生きた動物の脳神経活動の光学的計測

井濃内 順

農林水産省蚕糸・昆虫農業技術研究所生体情報部神経生理研究室

〒305-8634 茨城県つくば市大わし 1-2

TEL 0298-38-6104 FAX 0298-38-6028

E-mail inouchi@nises.affrc.go.jp

Optical imaging of neural activity in the *in vivo* brain

Jun INOUCHI

Laboratory of Neurophysiology, Department of Insect Physiology and Behavior,

National Institute of Sericultural and Entomological Science

1-2 Ohwashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8634, JAPAN

要 旨

従来の微小電極を用いる神経生物学の手法に加えて、近年さまざまな新しい研究手法が脳科学分野の研究に導入されてきている。高い空間的・時間的解像度を有する光学的計測法による神経活動のイメージングもその一つである。この手法は、神経細胞の樹状突起での情報の統合やシナプス機能の解明、さらに脳の各領域の機能的構造や異なる脳領域間の協調的活動の研究に有用である。生きた動物の、特に自然な刺激による、脳神経活動をこのイメージング技術を用いて解析し、固体レベルで脳機能を明らかにしようとする研究が進展してきている。

キーワード：光学的計測、膜電位イメージング、 Ca^{2+} イメージング

Abstract

Recently various and new research methods in addition to the technique of the neurobiology using conventional micro-electrode have been introduced into the research of the brain science field. The imaging of the neural activity by optical measurement method with high spatial and temporal resolution is also the one. This technique is useful for studying the mechanisms of synaptic integration in the dendrite of neuron, the functional organization and the correlate activity between different regions in the brain. Recent progress in understanding the principles and mechanisms of brain function is provided important contributions by optical imaging of naturally evoked dynamic response patterns in the intact brain *in vivo*.

Key words : optical imaging, population voltage imaging, population calcium imaging

はじめに

脳を構成する神経細胞は情報を処理する素子である。従来、その素子としての神経細胞の電気的活動や神経細胞間のシナプス結合は、電気生理学的手法で解析され、詳細な知見が蓄積されてきた。脳においては機能と構造が密接に関係しており、実際には多くの神経細胞集団間の協調動作によって情報処理が行われている。脳における情報の符号化や翻訳を理解するためには、複数の神経細胞の空間的・時間的な活動パターンを記録し、解析することが重要となる。しかし、電気生理学的手法だけでは同時にごく少数の神経細胞からしか電気的活動を記録できないので、空間的な広がりのある神経活動をとらえることは困難であった。近年、生きた動物の脳で複数の神経細胞の空間的・時間的な活動パターンをとらえることができるイメージング技術が発達し、情報の脳内表現という脳機能の基本的な問題を光を使って計測し、解析できるようになってきた。

本稿では、電位感受性色素や Ca^{2+} 感受性色素などのケミカルプローブを用いた脳神経活動の光学的計測法の基礎にふれたのち、生きた動物の脳機能の計測例として昆虫脳の嗅覚系での神経活動のイメージング例を紹介する。

1. 膜電位感受性色素を用いた脳神経活動の光学的計測法

1.1 測定原理

神経細胞の電気活動の光学的計測法は、膜電位に感受性をもつ色素で細胞を染色し、膜電位変化を蛍光や吸収など光学的シグナルに変換して記録する方法である。その光学的変化と膜電位変化の時間経過と形状がほぼ同じで、さらに両者の大きさの間には近似的に直線関係が成り立つことが示されている。膜電位感受性色素による神経活動の

計測法はこの原理を基盤としている。

1.2 膜電位感受性色素

膜電位感受性色素には、膜電位変化に対する高い時間応答特性を持つfast-response dyeとゆっくりとした応答を示すslow-response dyeがある。神経細胞の電気活動をとらえるには、fast-response dyeが用いられる。よく用いられる膜電位感受性色素としては蛍光色素RH414, RH795, di-4-ANEPPSなど、吸光色素としてはRH155などがある。これらの色素はMolecular Probes社から入手できる。

1.3 染色法

色素は生理的塩溶液、ジメチルスルホキシド(DMSO)などに溶かした濃度の高い溶液を分注し、これを超低温冷凍庫に保存し、使用直前に生理的塩溶液で希釈して用いる。脳スライス標本などの神経組織は吸光色素を溶かした生理的塩溶液中に標本を浸して染色し、その後余分な色素を洗い流す。生体内の脳から測定する場合、表面を蛍光色素で染色後、余分な色素を洗い流す。濃度や染色時間は試料や色素によって異なり(0.1~3 mg/ml, 室温で数分~数時間)、個々の試料で検討しなければならない。染色中は、色素の退色を避けるために遮光するようにする。

