuroLucida による立体トレースを行う. 切片の端で切り終わった線維は次の連続スライスで位置合わせをして断端を同定し, それをつなげる. その連

続によって, やがて嗅球に至る全経路がトレースできる訳である (図 4C-E)<sup>19</sup>. 埋没しているもの, 現れているものは必ず追跡できるという事実を見据え, サイエンスの理論を信じて諦めず地道に探求することが成功の秘訣のようである.

結果であるが, 周辺の脳の辺縁を同時にトレースして立体画像に残せば, あたかも透視スケール脳の中に一つのニューロンが浮かび上がる像が印象的である. 経路も明らかとなった. 縫線核を出た後, 赤核, 内側視床下核, 内側視索状前核を避けて前視床下核, そして前嗅皮質を経て嗅索 (遠心性では嗅球の入口) に至ることがわかった. 脳を外側から透視すると比較的まっすぐに戸惑いなく投射しているようであるが (図 4D), 上や正面から見ると随分と蛇行して, 走行にも意味がありそうである (図 4C, E)<sup>19</sup>.

#### 4.4 嗅球内のセロトニンニューロンのシナプス

嗅球に入るとセロトニンニューロンは深部から表層に向かって比較的まっすぐに放射状に線維を伸ばす (図 3). そして糸球体では分岐を繰り返して枝を出し, 複数の糸球体をまたがって走行しているのがわかる (図 3). 線維の所々には数珠玉状の varicosity が観察されるが, これは電子顕微鏡でシナプス構造が高頻度に認められる部位である. 電子顕微鏡では, このシナプスは形態的に非対称性シナプスに分類されるが, 大型の有芯性のシナプス小胞があるなど形態がより多様性に富む. 切片により見え方が違う, あるいは DAB 反応産物により判別しづらい場面があるために, 常に連続切片を 100 枚は切るようにして, 複数の varicosity を解析カバーできるようにしている. それでも判断に迷うことがあるので, 電子線トモグラフィーによって, シナプス結合の同定根拠となるシナプス前部 (すなわちセロトニンニューロン側) のシナプス小胞, シナプス間隙, シナプス後部 (すなわちセロト

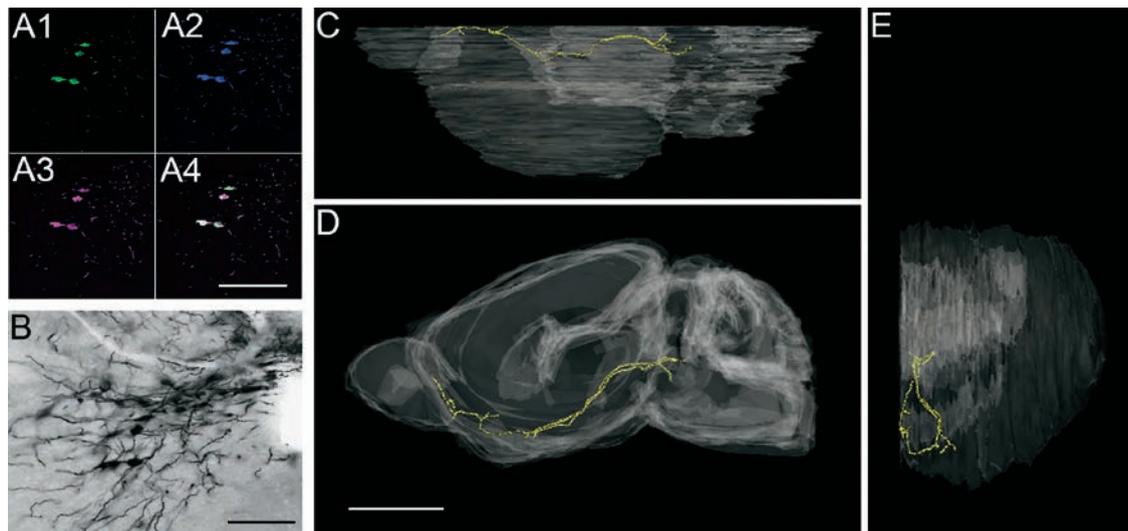


図4 シンドビスウイルスベクターを用いた遺伝子導入による単一セロトニンニューロンの標識の一例. 背側縫線核で感染したニューロン (A1; 緑) は, 抗セロトニン抗体 (A2; 青), 抗セロトニン抗体 (A3; 赤) によっていずれも免疫陽性となり (A4; 白), 感染細胞がセロトニンニューロンであることが同定された. Bar = 200  $\mu\text{m}$  (A, B), 2 mm (D; C, D, E は同拡大率). (文献 19) より転載)

