

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500418

研究課題名(和文) 高次脳中枢による嗅球シナプス神経回路の遠心性調節

研究課題名(英文) Structural basis for centrifugal regulation of synaptic circuit in the olfactory bulb

研究代表者

樋田 一徳 (Kazunori, Toida)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：40253405

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、嗅球神経回路の調節機構の解明を目的として高次脳中枢からの遠心性入力に着目し、シナプス結合を含めた詳細な微細構造解析を行なったものである。解析の結果、セロトニンニューロンの単一細胞標識を可能とし、縫線核から嗅球へ至る全投射経路が明らかとなったこと、シナプス結合の解析からシナプス後膜の肥厚の乏しい非対称性シナプスを形成すること、この非対称性シナプスが嗅球の異種のニューロン群に同時にシナプスしていること、グルタミン酸を伝達物質にする可能性、セロトニン受容体がシナプス部とやや離れて存在することがわかった。このことからセロトニンニューロンが神経回路賦活の機能を発現することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Olfactory bulb (OB) is an attractive region for analyzing neural circuit in the brain. It has been so far well-examined with special focus on interneurons in the OB. Recent progress in neuronal labeling and biological application by newly developed microscopes enable to reveal long-distance projection neuron from other brain regions to the OB as centrifugal input, which have not been analyzed for overall morphology becoming structural basis for understanding regulatory function to the OB neural circuit. Using combination of transgenic mice, genetic induction by viral vectors, multiple immuno-labeling, correlative laser and electron microscopies, digital tracing of a single neuron, and electron tomography, we have analyzed centrifugal regulation to the OB neural circuit and revealed significance of presence of synapse as regulatory inputs to the OB from other brain regions. We further propose some possibilities in future analyses to be structural basis for neural circuit functions.

研究分野：神経解剖学

キーワード：神経回路 嗅球 セロトニン 遠心性調節 シナプス 単一ニューロン標識 デジタルトレース 電子線トモグラフィ

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 学術的背景：嗅球の構造的・機能的特徴、研究代表者が抱いた疑問と解析結果

嗅覚の一次中枢嗅球は、情報の入力と出力の伝達経路が独立し、また比較的少数のニューロン種による単純明瞭な層構造に、豊富な生理活性物質を含有するという特徴を有することから、脳神経回路の基本的な構造と機能を理解するための魅力的な解析モデルと考えられている。

1990年代初めのAxelらの解析をはじめとした研究によって嗅受容細胞の匂い分子受容体遺伝子がクローニングされ、同じ遺伝子を発現する嗅受容細胞からの軸索は嗅球表層の糸球体に特異的に収束することがわかった(2004年ノーベル医学生理学賞)。特定な匂い刺激に対し特定な糸球体が反応することから糸球体は嗅覚の機能的構造単位と考えられるようになった。

注目すべきは、無数の嗅受容細胞(マウスで数百万)が少数の嗅球糸球体(マウスで約2千個)に特異的に収束した後、より多数の投射ニューロンにシナプス結合し、高次中枢に匂い情報を伝えるという解剖学的な収束・開散パターンである。このことは、無数の化学的刺激源によってもたらされる嗅覚情報が一旦糸球体でいわば圧縮・解凍される、複雑な匂い情報を処理する精巧な神経回路が嗅球に存在すると推測される。しかし嗅球神経回路について一般的に信じられていた従来の定説は極めて単純で、分子レベルの嗅覚受容メカニズムを十分説明できるものではなかった。このため申請者らは、より確度の高いニューロンの同定に基づいたシナプス神経回路の解明の必要性を感じ、これまで一貫して電子顕微鏡による三次元構造解析を行ってきた。その結果、嗅球を構成するニューロンは化学的性質と形態的特徴の面で極めて多様であり、化学的・形態的に同定された異種のニューロンはまた異なるシナプス結合を形成することが明らかとなった(Toida, Anat. Sci. Int. 2008)。研究代表者らの形態学的知見は、専門書(“Rat Nervous System” Paxinos 2004; “The Synaptic Organization of the Brain” Shepherd 2004)に引用され、また多様なシナプス結合を形成するニューロンは機能的にも異なる役割を神経回路内で演じていることが示唆され、多様な嗅球ニューロン種の個別の電気生理学的・薬理学的特性の同定が進んだ。(Hayar J. Neurosci. 2005, Kiyokage J. Neurosci. 2010 他)

