

**マウス聴覚野における  
音誘導フラビンタンパク質自家蛍光応答と  
視床・皮質系入力層神経回路の  
ニコチン性制御**

Nicotinic regulation of tone-evoked flavoprotein autofluorescence responses and neural circuits of thalamorecipient layers in mouse auditory cortex

**2023年9月**

**中西 誠**

# 目次

ページ#	
1	目次
2-3	A. まえがき
4	B. 概要
5-18	C. 第1章：序論
19-28	参考文献
	D. 第2章：
29-72	マウス聴覚野における音誘発性神経活性と活性化領域の皮質内および皮質下ニコチン性制御
29	D-1. 要約
30-32	D-2. 背景・目的
32-36	D-3. 材料・方法
36-41	D-4. 結果
41-49	D-5. 考察
50-59	D-6. 図
60-64	D-7. 補足資料
65-74	D-8. 参考文献
	E. 第3章：
75-107	マウス一次聴覚野第3/4層における視床・皮質系神経回路のニコチン制御
75	E-1. 要約
76-79	E-2. 背景・目的
79-84	E-3. 材料・方法
84-90	E-4. 結果
90-95	E-5. 考察
95-105	E-6. 図
106-111	E-7. 参考文献
112-113	F. 第4章：結論
114-118	H. あとがき
119-143	I. 補足資料

## A. まえがき

2013年の卒業研究開始時から今年で10年を迎えた。意志の弱い私を、指導教員の川井先生は辛抱強く激励し支えてくれ、本論文を完成させるに至った。感謝の言葉は後に述べるとして、博士論文は、私にとって高く険しい道のりであり、この10年間で一つの結実を見ることは感激の至りである。

この10年間、同じテーマであったが実験内容は大きく様変わりした。卒業研究時は、マウス一次聴覚野(AI)における細胞内シグナリングに重要なERK、および神経活性依存的な転写因子であるCREBへのニコチンの影響であった。当初は、先行研究からニコチンが神経活性を増強させると考えていたため、ERKおよびCREBの活性化(リン酸化)が増加すると考えていた。しかしながら、結果的にはERKのリン酸化は増加傾向にあったものの、リン酸化CREBは減少傾向にあり、ニコチンが神経活性に対して抑制的に働いているのでは、という新たな課題が残るものだった。修士課程に入ると、*in vivo*の局所電場電位(LFP)、つまり電極を刺した位置の神経細胞群の電位変化を測定できるようになった。*In vivo*実験の難しさに四苦八苦しながらも、川井先生の先行研究と同じく音応答におけるニコチンの影響を観察すると、やはりニコチンが神経応答を増強させていることは間違いなかった。その中で特に興味深かったのは、AIの第3/4層でのLFPの周期変動(Oscillation)を解析すると、ニコチン投与により、 $\gamma$ 帯域(30-90 Hz)が音応答直後では増加するにも関わらず、音応答前つまり自発性状態時は減少することが分かった。さらに詳しく解析を進めると、 $\gamma$ 帯域のみならず、 $\alpha$ 帯域(10-15 Hz)、 $\beta$ 帯域(15-30 Hz)においても減少しており、これは皮質内の自発性状態では全体的な神経活動の抑制が考えられ、音誘発性活性状態ではそれを増強させたことを示唆しており、卒業研究で残された課題に対して1つの解答を提示できた。この頃より、*in vitro*スライスにおけるホールセルパッチクランプの実験も行うことができ、今度はその技術にも四苦八苦しながらも、AI第4層の興奮性細胞から、大脳皮質の約20%を占めると

言われる抑制性細胞からの入力（抑制性後シナプス電流: IPSC）を測定した。テトロドトキシン（TTX）を使用し、自発性の IPSC のうち活動電位依存性を区別して実験を行うと、ニコチン投与により活動電位依存性の IPSC はほとんど変化がないが、活動電位非依存性の IPSC（miniature IPSC）の振幅、および周波数が減少することとなった。ニコチン性フィルタリング機構にも抑制性細胞の関連の可能性が示唆されていたため、ダブルホールセルパッチクランプの実験を行い、GAD-GFP ノックインマウス（抑制性細胞特異的に GFP が発現するマウス）を使用して、直接的な IPSC の制御を観察した。2つの異なる細胞に電極を刺すダブルパッチは、さらに高度な技術が要求され再び四苦八苦したが、とにかく練習して安定した記録ができるようになった。その中で、抑制性の Fast spiking 細胞への間接的な抑制性制御があることも分かった。さらに、視床・皮質系経路を電気刺激することで、視床・皮質系経路誘導性の皮質内回路活性におけるニコチン性制御についても今回論ずることができた。また、*in vivo* の方でも新たな手法として、フラビン蛍光イメージングを導入し、ニコチン性フィルタリングの可視化に挑戦した。フラビン蛍光イメージングは、非侵襲的に神経活性を同時かつ広範囲に観察できる手法で、技術が確立している新潟大学まで川井先生が赴き、技術を取得してきてくれた。結果的にはこちらに関しても仮説通りの結果とはならなかったが、ニコチンの聴覚野における新たな知見を提示する結果となった。

以上のように、この 10 年で大きく私の研究における実験手法は変わってきたが、それぞれでニコチンの作用機序の一端を示すことができた。10 年前の 2013 年と言えば、アメリカのマンハッタン計画、アポロ計画、ヒトゲノム計画に続く、第 4 の大型科学計画となる「ブレイン・イニシアチブ（BRAIN Initiative、Brain Research through Advancing Innovative Neurotechnologies）」がスタートし、世界的に脳機能全容解明に乗り出した年である。本研究がこの世界規模の流れの一助になることを期待したい。

## B. 概要

本研究の概要として、タバコのような全身性のニコチン曝露は、健常な非喫煙者において、聴覚機能の増強を引き起こすことが知られている。このニコチン誘導性の感覚増強は注意フィルター機構を介していると考えられており、実際に、マウス一次聴覚野 (AI) においては、急性的なニコチン投与後、最も感受性の高い特性周波数 (Characteristic frequency, CF) 音に対する応答の増大と、CF から 2 オクターブ離れた (非 CF) 音の応答の低下が起り、シグナル・ノイズ比を向上させることで、周波数特異的な音の認識を向上させる仕組みが示唆されている。この神経情報制御の仕組みは、ニコチン性フィルター機構 (Nicotinic filtering) と呼ばれ、学習に関わる注意・集中の神経機能モデルと考えられている。先行研究では、主に局所電場電位 (Local field potential, LFP) の測定によって明らかにされてきたが、大脳皮質の電極を挿入した局所部位でしか活性変化を捉えられなかった。よって本研究で、神経活性の挙動を、非侵襲的かつ空間的に捉えることのできるフラビンタンパク質自家蛍光イメージング (Flavoprotein autofluorescence imaging, FAI) を用い、Nicotinic filtering における神経活性の強度と伝播を解析した。また、このフィルター機構は視床から AI の主な入力層である第 3/4 層への入力において、ニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChRs) が、投射経路の軸索活性の同期化を引き起こし、皮質応答を増強させることが知られている。しかし、nAChRs を介した皮質内制御に関与する細胞や機構など、特に感度調整に関わるとされる抑制性介在ニューロン (Inhibitory interneuron) への関与は未だ明らかにされていない。先行研究から、nAChRs を介した細胞活性の同期化 (Synchronization) や局所神経回路における抑制性介在ニューロンによる Feed-forward 抑制、脱抑制 (Disinhibition) 機構などが知られており、それらの機構が Nicotinic filtering に関与する仮説を立て、auditory thalamocortical (TC) slice を作成し、検証を行った。