1.4 計測システム

計測装置は、光学系(光学顕微鏡、光源)、カメラとそのコントローラ、信号処理装置、コンピュータなどからなる。

(1) 光学系

光学系としては明るいことが、もっとも重要な条件となる。光学系が明るければ試料にあてる光量が少なくすみ、得られる光シグナルの検出能力を上げることができる。光学顕微鏡は、それぞれの光学的計測の対象となる摘出標本、スライス標本、生体内の脳皮質などの観察に適したものを

準備する。光量の損失につながる光路中の要素は可能な限り取り除く。また、光路にはシャッターを組み込み、データを取るときや試料にピントを合わせるとき以外には、試料に照射光が当たらないようにし、試料の保護と色素の無用な退色を防ぐようにする。対物レンズは倍率が同じであれば開口数の大きな、できるだけ明るいレンズを選択する。励起用（バンドパス）フィルターは、十分な光量を得るため透過率が高く、透過波長の範囲の広いものを選ぶ。光源としては、一般的にタングステンハロゲンランプ（150W～330W）が用いられている。光量が多いほど得られる像は明るくなるが、あまり強い光の照射は色素の退色を早めたり、試料の活性に影響を与えるので注意が必要である。光源は直流安定化電源で点灯して、雑音を少なくする。

(2) 光検出器

電気活動を多数の領域から同時に記録できる、16×16素子のフォトダイオードアレイを受光素子とするカメラをもつ計測システムや128×128素子のMOS型イメージセンサをもつ計測システム、CCDカメラを用いた計測システムが入手可能である。これらのシステムには、信号を取り込むコンピュータの他、信号の取り込み、刺激のタイミング、シャッターの開閉をコントロールするための電気刺激装置などが必要である。

(3) その他の注意点

データを得るためには、光源はもちろん、部屋の照明、ごくわずかな振動、コンピューターなどのノイズを取り除くことが必要である。

2. Ca^{2+} 感受性色素を用いた脳神経活動の光学的計測

2.1 測定原理

Ca^{2+} が結合することにより Ca^{2+} 感受性色素に起こる蛍光シグナルなどの特性の変化を検出して、細胞内遊離 Ca^{2+} の濃度レベルを間接的に計測する方法である。生理的な範囲での Ca^{2+} 濃度の変動と Ca^{2+} 感受性色素によるシグナル特性の変化との間には直線的な関係がある。神経細胞がシナ

プス入力を受けると、さまざまな電気的な応答を示すとともに、細胞内情報伝達のセカンドメッセンジャーとしての Ca^{2+} 濃度が上昇するので、この Ca^{2+} 濃度の変動を計測することにより、神経細胞から神経細胞への信号伝達やその伝達効率の変化（学習・記憶の細胞レベルでのメカニズムと考えられている）を細胞レベルや神経回路レベルで解析することができる。

2.2 Ca^{2+} 感受性色素

細胞内遊離 Ca^{2+} の動態を可視化するために用いられる蛍光プローブは、 Ca^{2+} の選択的キレート剤に蛍光物質を化学結合させたもので、 Ca^{2+} が結合すると蛍光特性（蛍光波長や蛍光強度）が変化する。おもな蛍光プローブとしては、fura-2（2波長励起1波長蛍光）、indo-1（1波長励起2波長蛍光）、fluo-3やCalcium Green 1（1波長励起1波長蛍光）などがある。そして、fura-2に代表される色素では2つの波長の異なる励起光での画像間で比を取り、indo-1の場合では1波長で励起して出てくる2波長の画像間で比を取ることににより、 Ca^{2+} の正確な濃度変化を2次元で表示することができる。これは Ca^{2+} 測定に不可欠な処理法であり、レシオイメージング（画像間割り算）法と呼ばれる。ただし、高速に神経活動を観察することを目的とする場合、波長を切り替えている間のデータと取りこぼしをしないために、1波長励起1波長蛍光測定法が用いられる。これらの色素はMolecular Probes社、同仁化学研究所から入手できる。