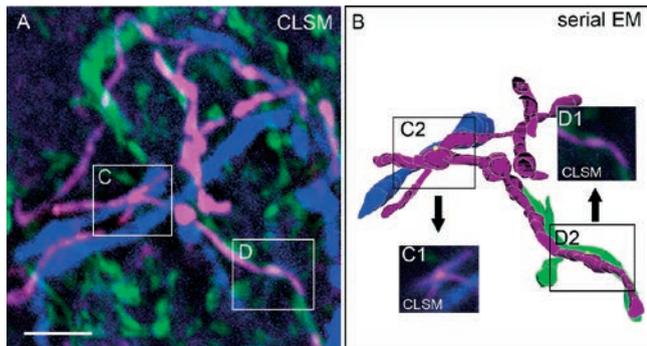


図5 マウス嗅球糸球体層の抗セロトニン抗体 (赤紫), 抗 tyrosine hydroxylase (TH) 抗体 (緑), 抗 calbindin (CB) 抗体 (青) による免疫多重蛍光染色. レーザー顕微鏡三次元再構築像 (A) の部分を電子顕微鏡連続切片から三次元再構築すると (B), レーザー顕微鏡像の特定な部位 (A の C, D) で電子顕微鏡によってシナプス結合が形成していることがわかった (A の C1, C2, D1, D2). Bar = 10  $\mu\text{m}$  (A ~ E は全て同拡大率) (文献 19) より転載)

ニンの標的ニューロン) の膜肥厚を詳細に解析した. その結果, シナプス小胞, シナプス間隙, シナプス後膜肥厚共に典型的な非対称性シナプスと対称性シナプスの中間的な構造であり, しかし形態的には非対称性シナプスに分類されることが明らかとなった<sup>20</sup>.

筆者らが一貫して行ってきた連続切片三次元再構築法は, シナプスを確実に同定するためには不可欠な手法であるが, 労力も技術も必要であり解析に時間がとられてしまう. 一方, 最近これらを確実に実行できる新たなイノベーションとして走査型電子顕微鏡による連続断面撮影法がある. (当誌 49 巻 3 号の特集を参照されたい.) これら新たな解析手法に対し, 筆者らの連続切片の有効性としては切片が残ることで, これによって電子線トモグラフィー法を用いれば, 超薄切片内の立体構造情報が分子レベルまで取得可能なことであろうか. いずれの手法を選択するかは研究者の解析の対象が何にあるのかのポイントと思われる.

さて, このセロトニンニューロンが形成するシナプスの相手側は何であるかを知らなければならない. そこでまず, これまでの研究の集積から, 蛍光多重染色を行い, セロトニンニューロンが接触しているニューロン種をレーザー顕微鏡で探索した. するとほとんどの介在ニューロンマーカーと接触し, 特に前述の type1 ニューロンの代表である TH ニューロン, type2 ニューロンの代表である CB ニューロン共に, 単一のセロトニンニューロンが近傍でコンタクトする像を頻繁に観察できた (図 5A)<sup>19</sup>. その一つをレーザー顕微鏡と一致した領域を連続切片で解析したところ, TH ニューロンと CB ニューロンとの近傍に同時に非対称性シナプスを形成していたことがわかった. これで, セロトニンニューロンの機能の上で対照的と思われる異種のニューロンに同時にシナプスするニューロンと結論づけられた (図 5B)<sup>9</sup>.

非対称性シナプスは機能的には興奮性を意味することが知られているが<sup>1</sup>, セロトニンでもその可能性を検討した結果,

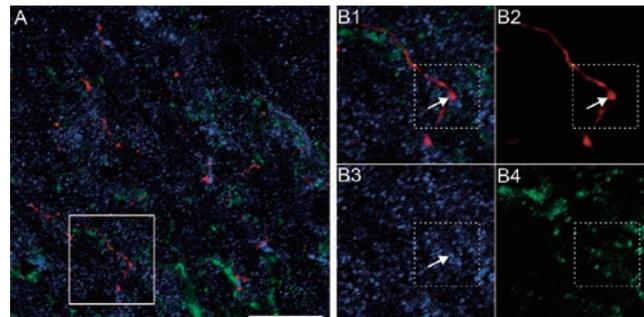


図6 マウス嗅球糸球体層の抗セロトニン抗体 (赤), 抗小胞性グルタミン酸トランスポーター 3 (VGLUT3) 抗体 (青), 抗セロトニン 2A 型受容体抗体による免疫多重蛍光染色. A の四角部分に注目. この部位を B で拡大する. B の矢印で示した部位には, セロトニン線維上 (B1, B2) に VGLUT3 が発現しているが (B1, B3), セロトニン 2A 型受容体抗体はこの部位とは離れて存在することが多い (B1, B4). Bar = 20  $\mu\text{m}$  (オリジナル未発表データ)