## C. 第1章：序論

本研究の主題は、マウス一次聴覚皮質（AI）におけるニコチン性制御機構の解明にある。ニコチンはタバコに含まれる成分であり、一般的には依存症を引き起こす原因物質として認知されている。実際に、日本の厚生労働省の健康用語辞典には「(ニコチンは) たばこの葉に含まれ、強い依存性がある。アルカロイドの一種で、神経毒性の強い猛毒です。化学物質としては毒物に指定されています。」と書かれている（e-ヘルスネット健康用語辞典）。WHO（世界保健機関）においても、タバコによる死者は毎年世界で8万人以上に上り、そのうち1.2万人以上が喫煙者の近くにいる非喫煙者であるとしており、ニコチンはその強い依存性のため、禁煙に成功する人はおよそ4%ほどであると伝えている（WHO Fact sheet Tobacco）。タバコが人体に及ぼす悪影響を引き延ばしてしまうことにニコチンが貢献していることは確かであるが、ニコチンは低濃度であれば依存症を引き起こす可能性が低く、また、近年の研究では、ニコチンの受容体であるニコチン性アセチルコリン受容体（Nicotinic acetylcholine receptor: nAChRs）が認知機能、学習・記憶、または不安や恐怖、報酬といった高次機能においても重要な役割を果たしていることが解明されてきた（詳細は後述）。指導教員である川井秀樹先生のニコチン性感覚情報処理機能の向上に関するいくつかの論文では、音の情報処理がニコチンによって増強され、情報処理のゲーティングメカニズムに関与するという、注意・集中のメカニズムが提唱されており、そのプロセスは非常に精密であり、音という複雑な情報をいかに脳が処理するかといった基礎的な理解にも繋がるものであった（Kawai et al., 2007; Kawai et al., 2011）。この知覚応答に対するニコチン性制御が注意・集中のメカニズムのモデルとして重要であると共に、その制御機構の解明が複雑な知覚情報処理メカニズムの理解に重要であると考え、本研究に取り組むに至った。

## ニコチンの薬理学的・神経生理学的立ち位置

ニコチンは、前述したように毒物という印象が根強いが、その薬理的、神経生理学的な立ち位置は少し世間の認識とは異なると思う。主にタバコの葉でアルカロイド（植物塩基）の一つであり、虫から身を守る役割があるとされており、1828年にドイツの化学者であった Posselt と Reimann によって初めて単離された（Henningfield & Zeller, 2006）。ピリジン環、およびピロリジン環を含むニコチンは、アルカロイドには珍しく酸素を含んでいないため、揮発性を有する。そのため、タバコの葉を燃焼した煙を吸引する喫煙方式でニコチンを摂取することができた。喫煙の歴史は深く、1492年コロンブスがアメリカ大陸に上陸した際、すでに先住民は喫煙していたという記録があり、彼らは、嗜好品や薬（止瀉薬や抗炎症薬など）として使用していたと考えられている（Charlton, 2004）。1560年、フランスの学者であり外交官であった Jean Nicot は、頬にできた腫瘍がタバコの葉により治療できたことから、タバコを薬用としてフランスの貴族に送ったことで、フランスの上流階級の間で薬草としての効能があることが知られるようになった。この植物の名前である”*Nicotiana*”、および依存性物質と考えられていた”*Nicotine*”は、彼の名前が由来である。その後、万能薬としても謳われることもあったが、17世紀以降はその効能が疑われていき、しばらくは喫煙及び殺虫剤として使用されていた。19世紀に入ると、アルカロイドの単離方法の確立により、次々とアルカロイドが単離生成され、研究や治療における濃度制御が可能となり、それぞれ単一の効能の解明が成されていった。ニコチンも様々な治療における投与方法などが模索され、多くの症例（神経痛、蚕食性潰瘍、鼻ポリープなど）に対しての効果を確かめることができ、さらに喫煙者がジフテリアやチフスといった細菌感染症を防ぐといった報告もなされた（Stewart, 1967; Charlton, 2004）。近年の COVID-19 パンデミックにおける SARS-CoV-2（Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2）感染者に対するいくつかの調査では、SARS-CoV-2 陽性率が、非喫

煙者より、現喫煙者の方が低いとされる報告もある (Eastin et al., 2020; Lusignan et al., 2020; Rentsch et al., 2020; but see Cai, 2020)。その仕組みとして、SARS-CoV-2 のホスト受容体としても知られる ACE2 (Angiotensin-converting enzyme 2) が、タバコの煙に含まれるアリル炭化水素によって、ACE2 遺伝子の発現量が減少するためではないかと考えられており (Tanimoto et al., 2021)、またニコチンによっても ACE2 発現の減少制御が行われていることも報告されている (Oakes et al., 2018; but see Maggi et al., 2021)。

誤解のないように付け加えるが、喫煙者の場合は感染後の重症化のリスクが高まるという症例が非常に多いため (Eastin et al., 2020; Zhang et al., 2021; Nishimura et al., 2023)、WHO も禁煙を推奨している (WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 20 March 2020)。

1905 年、John Langley によりニコチンの末梢神経系における薬理的な研究が行われ、この研究で”Receptive substance”、つまり化合物を受容できる物質、のちに受容体(Receptor)の存在を示唆する重要な結果をもたらした(Langley, 1905; see also Dani & Balfour, 2011)。

1921 年、薬理学者である Otto Loewi はカエルの 2 つの心臓を用い、片方の心臓の迷走神経刺激により拍動の減少が見られた溶液によって、もう一方の心臓の心拍も減少したことから、可溶性の物質 (“Vagusstoff” と彼らは名付けた) が心臓の拍動を制御していることを発見した (Loewi & Navratil, 1921 原著はドイツ語; see Maehle, 2004)。

この物質は、1914 年に Henry Dale によって麦角から単離されたアセチルコリン (Acetylcholine) として発見されたものであることが分かり、Dale はまたアセチルコリンの受容体には、ムスカリン性 (ムスカリンが結合して働く G タンパク質共役型, mAChRs) と、ニコチン性 (ニコチンが結合して働くリガンド開口型イオンチャネル) の 2 種類が存在することも示唆していた (Tansey, 2006)。

Loewi の実験は、それまで分かっていたシナプスにおける情報伝達が電氣的なものによるものか化学的なものによるものかを決定的にし、1936 年にはこの功績からノーベル生理学・医学賞の受賞に至った。この頃から、ニコチンの脳や神経系への影響に注目さ