2.3 染色法

蛍光プローブは不特定多数の神経細胞を染色する場合、蛍光プローブのカルボキシル基をエステル化したアセトキシメチル誘導体（AM体）を用いて膜透過性を高めた細胞内に導入する。細胞内に入ると細胞内のエステラーゼで分解されてもとのキレートの形にもどる。また、特定の細胞に Ca^{2+} プローブを導入する場合には、エステル化していない色素を微小電極やパッチ電極で直接導入する。この方法では、組織全体として活動するときに、特定の細胞がどのように活動するのかを

測定することができる。

色素は生理的塩溶液、DMSOなどに溶かし、分注したものを、超低温冷凍庫に保存し、使用直前に生理的塩溶液で希釈して用いる。染色は、色素を溶かした生理的塩溶液中に生体から切り出された切片や培養細胞を浸した後、余分な色素を洗い流す。濃度や染色時間は試料や色素によって異なる (3~50 μ M, 室温で20分~1時間)。染色は、やはり色素の退色を避けるために試料を遮光して行う。

2.4 計測システム

一般に計測装置は、光学系 (蛍光顕微鏡、フィルター切替え装置、光源)、カメラとそのコントローラ、画像処理装置、コンピュータなどからなる。

(1) 光学系

試料によって正立型あるいは倒立型の蛍光顕微鏡を用いる。光源には水銀ランプ、キセノンランプ、ハロゲンランプ、メタルハライドランプ (50~330W) やレーザーなどが用いられる。これらは、雑音を取り除くための光源用電源で点灯する。励起用フィルターとしては、十分な光量を得るため透過率が高く、透過波長の範囲の広いものを選ぶ。対物レンズは開口数の大きな、蛍光用のレンズを選択する。光量の損失につながる光路中の要素は可能な限り取り除く。また、データ取得や試料観察以外には、励起光をシャッターで遮断し、蛍光の退色を防ぐようにする。

(2) 光検出器

Ca^{2+} 測定では、SIT (Silicon Intensified Target) カメラ、I-CCD (Intensified CCD) カメラや冷却型CCD (Cooled CCD) カメラ、さらに共焦点レーザー (Confocal laser) 顕微鏡などのシステムが用いられている。SITカメラ、I-CCDはビデオレート (30Hz) で動作するが、冷却型CCDカメラは低ノイズ、高ダイナミックレンジで任意の時間での呼び出しが可能である。共焦点レーザー顕微鏡は細かく絞ったレーザー光によって色素を励起し、焦点前後の迷光を検出するので他のカメラに無いZ軸解像をもち、空間解

像度の高い Ca^{2+} イメージング像が得られる¹⁾。さらに、新しい光学系として2光子レーザー走査 (Two Photon laser scan) 顕微鏡が注目されている²⁾。2光子レーザー走査顕微鏡は共焦点レーザー顕微鏡に比べて、低光散乱で明るい像が得られる、試料の深い場所の信号を検出できるという利点などがある。その他、膜電位光計測に用いられるMOS型イメージセンサをもつ計測システムも Ca^{2+} イメージングに応用することが可能である。用途に応じてこれらから選択する。

(3) その他の注意点

Ca^{2+} イメージングにおいても、光学系と試料の振動や装置からのノイズを取り除くことが重要である。

3. 計測例

(1) 膜電位感受性色素を用いた昆虫の触角葉神経活動の計測

雄ワモンゴキブリ (*Periplaneta americana*) 生体内の脳の神経活動を画像計測装置 (富士フィルムHRデルタロン1700) で測定した例を紹介する^{3, 4)}。

1) 頭部クチクラを部分的に開けて、脳を露出し、鞘皮を除き、これに蛍光色素 (RH414あるいはRH795) の溶けた生理的塩溶液 (3 mg/ml) を滴下して30分間染色する。染色後、生理的塩溶液で洗浄し余分な色素を除く。

2) 落射型蛍光顕微鏡の対物レンズの下に染色した脳が位置するようにゴキブリを固定し、触角神経に吸引電極を取り付けたのち、触角葉部位に焦点を合わせる。

3) 対物レンズで拡大した実像をつくり、この実像面上に高速カメラのMOS型イメージセンサを置く。

4) 電気刺激装置を用いてシャッターを開き、光を照射した状態で背景となる画面を取り込む。次に、触角神経に脱分極方向の矩形波電流刺激を与え、背景画面との差分画像を増幅し、0.6msごとにフレームメモリに取り込む。画面内のランダムノイズを低減させるために、アベレーシング