### (2) 着想に至った経緯：一連の解析により提起された更に解明すべき課題

一連の解析を経た研究代表者の焦眉の課題は、未同定のニューロン種からのシナプス結合である。ラット嗅球介在ニューロンには、嗅受容細胞の他、投射ニューロン及びGABAニューロンの樹状突起から様々なパターンで入力を受けるが、この他

に、豊富な球形小胞と少数の有芯性小胞を含む軸索様構造から様々な程度の非対称性シナプス結合を受けるのがしばしば観察されるが、現時点に至るまでこれらのがどのような細胞種かは不明である(Toida, Anat. Sci. Int. 2008)。

一方、嗅球には高次中枢からの遠心性入力が存在することが以前よりわかっている。即ち、セロトニン(縫線核より)、アセチルコリン(対角束核より)、ノルアドレナリン(青斑核より)のニューロン群である。これら遠心性成分の嗅球内の線維分布と受容体の存在は報告されているが、それぞれのタイプの嗅球ニューロンとどのようなシナプス結合を形成しているのかは十分解析されておらず、従ってその機能的意義も推測の域に留まっていると言わざるを得ない。

そこで、これら遠心性入力が、前述の申請者の解析で未同定であった入力成分に相当するのではないか?と着想した。これは下記のような予備的実験とその結果に基づいたものである。

### (3) 着想に至った経緯：予備的実験による検討と推測

#### ～予備的実験1：嗅球スライス実験～

申請者は、日米科学技術協力事業及び科学研究費補助金の助成を受け(後掲)、米国メリーランド大学のShipley教授らとの共同研究を行ってきたが、この間のパッチクランプ用の嗅球スライス実験においてセロトニンを投与すると、解析を行っていたGABAニューロン及び自発的バーストを示すexternal tufted cell (ET cell)が興奮する所見を得た(Shipley未発表データ)。

#### ～予備的実験2：嗅球局所電位(Local Field Potential; LFP)～

セロトニンは覚醒時に産生が高まり、逆に睡眠中は産生が抑制されREM睡眠中では産生されないという概日リズムがある。このためアレルギー鼻炎マウスの嗅覚障害を検証した際に(Ozaki S., Toida K. et al 2010)、24時間連続LFP記録を行なったところ、覚醒期から睡眠期に電位波形が変化し、特にREM睡眠時に著明に振幅が極めて小さくなった(Ozaki, Toida未発表データ)。

#### ～予備的実験3：セロトニンニューロンの形態解析～

上記の結果からセロトニンニューロンが嗅球シナプス神経回路の調節に深く関わっていると考え、形態学的な予備的解析を行なった。その結果、セロトニンニューロンはこれまで申請者がシナプスを同定してきた嗅球ニューロン群に密接することが三次元レーザー顕微鏡解析で(Toida, Anat. Sci. Int. 2008)、またmitral/tufted cellsに多様な膜対称性を示すシナプス結合を形成することがランダム電顕解析で認められた(Toida; 2007年日本解剖学会総会)。

## 2. 研究の目的

以上の背景から、本研究は、嗅球シナプス神経回路の調節機構の解明を目的として、申請者の一連の解析知見と予備的実験に基づき、高次脳中枢からの遠心性入力に着目し、神経回路の調節に密接に関わっていると考えられる遠心性入力、シナプス結合を含めた詳細な微細構造解析を行なうものである。複雑な匂い情報を処理する嗅球シナプス神経回路をより正確に深く理解する為に、一連の研究を発展的に展開し、脳神経回路の基本的構造と機能を多角的且つ正確に理解する為に、嗅覚神経回路の微細構造レベルでの確かな形態学的基礎を構築することが本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