れるようになり、1926年の Moll の研究では、脳炎後に発症したパーキンソン病の患者における運動障害が、ニコチンの皮下注射により改善したと報告されている (Moll, 1926)。実際に近年の喫煙とパーキンソン病に関するメタ解析の研究では、喫煙がパーキンソン病のリスクを減少させることが報告されている (Hernan et al., 2002; Ritz et al., 2007; but see Anstey et al., 2007) が、一方で、パーキンソン病に伴う合併症の発症率は喫煙者の方が高いことも明らかとなってきた (Levy et al., 2002)。1933年には再び Dale らがネコの神経筋接合部においてアセチルコリンの放出による筋収縮が観測され、1944年には、John Eccles らが、活動電位を阻害した状態の神経筋接合部においてアセチルコリンの放出に伴う EPSP (興奮性後シナプス電位) を記録し (Eccles et al., 1944)、1952年には、Bernard Katz が自発性微小終板電位の測定から、神経伝達機構の「量子仮説」を唱えた。Katz はこの研究で 1970 年にノーベル医学・生理学賞を受賞している。彼らの功績から、神経情報伝達機構が「化学的であり」かつ「量子性を持つ」という基本法則が確立された。1950-70年代にかけて、タバコによる気管支原性肺癌 (Wynder, 1950) やタバコの依存性 (Russel, 1971) についての調査、また喫煙・禁煙の脳波への影響 (Hauser et al., 1964; Ulett & Itil, 1969) などが調べられ、タバコおよびニコチンの脳への影響に注目が集まるようになり、1980年代に入ると、ニコチンの依存性が広く知られるようになっていった。同じ頃、DNA クローニング技術やタンパク質の構造解析技術の向上により、アセチルコリン受容体の詳細な解析が進み、Shosaku Numa の研究室では、シビレエイの nAChRs の  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$  すべてのサブユニットの cDNA クローニングが成功し、一次構造解析、機能発現の解明に至った (Noda et al., 1982; Noda et al., 1983a; Noda et al., 1983b; Mushina et al., 1984)。また、同時期に Boulter らによってもマウスの中樞神経系における nAChRs の  $\alpha$  サブユニットの DNA クローニングと *in situ* ハイブリダイゼーションが行われ、中樞神経系の nAChRs の役割に目を向ける大きな一歩となった (Boulter et al., 1986)。動物モデルを使用している研究もこの時期から進められ、

Corrigall らのオペラント条件付けされたラットの自己投与による実験では、ニコチンが逆 U 字状の用量反応曲線があることがわかり (Corrigall & Coen, 1989; see also Picciotto, 2003)、彼らはさらに、中脳皮質辺縁系のドーパミン作動性 (DA) ニューロンがニコチン自己投与に深くかかわっている可能性を示唆した (Corrigall & Clarke, 1992)。ニコチンが DA ニューロンの活性をシナプス活性増強によって引き起こすことが *in vivo*, *in vitro* 両面から証明がなされ (Grenhoff et al., 1986; Pidoplichko et al., 1997)、DA ニューロンによる報酬系をハイジャックすることで依存性を誘発する仕組みが明らかとなってきた。1990 年代以降は、nAChRs の中枢神経系におけるシナプス制御に関する論文が増加し、後シナプスだけでなく、前シナプス、前終末にも発現し、情報伝達の増強を行っていることが確認され (Gray et al., 1996; Role & Berg, 1996; Léna et al., 1993; see also Dani, 2001)、海馬由来の学習や記憶の強化 (Peeke & Peeke, 1984; Kenny & Gould, 2008; Halff et al., 2014) や、感覚情報の認識の向上における役割 (Levin, 2002; Picciotto, 2003; Wingnall & Wit, 2011) などが明らかとなってきた。

以上より、ニコチンは古くからその存在が社会の中にあり、時代により様々な評価をされつつも、その受容体の存在は神経科学の基礎的な発展を支えてきた。同時に、学習や記憶、知覚情報処理といった、今現在も多くの研究がなされている分野でも重要な役割を果たしている。その一方で、2015 年あたりからニコチンに関する論文数が急減しており (PubMed における収録論文数を参考)、2022 年の論文数 (151 本、Search query: nicotine, central nervous system) は 1997 年とほぼ同じ水準 (147 本) で、最多であった 2015 年 (351 本) の半数以下となっている (Search query: nAChR, central nervous system でも同様の傾向)。これは、ニコチンの中枢神経系における研究がある一定の達成をみたと同時に、nAChRs の神経制御における機能的役割の複雑さによる実験の難化も考えられる。特に、感覚情報処理においては、詳細は後述するが、大脳皮質において非常に広範囲にコリン作動性ニューロンの軸索が投射されているにも関わ

らず、nAChRs の発現パターンなどから細胞種特異的なニコチン性制御が行われており、皮質内微小神経回路に基づく緻密な制御機構が存在している可能性がある。しかも皮質内の神経回路のみならず、視床など皮質下での制御、および視床・皮質系経路での制御が行われていることも知られ、広範かつ特異的な神経制御の可能性が考えられるため、より精密な実験、解析、解釈が必要となってくる。次項では、感覚情報処理における nAChRs の役割についてさらに詳しく見ていきたい。なお、mAChRs に関しては、本研究では省略するが、mAChRs も中枢神経系全体的に発現が認められており、海馬 CA1 におけるシナプス増強 (Dennis et al., 2016) や、知覚障害の改善への貢献など (Langmead et al., 2008)、非常に興味深く今後も研究対象とする価値のある神経制御因子であることを追記しておく。

#### nAChRs の感覚情報処理機構における役割

1945 年に Feldberg によって、中枢神経系の各部位におけるアセチルコリンの生合成が観測され、特に大脳半球で多く作られていることが解った (Feldberg, 1945)。アセチルコリンを放出するコリン作動性ニューロンは、哺乳類の脳において主に 4 つの部位に局在していて、①脳幹の橋脚核と外側脊髄核、②視床核、③コリン性神経細胞が局所的に介在ニューロンとして機能している線条体、および④前脳基底 (Basal forebrain) である。前脳基底部の構造である、ブローカ対角帯核の水平脚 (Horizontal limb of the diagonal band)、マイネルト核 (Nucleus basalis of Meynert)、無名質 (Substantia innominata) は、主に視覚皮質、聴覚皮質、前頭前皮質、嗅周皮質を含む新皮質全体、および扁桃核へ投射しており、内側中隔核 (Medial septal) およびブローカ対角帯核の垂直脚 (Vertical limb of the diagonal band) は、海馬や嗅内皮質へと投射しており、調節系としての機能的役割を果たしていることが解っている (Dineley et al., 2015; Ballinger et al., 2016)。解剖学的な知見から、げっ歯類の前脳基底部のコリン作動性ニューロンは、

前頭前野から後頭葉の視覚野まで広く投射しており、かつそれぞれの領域の全層に渡って投射していることが明らかとなっている (Eckenstein, 1988) が、近年のより詳細な研究では、マウス前脳基底部のコリン作動性ニューロンの一つの軸索は、大脳皮質において水平方向に 2 mm 程と広範囲に側枝が広がっており (Wu et al., 2014)、これはマウスのバレル皮質における 1つのカラムの直径 (150-300  $\mu\text{m}$ : Jan et al., 2008) を優に超える幅で、一つのコリン作動性ニューロンが複数のカラムの調節をしていることが示唆されている。また、解剖学的な手法に加えて、近年の遺伝子制御による細胞特異的なラベル法とイメージング技術の発展から、一次感覚皮質 (SI) では第 4 層、一次視覚皮質 (VI) では第 2/3 層にコリン性軸索終末の分布が高く、皮質層内におけるコリン性神経支配の強さも明らかとなってきた (Li et al., 2018)。コリン作動性シナプスには、point-to-point シナプスと呼ばれる軸索末端で前シナプスと後シナプスの一対一で形成されたシナプスと、en passant シナプスと呼ばれる軸索途中で形成されたシナプスの 2 種類がある。point-to-point シナプスは速く一過性の、en passant シナプスはゆっくりで長い調節効果を引き起こすことが知られている。放出されたアセチルコリンは、nAChRs (および mAChRs) の開口を引き起こすが、前述したように、nAChRs は後シナプスだけでなく、前シナプス、前終末にも存在していることが知られている。前シナプスにおけるシナプス調節の機序について触れると、一般的に、シナプス前部に活動電位が到達すると、電位依存性カルシウムチャネル (VGCC) を介して  $\text{Ca}^{2+}$  が流入し、その後、シナプス前部から神経伝達物質が放出されるが、前シナプスに nAChRs が存在する場合、nAChRs の開口により  $\text{Ca}^{2+}$  を直接流入させることで、前シナプスの  $\text{Ca}^{2+}$  の濃度を増加させ、神経伝達物質の放出とそれに引き続く活動電位依存性の後シナプス電流の振幅も増加させることができる。また、nAChRs の活性化は、グルタミン酸放出だけでなく、シナプス前終末からのセロトニン (5-HT<sub>3</sub>)、ドーパミン、ACh、 $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (GABA) などのさまざまな重要な神経伝達