図1 雄ワモンゴキブリ脳の模式図

触角葉には約125個の糸球体が存在し、雄だけにみられる1個の大きな糸球体 (MG: 大糸球体) は性フェロモン情報を中継・処理することが知られている。触角葉での匂いの情報は、出力神経細胞によって糸球体から触角脳経路 (ACT) を経て、前大脳の側葉 (LP) とキノコ体の傘部 (Ca) に伝達される。AN: 触角神経, OG: 小糸球体, OL: 視葉。

図2 膜電位感受性色素を用いた雄ワモンゴキブリ触角葉における神経活動の光学的計測

A. 触角葉 (AL) の構造。AN: 触角神経, MG: 大糸球体, OG: 小糸球体, PC: 前大脳。

B. 触角神経の電気刺激によって、触角神経、大糸球体、小糸球体部位に誘導された光シグナルの経時変化。

(時間平均) を例えば8画面程度行い、結果を見て必要なら変更する。

5) 装置に付属した表示機能をもつソフトウェアと自作のソフトを併用して、各素子で得られた応答蛍光シグナル (dF/F) にカラーコードを割り付け疑似カラー表示して、光学的応答の時空

間パターンを解析する。

触角葉は昆虫の嗅覚系1次中枢で脊椎動物の嗅球に相当し、ともに嗅受容細胞と1次中枢の神経細胞とがシナプスを形成する球状のニューロパイル構造 (糸球体: Glomerulus) を構築するという点でよく似ている。雄ワモンゴキブリでは125

図3 触角葉で生じた蛍光強度の経時変化

上の挿入図の四角で囲った脳部位を計測した (スケール: $400\ \mu\text{m}$)。触角神経の電気刺激によって、脳電位感受性色素 (RH414) で染色した触角葉および触角神経の各点に生じた蛍光強度の経時変化を示している。右側のパネルは、コントロールからPTX処理下の経時変化を減算することにより、興奮性応答 (実線) と抑制性応答 (点線) に分離できることを示している。

個の糸球体構造が存在し、そのうちの1個は雄に固有な大きな糸球体 (大糸球体: MG) で、残りは小糸球体 (OG) と呼ばれる (図1, 図2A)。触角葉でみられる神経活動は嗅受容細胞と糸球体の局所介在神経細胞および出力神経細胞の複合活動電位と複合後シナプス反応から成る。われわれの研究室では、図2Bに示すように、膜電位感受性色素RH414を用いて雄ワモンゴキブリの触角神経への電気刺激 (2.5mA) によって、触角神経 (AN)、触角葉の大糸球体および小糸球体のそれぞれの部位に出現する光シグナル応答を記録

することに成功した。通常、大糸球体および小糸球体では脱分極性の応答 (上向きのシグナル) とそれに続く過分極性 (下向きのシグナル) の応答からなる一定の活動パターンが観察される。抑制性の神経伝達物質 γ -アミノ酪酸 (GABA) の拮抗剤であるピクロトキシン (Picrotoxin: PTX) を含むリンガー液を還流すると、大糸球体 (図3e, f) と小糸球体 (図3g, h) の部位で脱分極性の波形成分の時間幅が増大し、過分極性の波形成分が減衰した。さらに、嗅受容細胞軸索の終末近傍がある触角神経部位 (図3b, c, d) では、脱分極性の波形成分の振幅と時間幅が増大した。コントロールからPTX処理下の波形を減算すると、嗅受容細胞と糸球体の局所介在神経細胞および出力神経細胞の複合活動電位と複合シナプス成分であるGABA作動性の局所介在神経細胞の反応を分離することができた。また、 Ca^{2+} -freeのリンガー液で処理して化学シナプスを阻害することにより、興奮性の複合活動電位成分のうち遅い成分を特異的に抑制することができた。これは、早い成分は触角神経繊維から生じた複合活動電位であり、遅い成分は触角葉糸球体の神経回路網で生じた複合活動電位であることを示している。これらの結果から、局所介在神経細胞および出力神経細胞の複合活動電位をGABA作動性の局所介在神経細胞がフィードバック的に抑制することが示唆された (図4)⁴⁾。