グルタミン酸伝達マーカーである小胞性グルタミン酸トランスポーター 3 (VGLUT3) がシナプス部位に共存することがわかり, 少なくともグルタミン酸を伝達物質として用いている可能性が明らかとなった<sup>19</sup>.

よく受ける質問は, “セロトニンニューロンの伝達物質はセロトニンか?” というものである. セロトニンニューロンの放出部位と放出されたセロトニンそのものを同定することは形態学的に難しいが, セロトニン受容体の同定は可能である. 興味深いこととして, 筆者らの予備の実験で, セロトニンと VGLUT3 の共存する部位の近接部位, すなわち非対称性シナプスを形成する相手側のニューロンのシナプス後部ではセロトニン受容体は発現せず, 近傍に散在的に発現していることである (図 6; 未発表所見). このことは, セロトニンはシナプス前部付近から放出されるもの, 受け取る受容体はやや離れた部位に存在する, いわば傍分泌のような volume transmission を行っていることを示していると思われる<sup>19</sup>.

#### 4.5 セロトニンニューロンの嗅球神経回路への調節

以上の所見を, これまでの我々の所見に重ね合わせた (図 7). セロトニンが伝達物質としてどのように働いているかはまだ十分に解明できていないが, 少なくとも興奮性に働き, 異種のニューロンに同時にシナプスしていることがわかった. このことはセロトニンが嗅球神経回路の賦活系調節を行っていることを示唆するものである<sup>19</sup>. セロトニン産生が睡眠と覚醒に伴う日内リズムを示し, 脳機能全般の賦活系機能を有していることから, 嗅覚神経回路をモデルとした更なる解析は有用性が高いと考えている.

#### 4.6 今後の展望

個体レベル, 単一ニューロンレベル, 物質別に細胞標識が可能となった現在, これまでに十分に理解の進んでいなかった長距離投射系ニューロンや volume transmission の検証が一步前進した感がある. このような状況の中で, アセチルコリンやノルアドレナリンのような他の遠心性入力についても