物質を調節することができることも知られている (Maggi et al., 2001; Dineley et al., 2015)。このように、nAChRs は脳全体的に存在しており、かつ制御機構の広範囲さと調節因子の多様さから、感覚情報処理において重要な役割があると考えられる。実際に、感覚情報処理に伴う注意・集中のメカニズムに注目すると、前頭前皮質から感覚皮質の経路で目標やタスクに基づいて情報を選択する意識的な処理を行う注意のトップダウン制御、および視床から感覚皮質の経路で外部刺激に対する無意識的な情報選択処理を行う注意のボトムアップ制御の2種類の処理経路が存在するが、そのどちらもコリン作動性ニューロンによってより注意機能が增大することが知られている (Cohen & Maunsell, 2009; Pinto et al., 2013; Chen et al., 2015; Gritton et al., 2016; Sarter et al., 2016)。

nAChRs は哺乳類では 16 種類のサブユニット ( $\alpha 1-10$ ,  $\beta 1-4$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$ ;  $\alpha 8$  を除く) によって構成される 5 量体を形成している (Schaaf, 2014; Bertrand et al., 2015)。複数のサブユニットで構成されるヘテロ型と一つのサブユニットで構成されるホモ型が存在し、ヘテロ  $\alpha 4\beta 2^*$ -nAChRs ( $\alpha 4\beta 2^*$ は、 $\alpha 4\beta 2$  を含むという意味) と、ホモ  $\alpha 7$ -nAChRs が哺乳類の脳では圧倒的多数を占めており、様々な機能的役割を担っている。

この 2 つは構造のみならず、機能的特性にも違いがあり、 $\alpha 4\beta 2^*$ -nAChRs は、高親和性であり、活性速度は緩やかであるが、脱感作も緩やかに引き起こされる。 $\alpha 7$ -nAChRs は、低親和性であり、速い活性速度を示し、すぐに脱感作される (Dineley et al., 2015)。nAChRs は  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  といった陽イオンを透過させることができ、細胞内の膜興奮性と細胞内シグナル伝達の活性化を誘導し、さらに、神経伝達物質の放出を促進することも知られている。特に  $\alpha 7$ -nAChRs は NMDAR (N-Methyl-D-Aspartate 受容体) 以上の  $\text{Ca}^{2+}$  透過性を持つことが知られている (Bertrand et al., 1993; Castro & Albuquerque 1995; Uteshev, 2012)。

この  $\text{Ca}^{2+}$  流入によって、細胞内シグナリングカスケードの亢進を促し、サイトカインを介したシグナル伝達を促す JAK2 (Janus kinase 2) や ERK (Extracellular related kinase)、MAPK (Mitogen-activated protein

kinase) などのシグナル経路を活性化させることが知られてきた (Marrero & Bencherif, 2009; Bencherif & Lippiello, 2009; Gubbin et al., 2010)。AI においても、ニコチンの腹腔内皮下注射 (全身性投与) によって、 $\alpha 4\beta 2^*$ -nAChRs を介して ERK のリン酸化が増加するという報告があり (Kawai et al., 2013)、また聴覚情報処理におけるニコチン性制御が ERK シグナリングを介して行われているという報告もある (Intskirveli & Metherate, 2012)。 $\alpha 4\beta 2^*$ -nAChRs は大脳皮質全層に渡って存在することが確認されており、(Gotti et al., 2007)、また、最近の FISH 法 (蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法) による遺伝子発現解析によると、 $\beta 2^*$ -nAChRs の遺伝子発現は AI 全層にほぼまんべんなく存在することが報告されている (Ghimire et al., 2020)。一方で、機能的な解析によると、注意行動に重要な前頭前野では、層特異的、また細胞特異的に発現する nAChRs のサブユニットの違いから、アセチルコリン制御が異なっていることが知られている。例えば、Poorthuis らの *in vitro* スライス実験によると前頭前野の興奮性細胞 (Excitatory pyramidal neuron: PN) における nAChRs の発現は、第 2/3 層ではなく、第 5 層で  $\alpha 7$ -nAChRs の活性制御が起こるとし、また速いスパイク (Fast spiking: FS) を起こす抑制性介在ニューロン (Inhibitory interneuron: IN) である FS 細胞においては、第 2/3 層、第 5 層共に  $\alpha 7$ -nAChRs の発現があるとされた。この FS 細胞はほとんどが Parvalbumin 陽性 (PV<sup>+</sup>) 細胞であり、非常に速く、連続しても減衰しない活動電位を起こし、非常に強い IPSC を誘発することが知られている (Kruglikov & Rudy, 2008)。また、彼らによると  $\alpha 4\beta 2^*$ -nAChRs は第 6 層の PN や FS でない IN に存在することが示された (Poorthuis et al., 2013)。Alitto と Dan は *in vivo* 環境で、マウス前脳基底核に電極を挿入し電気刺激し、VI において二光子カルシウムイメージングで神経活性を測定すると、nAChRs を介して第 1 層の IN、および第 2/3 層の IN である Vasoactive intestinal peptide 陽性 (VIP<sup>+</sup>) 細胞が、PV<sup>+</sup>細胞の一部では抑制が起こることで、情報処理システムに重要な役割を担っていることが解った (Alitto & Dan, 2013)。また、Froemke らのラットの実験で

は、前脳基底核と音の刺激のペアリングをすることで、ペアリングした音に対しての応答性が増大し、音のチューニング曲線が変化することが分かった (Froemke et al., 2007)。実際には、ACh は視床の細胞への影響ではなく、AI 内で発生する興奮性後シナプス電流 (EPSC) が増加し、IPSC が減少することで音に対する応答性が変化していた。また、AI の第 1 層に存在するセロトニン受容体でもある Iontropic 5-HT<sub>3A</sub> receptor (5-HT<sub>3A</sub>R) を発現する IN は、ニコチンまたは、ACh を放出する前脳基底部刺激によって直接活性化されることが知られており (Letzkus et al., 2011; Takesian et al., 2018)、さらにこの IN はカラム内 (AI にカラム構造があるかは議論の余地があるが、少なくとも垂直方面への投射) の第 2/3 層にある PV<sup>+</sup>細胞の抑制に伴う脱抑制 (Disinhibition) を引き起こすことで、PN における視床・皮質系経路誘発性の活動電位が増強されることが明らかとなった。また発達段階においても、視床・皮質系経路依存性の周波数地図の可塑的变化を制御していることが示唆されている (Takesian et al., 2018)。一般的に、抑制性入力、投射されたニューロンの興奮性を低下させることが知られている (Feed-forward 抑制) が、脱抑制作用といったように神経回路的に PN の興奮性を増加させること機構の存在も知られている (Tremblay et al., 2016)。皮質内細胞、もしくは回路のみならず、視床・皮質系経路における nAChRs の存在も明らかになってきており、前頭前野では視床・皮質軸索終末でのニコチン性制御により 5 層の PN における自発性 EPSP が増加することが分かった (Lambe et al., 2003)。また、AI の第 3/4 層に投射する視床・皮質系経路においては、 $\alpha 4\beta 2^*$ -nAChRs が視床・皮質軸索のランビエ絞輪に存在することを示唆する結果が出ており (Kawai et al., 2007)、nAChRs の制御機構の多様性を示している。また、この実験においては、軸索の興奮性増加に  $\alpha 4\beta 2^*$ -nAChRs が貢献しており、その結果、軸索活性の同期化が起こることで、皮質内へのシナプス伝達効率が増大し、音応答の向上が示されている。しかし、ニコチンの効果においては、AI 内のある特性周波数 (CF) 音特異的な神経活性を増強するものの、CF 活性特異的