このように、膜電位感受性色素による光学的計測法と薬理学的手法を併用することにより、触角葉における興奮性および抑制性の応答の時空間的なマッピングが可能となった。

(2) Ca^{2+} 感受性色素を用いた昆虫の触角葉神経活動の計測

Ca^{2+} 感受性色素と画像計測装置 (富士フィルムHRデルタロン1700) とを用いて、雄ワモンゴキブリ脳の神経活動を測定する方法を次に紹介する³⁾。

1) 固定したゴキブリの脳を露出して、鞘皮を除き、ガラス微小電極で生理的塩溶液に溶かした色素Calcium Green-1 AM ($40\ \mu\text{M}$) を触角葉

図4 膜電位感受性色素を使った光学的計測法で明らかにされた触角葉の神経回路

EPrS: 興奮性前シナプス, IPrS: 抑制性前シナプス, PoS: 入力を受ける側のシナプス, GABAergic INs: GABA作動性介在神経細胞, PNs: 出力神経細胞, RNs: 嗅受容細胞神経繊維, ACT: 触角葉脳経路。

図5 触角葉の匂い応答のイメージング

触角への匂い刺激によって、Calucium Green-1 AMで染色した触角葉（点線で囲まれた部分）に生じた興奮のイメージ。食物に含まれる匂い成分1-Hexanolは小糸球体群に、雌の性フェロモン成分Periplanone-Bは大糸球体に、それぞれ興奮を誘発した。1-Hexanolに対する応答は2秒以内に終了したが、Periplanone-B刺激に対する応答は4秒以上持続した。この2種類の匂いは空間的にも時間的にも異なる興奮パターンを引き起こすことがわかる。

黒い部分: 蛍光強度変化0.045%以上; 実線で囲まれた白い部分: 蛍光強度変化0.03%以上。スケール: 150 μm

に圧注入して染色する。

2) 落射型蛍光顕微鏡の対物レンズの下に染色した脳を置き、位置するようにゴキブリを固定し、触角葉に焦点を合わせる。

3) シャッターを開き、励起光を照射して背景となる画面を取り込む。

4) 6秒間の差分画像の取り込み（6.5フレーム/秒）開始2秒後に、匂い刺激を200ミリ秒間（流速400 ml/s ）触角に与える。ノイズ処理のた

め、4回のアベレージングとビンニング（空間平均）を4×4画素行う。

5) 装置に付属した表示機能をもつソフトウェアと自作のソフトを併用して、各素子で得られた応答蛍光シグナル（ dF/F ）にカラーコードを割り付け疑似カラー表示して、光学的応答の時空間パターンを解析する。

蛍光指示薬を用いた Ca^{2+} 濃度の計測は、 Ca^{2+} 濃度の情報だけでなく興奮部位の特定にも応用で

図6 異なる匂刺激によって触角葉に生じる興奮の空間的パターン

食物に含まれる種類の違う匂物質による刺激は、触角葉（点線で囲まれた部分）に空間的に特異な興奮パターンを引き起こした。

黒い部分：蛍光強度変化0.045%以上；実線で囲まれた白い部分：蛍光強度変化0.03%以上。スケール：80 μ m

きる。以下に匂刺激によって触角葉に生じる興奮の広がり解析したわれわれの研究例を紹介する^{5, 7)}。

図5は、触角への匂刺激によって雄ワモンゴキブリ触角葉に生じた匂応答の空間的パターンをイメージングしたものである。雌の性フェロモン成分のひとつであるPeriplanone-Bの刺激により、大糸球体部位に特異的に匂応答が現れた。一方、食物の匂成分である1-Hexanolの刺激では小糸球体群の存在する領域に匂応答が現れた。この結果は、性フェロモンの情報は糸球体で、一般的な匂物質から成る食物の匂の情報は小糸球体の領域でそれぞれ別個に処理されることを示している。また、異なる種類の食物の匂刺激に対しては、応答が出現する触角葉の範囲には重複がみられるが、

空間的な応答パターンは匂物質間で異なっていた（図6）。この結果は、食物などの匂いは、触角葉小糸球体群に空間的に特異な活動パターンを引き起こし、活性のある特定の一群が、組み合わせ方で匂に対応していることを示している。さらに、食物の匂成分の混合刺激は個々の匂刺激に対する応答を単純に足し算したものではなく、空間的に特異的な応答パターンを引き起こすという結果を得ている（未発表）。これは、混合された匂の情報が一つの匂の情報として脳内で別個に表現される可能性を示唆している。