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、目的のセロトニンニューロンの起始核である縫線核にカニューレを挿入し、微小注入器によってシンドビスウイルスを注入した。注入後に頭皮を縫合して覚醒させ、数日間の生存後に固定液で灌流固定する。灌流固定後に脳を取り出し、数時間同固定液で浸漬固定した後、ピプラトームで50 $\mu$ m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。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(樋田他 顕微鏡, 2015 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(樋田他 顕微鏡, 2015 図4B)スライドガラス上にエポン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。そして次のスライス内でトレースを継続する。そのスライスを越えたトレースの連続によって、やがて嗅球に至る全経路がトレースできる訳である(樋田他 顕微鏡, 2015 図4C-E)。この他、免疫組織化学法、用いた抗体、単一ニューロン標識法、遺伝子改変動物とウイルスベクター注入法、デジタルトレース、レーザー顕微鏡法、免疫電子顕微鏡法(多重&光顕・電顕組み合わせ)、多重蛍光標識法、統計処理、電子線トモグラフィ法など、本研究で用いた手法の詳細は、Suzuki Y. et al, J. Comp. Neurol. 523: 262-280, 2014、及び鈴木他 川崎医学会誌 40(2): 89-102, 2014(電子線トモグラフィ法)に記載している。

## 4. 研究成果

### (1)遠心性調節について

嗅球神経回路の調節系として、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。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。すなわち、青斑核からのノルアドレナリンニューロン、縫線核からのセロトニンニューロン、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、horseradish 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。

### (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; シンドビスウイルス)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 (Furuta et al, J. Histochem. Cytochem. 2001)。この方法の神経科学史上の位置づけは防衛医科大学校の小林靖教授の解説にわかりやすく述べられているが (小林靖 顕微鏡 第 49 巻 3 号 2014)、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。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。金子教授及び金子教授研究室との連携研究へ発展した端緒である。

### (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 (Suzuki Y. et al, 2014 Fig. 1、鈴木他 川崎医学誌, 2014 図 2)。これによって、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 (Suzuki Y. et al, 2014 Fig. 2-4, Table 2、樋田他 顕微鏡, 2015 図 2)。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 (嗅球系球体層) 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、シンド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 (Suzuki Y. et al, 2014 Fig. 5、樋田他 顕微鏡, 2015 図 4)。

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、経路も明らかとなる。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投射しているようであるが (Suzuki Y. et al, 2014 Fig. 5、樋田他 顕微鏡, 2015 図 4 D)、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 (Suzuki Y. et al, 2014 Fig. 5、樋田他 顕微鏡, 2015 図 4 C, E)。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。

### (4) 嗅球内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 (Suzuki Y. et al, 2014 Fig. 3, 4、樋田他 顕微鏡, 2015 図 3)。そして系球体では分岐を繰り返して枝を出し、複数の系球体をまたがって走行しているのがわかる (Suzuki Y. et al, 2014 Fig. 3, 4、樋田他 顕微鏡, 2015 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 (鈴木他 川崎医学誌 2015 図 3、4、6)。

研究代表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。(顕微鏡 49 巻 3 号特集) これら新たな解析手法に対し、研究代表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が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ぬ。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りに観察できた (Suzuki Y. et al, 2014 Fig. 8, 9、樋田他 顕微鏡, 2015 図 5 A)。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 (Suzuki Y. et al, 2014 Fig.8, 9、樋田他 顕微鏡, 2015 図 5 B)。

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、セロトニンでもその可能性を検討した結果、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 (Suzuki Y. et al, 2014 Fig.8, 9、樋田他 顕微鏡, 2015 図 5 B)。