な部位において、CF から 2 オクターブ離れた非 CF 音の応答は減少するということが報告されている (Kawai et al., 2011)。これをニコチンのフィルター機構 (Nicotinic filtering) と呼ばれており、注意・集中のメカニズムとして考えられているが、前述したように多様な nAChRs の制御が考えられるため、どのような細胞が関わっているか、どういった神経回路制御が行われている等は未だ明確にはなっていない。

以上のように、nAChRs の多様な制御機構は非常に広範であるにも関わらず、細胞特異的かつ緻密であることがわかる。nAChRs は発達にも関係しており、アセチルコリンエステラーゼ (AChE) の発現レベルが発達に伴って減少していくこと (Robertson et al. 1991) や、聴覚知覚開始時から前シナプスにおける nAChRs のサブタイプが  $\alpha 7$  から  $\alpha 4\beta 2$  へと発現が変わり、後シナプスの NMDAR および AMPAR の構成も変化していくことが示唆されており (Lambe et al. 2003; Metherate & Hsieh, 2003; Metherate 2004)、さらに、発達段階における可塑性の臨界期の終了過程においても nAChRs を介したシグナル増強が関与するという報告もある (Morishita et al., 2010)。また、アルツハイマー、自閉症スペクトラム、統合失調症といった神経疾患においても nAChRs との関係が知られており (Dineley et al., 2015)、例えば、統合失調症においては、前辺縁皮質における VIP<sup>+</sup>細胞が  $\alpha 5$  サブユニットの活性により低活性状態となり、Somatostatin 陽性 (SOM<sup>+</sup>) 細胞の脱抑制による前頭葉の機能低下を引き起こすことが解明され、統合失調症における神経回路の一部を解き明かすことに成功している (Koukouli et al., 2017)。このように、nAChRs の研究が、前述したような記憶や学習、感覚情報処理のみならず、発達や神経疾患といったメカニズムの解明にも繋がってくるため、本研究における感覚皮質のニコチン性活性のメカニズムを解明することが脳機能の解明の一助となることを期待する。

## 本論について

以上より、マウス AI における音誘発性応答に対するニコチン性制御が注意・集中のメカニズムのモデルとして重要であると共に、その制御機構の解明が複雑な感覚情報処理において重要であることが示唆された。

第 2 章では、「マウス聴覚野における音誘発性神経活性と活性化領域の皮質内および皮質下ニコチン性制御」として、フラビンタンパク質蛍光イメージングによって、*in vivo* における音活性変化を時空間的に捉え、ニコチンの影響を検討する。フラビンタンパク質はミトコンドリアの電子伝達系に存在する化合物で、FMN (フラビンモノヌクレオチド)、FAD (フラビンアデニンジヌクレオチド) といった NADH などの脱水素酵素から呼吸鎖への電子伝達を行うタンパク質である。FMN は還元状態の FMNH<sub>2</sub> からエネルギー代謝活性により酸化型となり、青色励起光照射下で緑色自家蛍光を発することが知られている。Duchen らによって、フラビンタンパク質自家蛍光とホールセルパッチクランプとの同時記録により、神経細胞では神経活性依存的な細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇に伴い、自家蛍光反応の増大が引き起こされたことが確認された (Duchen, 1992)。また、Shibuki らによって蛍光変化が *in vitro*, *in vivo* 両面で神経活性依存性、シナプス活性依存性であることが証明され (Shibuki et al., 2003)、Reinert らによるマウス小脳における神経活性とミトコンドリア代謝との関連や (Reinert et al., 2004)、Murakami らによる体性感覚皮質におけるシナプス短期増強 (Short-term plasticity) の計測 (Murakami et al., 2004)、Theyerl らによる SI 第 5 層の細胞と皮質-視床・皮質回路 (cortico-thalamocortical circuit) との関連といった高次機能へのアプローチ (Theyerl et al., 2010) など、多くの神経生理活性および脳機能のイメージング法として確立してきた。前述したように、電気生理学的実験により、ニコチンの感覚情報処理への影響は、AI の皮質内回路における制御が示唆されており、論理的なモデルが提唱されている (Kawai et al., 2011) が、このモ

デルを動物行動学的に証明するのは非常に難しい。そのため、これを視覚的に捉えることができないかという動機から、*in vivo* イメージングを用いてニコチン性感覚情報処理を視覚的に捉えられるかどうか検討した。

第3章では、「マウス一次聴覚野第3/4層における視床・皮質系神経回路のニコチン制御」として、電気生理学的なアプローチからAIの視床・皮質入力層である第3/4層でのニコチンの制御機構について検討する。前述したが、マウスAIの第3/4層では、CFによる音誘発性シナプス活性の増強が確認されており、一方で非CFに対する音誘発性シナプス活性は減少することが確認されている(Kawai et al., 2011)。シナプス増強に関しては、視床・皮質系経路における軸索の興奮性増加に伴う活性の同期化(Kawai et al., 2007)、また、視床におけるMAPKシグナルを介した活性増強(Intskirveli, 2012)、皮質内におけるP-ERKの増加(Kawai et al., 2013)などによって引きこされることが考えられるが、非CFの減弱などは説明できず、また聴覚野におけるINでのニコチン性制御もまだ明らかにされていない。しかしながら、2011年、LetzkusらによるAIの連合学習回路に関する画期的な論文が発表された。彼らは、連合学習の刺激としてよく用いられるフットショックがAIの第1層に存在するINを活性化することに注目した。第1層のINの活性化は、第2/3層のPV<sup>+</sup>細胞の抑制をもたらし、同じく第2/3層のPNを活性化させる、脱抑制が引き起こされることがわかり、音と連合することで、恐怖学習が成立するということが明らかにされた(Letzkus et al., 2011)。この第1層の細胞はnAChRsを持つことも確認され、コリン作動性制御における新たな知見を提示したと共に、“一次”感覚皮質という感覚情報処理システムの初期段階において、高次機能と考えられていた学習のメカニズムが存在することが示され、さらにその神経回路まで特定したことが大きなインパクトを与えた。他の研究でも、VIの第2/3層においては、SOM<sup>+</sup>細胞がVIP<sup>+</sup>細胞を介した脱抑制機構による皮質回路の脱同期化および脱相関を引き起こし(Chen et al., 2015)、またSIバレ

ル皮質の第 2/3 層では、VIP+細胞が SOM+細胞を介した脱抑制機構によって、運動と感覚シグナルとの統合が行われていることが明らかとなっている (Gasselín et al., 2021)。視床・皮質入力層においては、SI における SOM+細胞が PV+細胞への抑制をすることで、結果的に第 2/3 層への強いフィードフォワード入力を引き起こすことが知られている (Xu et al., 2013) が、聴覚野においては明らかにされていない。前述したように、*in vivo* の実験において、視床・皮質入力層においてもニコチン性増強が見られたことから、上記のような神経回路がニコチンでどのように変化しているかを知るため、またどの細胞がニコチン性の認知機能増強に関わっているか解明するという動機から、局所神経回路におけるニコチン性制御について検討した。