さらにわれわれの研究室では、抑制性の神経伝達物質GABAの拮抗剤であるピクロトキシン（PTX）を含むリンガー液を還流すると、異種の単一の匂いや異なる組み合わせの混合物質に対す

る匂応答の空間パターンの類似性が高くなることを見出している (未発表). これは, 匂刺激による触角葉の応答パターンの形成にGABA作動性の局所介在神経細胞が重要な役割をしていることを示唆している. 昆虫の触角葉と同様に糸球体を構築する脊椎動物の嗅球でも光学的計測法を用いた解析が行われており, 個々の匂物質が嗅球を特異的なパターンに活性化することを知られている^{8, 9)}. このことは, 脊椎, 無脊椎動物を問わず, 組織学的に類似な嗅覚系1次中枢では, 共通な嗅覚情報処理メカニズムが存在し, 匂物質の組み合わせの情報を一群の糸球体の匂応答の空間パターンに翻訳する, すなわち匂いの質の識別をしている可能性を示すと考えられる.

4. おわりに

神経活動の光学的イメージングでは組織の, どこに, いつ, どのような大きさ, 極性の神経活動が現れるのかを知ることができる. これは脳神経活動の空間的・時間的な情報を解析できる光学的計測法の最大の利点である. ただし, 光学的計測法にも短所がないとは言えない. それは, 膜電位感受性色素によるイメージングの場合, 電位的な神経活動を光に変換するので得られる光シグナルの信号/雑音比 (感度) は決して高くはないので生きた動物の脳での自然刺激による神経活動の計測が十分にできないという点, また膜電位や Ca^{2+} イメージングで得られる脳の光シグナル応答は個々の画素のカバーする領域に含まれる神経細胞の総和であり, 光学的応答の由来を明らかにすることが一般的には難しい点である. したがって, 光学的計測を行う場合, 必要に応じて高い感度で神経細胞の電気的活動を検出できる電気生理学的手法などと組み合わせた実験を行うことが望まれる.

光による脳機能の非侵襲計測は, 機能と関連した生理学的な過程を光の信号に変換するプローブやそれを検出する光学系の開発など, 新しい技術の導入とともに進展してきている. 本稿で紹介したわれわれの研究室での, 昆虫の脳機能のイメー

ジングもこれらの技術の導入によって行うことができたものである. 脳科学の研究に, 今後さらに新しい計測技術が開発, 導入され, 情報の脳内表現という脳機能の基本的な問題を明らかにできることを願ってやまない.

参考文献

- 1) Müller W, Conner JA : Dendritic spines as individual neuronal compartments for synaptic Ca^{2+} responses. *Nature*, 354 : 73-76, 1991
- 2) Maletic-Savatic M, Malinow R, Svoboda K : Rapid dendritic morphogenesis in CA1 hippocampal dendrites induced by synaptic activity. *Science*, 283 : 1923-1927, 1999
- 3) 井濃内 順, 藍 浩之 : 昆虫の脳神経活動のイメージング. *比較生理生化学*, 13 : 48-55, 1996
- 4) Ai H, Inouchi J : Spatial and temporal analysis of evoked neural activity in optical recordings from American cockroach antennal lobes. *Neurosci. Lett.*, 216 : 77-80, 1996
- 5) Van der Goes van Naters WM, Inouchi J : Odour-evoked, spatial neural activity patterns in the deutocerebrum of *Periplaneta americana*. *日本味と匂学会誌*, 5 : 553-556, 1998
- 6) Inouchi J, Van der Goes van Naters WM : Spatial coding of odor mixtures in the antennal lobes of the cockroach *Periplaneta americana*. *Absr. Soc. Neurosci.*, 24 : 911, 1998
- 7) Inouchi J, Van der Goes van Naters WM : Distributed neural activity in antennal lobes of *Periplaneta* on stimulation with odors : Effects of the GABA blocker picrotoxin on spatial patterns. *Absr. Soc. Neurosci.*, 25 : 125, 1999
- 8) Cinelli AR, Hamilton KA, Kauer JS : Salamander olfactory bulb neuronal activity observed by video rate, voltage-sensitive dye imaging. III. Spatial and temporal properties of responses evoked by odorant stimulation. *J. Neurophysiol.*, 73 : 2053-2071, 1995
- 9) Rubin BD, Katz LC : Optical imaging of odorant representations in the mammalian olfactory bulb. *Neuron*, 23 : 499-511, 1999