学会発表や論文査読の際によく受ける質問は、“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免疫組織化学的に可能である。興味深いこととしては、筆者らの予備的実験 (多重蛍光免疫染色) 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 (樋田他 顕微鏡, 2015 図 6 ; オリジナル未発表所見)。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。

(5)セロトニンニューロンの嗅球神経回路への調節

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。これは海外連携研究者らによる In Vitro 生理学的実験結果を支持するものである。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 (Liu S. J. Neurophysiol. 2012)。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。

(6)今後の展望

交付を受けた 3 年間で、嗅球シナプス神経回路へ遠心性入力するニューロンのうち、予備実験データをもつセロトニンニューロンに注目して焦点を絞り、三次元構造とそのシナプス結合の定量解析を行ない、遠心性調節の機能的意義を明らかにすることができ、論

文及び学会にて発表する事ができた。更に期間後半より、他の遠心性入力成分、特にアセチルコリンニューロンについても予備的実験も開始し、既に結果が出て学会発表を行っている (濱本他; 2015 年日本解剖学会総会)。

近年脚光を浴びる嗅覚系研究領域で、国際的にも遂行する者がいない電子顕微鏡連続切片再構築法により、分子レベルの解析前に提唱された神経回路の定説を大幅に修正している。当該研究は、独自の解析法を更に発展的に遂行する点で、これまで同様に確かな微細構造的指針を嗅覚研究に提示すると考えられ、その意義は極めて大きい。

抑鬱などの精神症状との関係で注目されるセロトニンによる嗅覚系の中枢性制御機構の解明は、(辺縁系、前頭皮質系、間脳・脳幹系などによる) 情動や生体リズムが化学的感覚といかなる関係にあるかを明らかにし、他の脳領域の神経回路メカニズムの解明に寄与すると考え、本研究の発展的継続は様々な観点から重要な意義があると思われる、現在、更に解析を進めているところである。

5. 主な発表論文等 (研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文) (計 9 件 ; 2012 年以降)

(1)野津英司、樋田一徳 (責任著者) ラット嗅球における非 GABA 系介在ニューロンのシナプス結合の微細構造解析 川崎医学会誌, 2015 (in press) (査読有)

(2)徳岡晋太郎、清蔭恵美、樋田一徳 (責任著者) 成体マウス脳における嗅覚系新生ニューロンの遊走に関する三次元構造解析 川崎医学会誌, 2015 (in press) (査読有)

(3)樋田一徳 (責任著者) 清蔭恵美、鈴木良典、浜本真一 嗅球神経回路の調節に関する三次元構造解析 顕微鏡 第 50 巻 1 号, 48-53, 2015 (査読有)

(4)樋田一徳 (責任著者) 清蔭恵美、鈴木良典 電子顕微鏡連続切片再構築によるシナプスの三次元解析 CLINICAL NEUROSCIENCE, 33 巻 6 号, 625-629 (2015) (査読無)

(5)Suzuki Y, Kiyokage E, Sohn J, Hioki H, Toida K. (責任著者) Structural basis for serotonergic regulation of neural circuits in the mouse olfactory bulb. J Comp Neurol. 523:262-280 (2015), 2014 Sep 19. doi: 10.1002/cne.23680. (査読有)

(6)鈴木良典、清蔭恵美、樋田一徳 (責任著者) マウス嗅球神経回路におけるセロトニンニューロンのシナプスの微細構造解析

川崎医学会誌 40 巻 2 号 : 89 - 102 , 2014  
doi : 10.11482/KMJ-J4 ( 0 2 ) 89 ( 査読有 )

(7)谷口美季、清蔭恵美(責任著者)、小林和人、樋田一徳 嗅覚系脳神経回路の解明: 鼻閉モデルマウスを用いた嗅入力遮断効果の解析  
川崎医学会誌 40 巻 2 号 : 67 - 75 , 2014  
doi : 10.11482/KMJ-J4 ( 0 2 ) 67 ( 査読有 )