## 参考文献

- Alitto HJ, Dan Y (2012) Cell-type-specific modulation of neocortical activity by basal forebrain input. *Front Syst Neurosci* 6:79.
- Anstey KJ, Von Sanden C, Salim A, O’Kearney R (2007) Smoking as a risk factor for dementia and cognitive decline: A meta-analysis of prospective studies. *Am J Epidemiol* 166:367–378.
- Ballinger EC, Ananth M, Talmage DA, Role LW (2016) Basal Forebrain Cholinergic Circuits and Signaling in Cognition and Cognitive Decline. *Neuron* 91:1199–1218.
- Bertrand D, Galzi JL, Devillers-Thierry A, Bertrand S, Changeux JP (1993) Mutations at two distinct sites within the channel domain M2 alter calcium permeability of neuronal alpha 7 nicotinic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(15):6971-6975.
- Bertrand D, Lee CH, Flood D, Marger F, Donnelly-Roberts D (2015) Therapeutic potential of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev* 67(4):1025-1073.
- Boulter J, Evans K, Goldman D, Martin G, Treco D, Heinemann S, Patrick J (1986) Isolation of a cDNA clone coding for a possible neural nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha$ -subunit. *Nature* 319:368–374.
- Cai G (2020) Bulk and single-cell transcriptomics identify tobacco-use disparity in lung gene expression of ACE2, the receptor of 2019-nCov. *Am J Respir Crit Care Med* 201(12):1557-1559.
- Castro NG, Albuquerque EX (1995) Alpha-Bungarotoxin-sensitive hippocampal nicotinic receptor channel has a high calcium permeability. *Biophys J* 68(2):516-524.
- Charlton A (2004) Medicinal uses of tobacco in history. *J R Soc Med* 97:292–296.
- Chaudhri N, Caggiula AR, Donny EC, Palmatier MI, Liu X, Sved AF (2006) Complex interactions between nicotine

and nonpharmacological stimuli reveal multiple roles for nicotine in reinforcement. *Psychopharmacology (Berl)* 184:353–366.

Chen N, Sugihara H, Sur M (2015) An acetylcholine-activated microcircuit drives temporal dynamics of cortical activity. *Nat Neurosci* 18:892–902.

Corrigall WA, Coen KM (1989) Nicotine maintains robust self-administration in rats on a limited-access schedule. *Psychopharmacology (Berl)* 99:473–478.

Corrigall WA, Franklin KBJ, Coen KM, Clarke PBS (1992) The mesolimbic dopaminergic system is implicated in the reinforcing effects of nicotine. *Psychopharmacology (Berl)* 107:285–289.

Dani JA (2001) Overview of nicotinic receptors and their roles in the central nervous system. *Biol Psychiatry* 49:166–174.

Dani JA, Balfour DJK (2011) Historical and current perspective on tobacco use and nicotine addiction. *Trends Neurosci* 34:383–392.

de Lusignan S, Dorward J, Correa A, Jones N, Akinyemi O, Amirthalingam G, Andrews N, Byford R, Dabrera G, Elliot A, Ellis J, Ferreira F, Lopez Bernal J, Okusi C, Ramsay M, Sherlock J, Smith G, Williams J, Howsam G, Zambon M, Joy M, Hobbs FDR. (2020) Risk factors for SARS-CoV-2 among patients in the Oxford Royal College of General Practitioners Research and Surveillance Centre primary care network: a cross-sectional study. *Lancet Infect Dis* 20(9):1034-1042.

Dennis SH, Pasqui F, Colvin EM, Sanger H, Mogg AJ, Felder CC, Broad LM, Fitzjohn SM, Isaac JTR, Mellor JR (2016) Activation of Muscarinic M1 Acetylcholine Receptors Induces Long-Term Potentiation in the Hippocampus. *Cereb Cortex* 26:414–426.

- Dineley KT, Pandya AA, Yakel JL (2015) Nicotinic ACh receptors as therapeutic targets in CNS disorders. *Trends Pharmacol Sci* 36:96–108.
- Duchen MR (1992) Ca<sup>2+</sup>-dependent changes in the mitochondrial energetics in single dissociated mouse sensory neurons. *Biochem J* 283:41–50.
- Eastin C, Eastin T (2020) Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *J Emerg Med* 58(4):711–2.
- Eccles JC, Katz B, Kuffler SW (1944) Nature of the ‘endplate potential’ in curarized muscle. *J Neurophysiol* 4:362–387.
- Eckenstein FP, Baughman RW, Quinn J (1988) An anatomical study of cholinergic innervation in rat cerebral cortex. *Neuroscience*. 25(2):457-474.
- Eggermann E, Feldmeyer D (2009) Cholinergic filtering in the recurrent excitatory microcircuit of cortical layer 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:11753–11758.
- Eggermann E, Kremer Y, Crochet S, Petersen CCH (2014) Cholinergic Signals in Mouse Barrel Cortex during Active Whisker Sensing. *Cell Rep* 9:1654–1660.
- Feldberg W (1945) Present views on the mode of action of acetylcholine in the central nervous system. *Physiol Rev* 25:596-42.
- Froemke RC, Merzenich MM, Schreiner CE (2007) A synaptic memory trace for cortical receptive field plasticity. *Nature* 450:425–429.
- Gasselin C, Hohl B, Vernet A, Crochet S, Petersen CCH (2021) Cell-type-specific nicotinic input disinhibits mouse barrel cortex during active sensing. *Neuron* 109:778-787.e3.
- Gotti C, Moretti M, Gaimarri A, Zanardi A, Clementi F, Zoli M (2007) Heterogeneity and complexity of native

- brain nicotinic receptors. *Biochem Pharmacol* 74:1102–1111.
- Gould TJ (2006) Nicotine and Hippocampus-Dependent Learning. *Mol Neurobiol* 34:93–107.
- Gould T, Davis J (2010) Associative Learning, the Hippocampus, and Nicotine Addiction. *Curr Drug Abuse Rev* 1:9–19.
- Gray R, Rajan AS, Radcliffe KA, Yakehiro M, Dani JA (1996) Hippocampal synaptic transmission enhanced by low concentrations of nicotine. *Nature* 383:713–716.
- Grenhoff J, Aston-Jones G, Svensson TH (1986) Nicotinic effects on the firing pattern of midbrain dopamine neurons. *Acta Physiol. Scand.* 128:351–358.
- Gritton HJ, Howe WM, Mallory CS, Hetrick VL, Berke JD, Sarter M (2016). Cortical cholinergic signaling controls the detection of cues. *Proc Natl Acad Sci* 113, E1089–E1097.
- Halff AW, Go´mez-Varela D, John D, Berg DK (2014) A Novel Mechanism for Nicotinic Potentiation of Glutamatergic Synapses. *J Neurosci* 34(6):2051–2064.
- Hernán MA, Takkouche B, Caamaño-Isorna F, Gestal-Otero JJ (2002) A meta-analysis of coffee drinking, cigarette smoking, and the risk of Parkinson’s disease. *Ann Neurol* 52:276–284.
- Henningfield JE, Zeller M (2006) Nicotine psychopharmacology research contributions to United States and global tobacco regulation: A look back and a look forward. *Psychopharmacology (Berl)* 184:286–291.
- Intskirveli I, Metherate R (2012) Nicotinic neuromodulation in auditory cortex requires MAPK activation in thalamocortical and intracortical circuits. *J Neurophysiol* 107:2782–2793.
- Jan TA, Lu L, Li CX, Williams RW, Waters RS (2008) Genetic analysis of posterior medial barrel subfield (PMBSF) size in somatosensory cortex (SI) in recombinant inbred strains of mice. *BMC Neuroscience* 9:3.