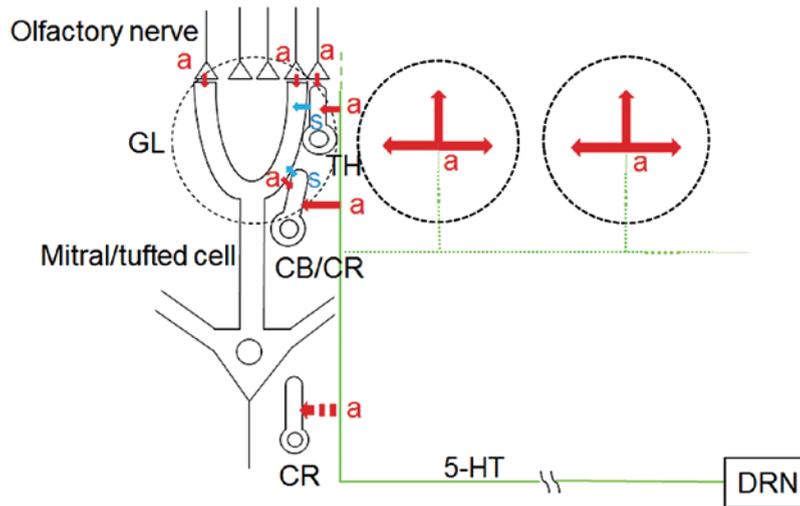


図7 (文献19)より転載) これまでの所見からまとめた, セロトニンニューロンが嗅球神経回路において賦活化作用を示す模式図。

同時に解析を進めている。そしてセロトニンを含めた相互の比較により、遠心性調整の存在意義と嗅覚神経回路調節についても考えてゆきたいと思う。

## 5. おわりに

神経回路を解析するには、ニューロンの染色から始まるのが常ではあるが、そのニューロンの染色法は特異性、選択性の点で様々である。筆者らは最終的に電子顕微鏡による解析を目的としているために、用いる抗体でさえ制限を受けることもしばしばである。その中で、最近ではTH-GFPマウスのように、遺伝子改変によって個体ごとニューロンを標識したり、シンドビスウイルスのように特定のニューロンに遺伝子を導入、更にはCreマウスを用いてより選択的に目的としたニューロンを標識することが出来るようになった<sup>19)</sup>。こうなると、レーザー顕微鏡による光学顕微鏡レベルの解像度、すなわちより広範囲に、より多様な情報の集積が、電子顕微鏡によるシナプス結合や微細構造の解析に極めて重要となってくる。そのためには一つのニューロン、一つのニューロン種、一つの領域の、より確実な標識と同定を目指さなくてはならないと思う。そうしなければ、様々な技術に翻弄され、目的が曖昧・不明瞭になってしまう気がする。新たな技術革新による検証に晒された時、時代を超え常にレファレンスされ得る所見の取得をめざさなくてははいけない。これは大変なことであるが、“真の生命像は美しい”という形態学の原点を忘れてはならず<sup>21)</sup>、日々努力を重ね、更に解析を進めている。

## 6. 謝辞

本稿で紹介した研究の遂行にあたり、ご助言、ご協力いただいた九州大学・小坂俊夫名誉教授、国際医療福祉大学・小坂克子教授、京都大学・金子武嗣教授、同・古田貴寛准教授、同・日置寛之助教に深甚なる感謝の意を表したい。

## 文 献

- 1) Shepherd G.M., Chen W.R. and Greer C.A.: in Shepherd G.M. (Ed.) *The Synaptic Organization of the Brain* (5<sup>th</sup> ed.), Oxford, 165–216 (2004)
- 2) 樋田一徳: 顕微鏡, 40(1), 20–26 (2005)
- 3) Kosaka, K., Toida, K., Aika, Y. and Kosaka, T.: *Neurosci. Res.*, 30(2), 101–110 (1998)
- 4) Toida, K. *et al.*: *J. Comp. Neurol.*, 392(2), 179–198 (1998)
- 5) Toida, K. *et al.*: *Neuroscience*, 101(1), 11–17, cover image (2000)
- 6) Toida, K.: *Anat. Sci. Int.*, 83, 207–217 (2008)
- 7) Kosaka, T., Kosaka, K., Hama, K., Wu, J.Y. and Nagatsu, I.: *Brain Res.*, 413(1), 197–203 (1987)
- 8) Matsushita, N., Okada, H., Yasoshima, Y., Takahashi, K., Kiuchi, K. and Kobayashi, K.: *J. Neurochem.*, 82, 295–304 (2002)
- 9) 谷口美季, 清蔭恵美, 小林和人, 樋田一徳: 川崎医学, 40(2), 67–75 (2014)
- 10) Kiyokage, E. *et al.*: *J. Neurosci.*, 30(23), 1185–1196, cover image (2010)
- 11) Ozaki, S., Toida, K., Suzuki, M., Nakamura, Y., Ohno, N., Ohashi, T., Nakayama, M., Hamajima, Y., Inagaki, A., Kitaoka, K., Sei, H. and Murakami, S.: *Auris Nasus Larynx.*, 37(5), 575–583 (2010)
- 12) 小林 靖: 顕微鏡, 49(3), 190–197 (2014)
- 13) Shipley, M.T., Halloran, F.J. and de la Torre: *Brain Res.*, 329, 294–299 (1985)
- 14) McLean, J.H. and Shipley, M.T.: *J. Neurosci.*, 7, 3016–3028 (1987)
- 15) Zaborszky, L., Carlsen, J., Brashear, H.R. and Heimer, L.: *J. Comp. Neurol.*, 243, 488–509 (1986)
- 16) Furuta, T., Tomioka, R., Taki, K., Nakamura, K., Tamamaki, N. and Kaneko, T.: *J. Histochem. Cytochem.*, 49, 1497–1507 (2001)
- 17) 金子武嗣: *Acta Anatomica Nippon.*, 83 (suppl.), p. 119, S20–4 (2008)
- 18) 清蔭恵美, 野津英司, 赤木貴彦, 樋田一徳: 顕微鏡, 46(2), 132–136 (2011)
- 19) Suzuki, Y., Kiyokage, E. and Toida, K.: *J. Comp. Neurol.*, 523, 262–280 (2015)
- 20) 鈴木良典, 清蔭恵美, 樋田一徳: 川崎医学, 40(2), 89–102 (2014)
- 21) 樋田一徳, 中村桂一郎: 顕微鏡, 46(4), 277–288 (2011)