(8) Kiyokage E, Toida K (責任著者), S-Yamamoto T, Ishimura K.  
Cellular localization of 5 $\alpha$ -reductase in the rat cerebellum. J Chem Neuroanat. 2014 Sep;59:60:8-16. doi: 10.1016/j.jchemneu.2014.04.002. (査読有)

(9)清蔭恵美(責任著者)、野津英司、松野岳志、鈴木良典、樋田一徳  
透過型電子顕微鏡による広範囲モンタージュ撮影と連続切片再構築法を用いた脳神経回路の解析 細胞、第 46 巻 10 (613):44-47 (2014) (査読有)

〔学会発表〕(計 10 件 ; 2012 年以降)

(1)濱本真一、清蔭 恵美、樋田一徳、原田保  
高次脳中枢による嗅覚系神経回路の調節機構: アセチルコリンニューロン  
第 116 回日本耳鼻咽喉科学会総会学術講演会、2015 年 5 月 20-23 日(21 日発表) 於東京国際フォーラム(東京都)

(2)樋田一徳、鈴木良典、濱本真一、松野岳志、野津英司、清蔭 恵美 嗅覚神経回路調節機構の微細構造基盤: 単一 ニューロン標識と電顕連続切片三次元再構築 日本顕微鏡学会第 71 回学術集会、2015 年 5 月 13-15 日(13 日発表) 於国立京都国際会館(京都)

(3)Suzuki Y., Kiyokage E., Toida K.  
Structural basis for serotonergic regulation of neural circuits in the mouse olfactory bulb. 44<sup>st</sup> Annual meeting of the Society for Neuroscience, November 15-19<sup>th</sup> 2014, at Washington DC, USA. (15 日発表)  
(Abstract: Soc. Neurosci. 58.03, 2014)

(4)Matsuno T., Kiyokage E., Toida K.  
Synaptic distribution on single labeled mitral cell in the olfactory bulb.  
第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会、第 92 回日本生理学会大会合同大会 2015 年 3 月 21-23 日(21 日発表) 於神戸国際会議場(神戸)

(5)Hamamoto M., Kiyokage E., Toida K.  
Structure basis for cholinergic regulation in the mouse olfactory bulb.  
第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会、第 92 回日本生理学会大会合同大会 2015 年 3

月 21-23 日(21 日発表)、於神戸国際会議場(神戸)

(6)Suzuki Y., Kiyokage E., Toida K.  
Structural basis for serotonergic regulation of the olfactory bulb neural circuit.  
第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2014 年 3 月 27-29 日(27 日発表)  
於自治医科大学(下野)

(7)Matsuno T., Kiyokage E., Kuramoto E., Toida K.  
Morphological analysis about output control of mitral cell.  
第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2014 年 3 月 27-29 日(28 日発表)  
於自治医科大学(下野)

(8)清蔭恵美、鈴木良典、樋田一徳  
嗅球系球体: 電子顕微鏡連続切片再構築によるシナプス解析  
日本顕微鏡学会第 69 回学術講演会、2013 年 5 月 20-22 日(20 日発表) 阪急エキスポパーク(大阪)

(9)鈴木良典、清蔭恵美、樋田一徳  
高次脳中枢による嗅覚系神経回路の調節経路: セロトニンニューロン  
第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2013 年 3 月 28-30 日(30 日発表)  
於サンポートホール高松・かがわ国際会議場(高松)

(10)清蔭恵美、樋田一徳  
マウス嗅球におけるドーパミンニューロンのシナプス解析  
第 35 回日本神経科学大会、2012 年 9 月 18-21 日(21 日発表) 於名古屋コンベンションセンター(名古屋)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕(出願・取得共に計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等は、現在再構築中。(平成 27 年 7 月 1 日着任人事があるため、平成 27 年 8 月 1 日に更新予定)

## 6. 研究組織

(1)研究代表者  
樋田一徳(川崎医科大学・医学部・教授)  
研究者番号: 40253405

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者  
金子武嗣(京都大学・大学院・教授)  
研究者番号: 90177519