- Kawai HD, Kang HA, Metherate R (2011) Heightened nicotinic regulation of auditory cortex during adolescence. *J Neurosci* 31:14367–14377.
- Kawai HD, La M, Kang HA, Hashimoto Y, Liang K, Lazar R, Metherate R (2013) Convergence of nicotine-induced and auditory-evoked neural activity activates ERK in auditory cortex. *Synapse* 67:455–468.
- Kawai H, Lazar R, Metherate R (2007) Nicotinic control of axon excitability regulates thalamocortical transmission. *Nat Neurosci* 10:1168–1175.
- Kenney JW, Gould TJ (2008) Modulation of hippocampus-dependent learning and synaptic plasticity by nicotine. *Mol Neurobiol* 38:101–121.
- Koukoulis F, Rooy M, Tziotis D, Sailor KA, O'Neill HC, Levenga J, Witte M, Nilges M, Changeux JP, Hoeffler CA, Stitzel JA, Gutkin BS, Digregorio DA, Maskos U (2017) Nicotine reverses hypofrontality in animal models of addiction and schizophrenia. *Nat Med* 23:347–354.
- Lambe EK, Picciotto MR, Aghajanian GK (2003) Nicotine induces glutamate release from thalamocortical terminals in prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology* 28:216–225.
- Langley JN (1905) On the reaction of cells and of nerve-endings to certain poisons, chiefly as regards the reaction of striated muscle to nicotine and to curari. *J Physiol* 33:374–413.
- Lena C, Changeux JP, Mulle C (1993) Evidence for “preterminal” nicotinic receptors on GABAergic axons in the rat interpeduncular nucleus. *J Neurosci* 13:2680–2688.
- Levin ED (2002) Nicotinic receptor subtypes and cognitive function. *J Neurobiol* 53:633–640.
- Levin ED, Connors CK, Silva D, Hinton SC, Meck WH, March J, Rose JE (1998) Transdermal nicotine effects on attention. *Psychopharmacology (Berl)* 140:135–141.

- Li X, Yu B, Sun Q, Zhang Y, Ren M, Zhang X, Li A, Yuan J, Madisen L, Luo Q, Zeng H, Gong H, Qiu Z (2017) Generation of a whole-brain atlas for the cholinergic system and mesoscopic projectome analysis of basal forebrain cholinergic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115:415–420.
- Langmead CJ, Watson J, Reavill C (2008) Muscarinic acetylcholine receptors as CNS drug targets. *Pharmacol Ther* 117:232–243.
- Levy G, Tang MX, Cote LJ, Louis ED, Alfaró B, Mejia H, Stern Y, Marder K (2002) Do risk factors for Alzheimer's disease predict dementia in Parkinson's disease? An exploratory study. *Mov Disord* 17:250–257.
- Loewi O, Navratil E (1924) Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung. *Pflügers Arch* 206:123–134.
- Liang K, Poytress BS, Weinberger NM, Metherate R (2008) Nicotinic modulation of tone-evoked responses in auditory cortex reflects the strength of prior auditory learning. *Neurobiol Learn Mem* 90:138–146.
- Maehle AH (2004) "Receptive Substances": John Newport Langley (1852-1925) and his Path to a Receptor Theory of Drug Action. *Med Hist* 48:153–174.
- Maggi F, Rosellini A, Spezia PG, Focosi D, Macera L, Lai M, Pistello M, Iure A de, Tomino C, Bonassi S, Russo P (2021) Nicotine upregulates ace2 expression and increases competence for sars-cov-2 in human pneumocytes. *ERJ Open Res* 7.
- Metherate R, Hsieh CY (2004) Synaptic mechanisms and cholinergic regulation in auditory cortex. *Prog Brain Res* 145:143–156.
- Mishina M, Kurosaki T, Tobimatsu T, Morimoto Y, Noda M, Yamamoto T, Terao M, Lindstrom J, Takahashi T, Kuno M, Numa S (1984) Expression of functional acetylcholine receptor from cloned cDNAs. *Nature* 307:604–608.

- Mineur YS, Picciotto MR (2010) Nicotine receptors and depression: Revisiting and revising the cholinergic hypothesis. *Trends Pharmacol Sci* 31:580–586.
- Moll H. (1926) The Treatment of Post-Encephalitic Parkinsonism by Nicotine. *Br Med J* 1(3416):1079-81.
- Morishita H, Miwa JM, Heintz N, Hensch TK (2010) Lynx1, a cholinergic brake, limits plasticity in adult visual cortex. *Science* 330(6008):1238-1240.
- Murakami H, Kamatani D, Hishida R, Takao T, Kudoh M, Kawaguchi T, Tanaka R, Shibuki K (2004) Short-term plasticity visualized with flavoprotein autofluorescence in the somatosensory cortex of anaesthetized rats. *Eur J Neurosci* 19:1352–1360.
- Nishimura M, Asai K, Tabuchi T, Toyokura E, Kawai T, Miyamoto A, Watanabe T, Kawaguchi T (2023) Association of combustible cigarettes and heated tobacco products use with SARS-CoV-2 infection and severe COVID-19 in Japan: a JASTIS 2022 cross-sectional study. *Sci Rep* 13(1):1120.
- Noda M, Takahashi H, Tanabe T, Toyosato M, Furutani Y, Hirose T, Asai M, Inayama S, Miyata T, Numa S (1982) Primary structure of  $\alpha$ -subunit precursor of *Torpedo californica* acetylcholine receptor deduced from cDNA sequence. *Nature* 299:793–797.
- Noda M, Takahashi H, Tanabe T, Toyosato M, Kikuyotani S, Hirose T, Asai M, Takashima H, Inayama S, Miyata T, Numa S (1983a) Primary structures of  $\beta$ - and  $\delta$ -subunit precursors of *Torpedo californica* acetylcholine receptor deduced from cDNA sequences. *Nature* 301:251–255.
- Noda M, Takahashi H, Tanabe T, Toyosato M, Kikuyotani S, Furutani Y, Hirose T, Takashima H, Inayama S, Miyata T, Numa S (1983b) Structural homology of *Torpedo californica* acetylcholine receptor subunits. *Nature* 302:528–532.

Oakes JM, Fuchs RM, Gardner JD, Lazartigues E, Yue X (2018) Nicotine and the renin-angiotensin system. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol* 315:R895–R906.

Schaaf CP (2014) Nicotinic acetylcholine receptors in human genetic disease. *Genet Med* 16(9):649-656.

Peeke SC, Peeke HVS (1984) Psychopharmacology Attention, memory, and cigarette smoking. *Psychopharmacology (Berl)* 84(2):205–216.

Picciotto MR (2003) Nicotine as a modulator of behavior: Beyond the inverted U. *Trends Pharmacol Sci* 24:493–499.

Pidoplichko VI, DeBiasi M, Williams JT, Dani JA (1997) Nicotine activates and desensitizes midbrain dopamine neurons. *Nature* 390:401–404.

Pinto L, Goard M, Estandian D (2013) Fast modulation of visual perception by basal forebrain cholinergic neurons. *Nat Neurosci* 16, 1857–1863.

Poorthuis RB, Bloem B, Verhoog MB, Mansvelder HD (2013) Layer-specific interference with cholinergic signaling in the prefrontal cortex by smoking concentrations of nicotine. *J Neurosci* 33:4843–4853.

Reinert KC, Gao W, Chen G, Ebner TJ (2007) Flavoprotein autofluorescence imaging in the cerebellar cortex in vivo. *J Neurosci Res* 85:3221–3232.

Rentsch CT, Kidwai-Khan F, Tate JP, Park LS, King JT, Skanderson M, Hauser RG, Schultze A, Jarvis CI, Holodniy M, Re VL, Akgün KM, Crothers K, Taddei TH, Freiberg MS, Justice AC (2020) Covid-19 Testing, Hospital Admission, and Intensive Care Among 2,026,227 United States Veterans Aged 54–75 Years. *PLoS Med* 17(9):e1003379.

Ritz B, Ascherio A, Checkoway H, Marder KS, Nelson LM, Rocca WA, Ross GW, Strickland D, Van Den Eeden SK,

- Gorell J (2007) Pooled analysis of tobacco use and risk of Parkinson disease. *Arch Neurol* 64:990–997.
- Role LW, Berg DK (1996) Nicotinic receptors in the development and modulation of CNS synapses. *Neuron* 16:1077–1085.
- Robertson RT, Mostamand F, Kageyama GH, Gallardo KA, Yu J (1991) Primary auditory cortex in the rat: transient expression of acetylcholinesterase activity in developing geniculocortical projections. *Dev Brain Res* 58:81–95.
- Rose JE, Mukhin AG, Lokitz SJ, Turkington TG, Herskovic J, Behm FM, Garg S, Garg PK (2010) Kinetics of brain nicotine accumulation in dependent and nondependent smokers assessed with PET and cigarettes containing <sup>11</sup>C-nicotine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:5190–5195.
- Russell MAH (1971) Cigarette Dependence: I—Nature and Classification. *Br Med J* 2:330–331.
- Sarter M, Lustig C, Blakely RD, Koshy Cherian A. (2016) Cholinergic genetics of visual attention: Human and mouse choline transporter capacity variants influence distractibility. *J Physiol Paris*. 110(1-2):10-18.
- Stewart GG (1967) A history of the medicinal use of tobacco 1492-1860. *Med Hist* 11(3):228-68.
- Taly A, Corringer PJ, Guedin D, Lestage P, Changeux JP (2009) Nicotinic receptors: Allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system. *Nat Rev Drug Discov* 8:733–750.
- Tanimoto K, Hirota K, Fukazawa T, Matsuo Y, Nomura T, Tanuza N, Hirohashi N, Bono H, Sakaguchi T (2021) Inhibiting SARS-CoV-2 infection in vitro by suppressing its receptor, angiotensin-converting enzyme 2, via aryl-hydrocarbon receptor signal. *Sci Rep* 11(1):16629.
- Tansey EM (2006) Henry Dale and the discovery of acetylcholine. *Comptes Rendus - Biol* 329:419–425.
- Theyel BB, Llano DA, Sherman SM (2010) The corticothalamocortical circuit drives higher-order cortex in the mouse. *Nat Neurosci* 13:84–88.

- Tremblay R, Lee S, Rudy B. (2016) GABAergic Interneurons in the Neocortex: From Cellular Properties to Circuits. *Neuron* 91(2):260-292.
- Ulett JA, Itil TM (1969) Quantitative electroencephalogram in smoking and smoking deprivation. *Science* 164(3882):969-70.
- Uteshev VV (2012)  $\alpha 7$  nicotinic ACh receptors as a ligand-gated source of Ca(2+) ions: the search for a Ca(2+) optimum. *Adv Exp Med Biol* 740:603-638.
- Wignall ND, de Wit H (2011) Effects of Nicotine on Attention and Inhibitory Control in Healthy Nonsmokers. *Exp Clin Psychopharmacol* 19:183–191.
- Woolf NJ (1991) Cholinergic systems in mammalian brain and spinal cord. *Prog Neurobiol* 37:475–524.
- Wu H, Williams J, Nathans J (2014) Complete morphologies of basal forebrain cholinergic neurons in the mouse. *eLife* 3:e02444.
- Wynder EL, Graham EA (1950) Tobacco smoking as a possible etiologic factor in bronchiogenic carcinoma; a study of 684 proved cases. *J Am Med Assoc* 143(4):329-36.
- Xu H, Jeong HY, Tremblay R, Rudy B (2013) Neocortical Somatostatin-Expressing GABAergic Interneurons Disinhibit the Thalamorecipient Layer 4. *Neuron* 77:155–167.
- Yuan M, Cross SJ, Loughlin SE, Leslie FM (2015) Nicotine and the adolescent brain. *J Physiol* 593:3397–3412.
- Zhang H, Ma S, Han T, Qu G, Cheng C, Uy JP, Shaikh MB, Zhou Q, Song EJ, Sun C (2021) Association of smoking history with severe and critical outcomes in COVID-19 patients: A systemic review and meta-analysis. *Eur J Integr Med* 43:101313.

## D. 第 2 章：

### マウス聴覚野における音誘発性神経活性と活性化領域の皮質内および皮質下ニコチン性制御

#### D-1. 要約

ニコチンの全身投与は、聴覚皮質における音誘発性神経活動を制御することが知られているが、聴覚皮質表面全体の音誘発性神経活動をどのように調節しているかは未だ知られていない。本研究では、フラビンタンパク質蛍光イメージングを使用してこれを検証した。マウスに 20 kHz の振幅変調 (AM) 音を与えたところ、聴覚皮質のフラビンタンパク質蛍光が増加し、一次聴覚皮質 (AI) と推定される部位で蛍光強度の最大値が観測された。5 kHz の AM 音は、少なくとも 3 つの皮質領域、AI、二次聴覚皮質 (AII)、そして前側聴覚皮質 (AAF) を活性化した。ニコチンによって、音活性皮質領域が拡大し、さらに AI における 20 kHz と 5 kHz の音刺激によるそれぞれの活性最大部位ともう一方の音の活性最大部位 (20 kHz の音刺激における 5 kHz の活性最大部位) においても音誘発蛍光強度の増強が見られた。このニコチン性増強は、それぞれの音の活性最大部位よりも、もう一方の音の活性最大部位の方が大きかった。α4 およびβ2 サブユニットで構成されるニコチン性アセチルコリン受容体 (α4β2\* -nAChRs) の阻害剤である Dihydro-β-erythroidine (DHβE) を皮質内投与したところ、蛍光強度の最大部位においてニコチン性増強が阻害されたが、活性領域の拡大は阻害できなかった。これらの結果から、ある音に対する活性最大部位における局所神経活動によるニコチン性増強は、皮質内α4β2\* -nAChRs を介しており、また、ニコチンによる音活性領域の拡大は、視床・皮質伝達のニコチン性増強に依存している可能性が示唆された。

## D-2. 背景・目的

全身性ニコチン曝露は、健常者の非喫煙者における聴覚認知機能（例えば、注意行動に関連した事象関連電位）の増強を引き起こすことが知られている（Knott et al., 2009; Smucny et al., 2015）。このニコチン誘導性知覚増強は、注意・集中のフィルターシステムの向上を促す薬剤効果によって引き起こされる（Friedman et al., 1974; Adler et al., 1992; Kassel, 1997; Domino & Kishimoto, 2002; Gilbert et al., 2007; Behler et al., 2015; Smucny et al., 2015）。聴覚刺激への注意は、聴覚皮質の刺激に対する反応を増強し（Woldorff et al., 1993; Kerlin et al., 2010）、これは、注意された刺激に対するニューロンの応答性の増強に起因していると考えられている（Okamoto et al., 2007; Fritz et al., 2007b; Neelon et al., 2011）。一次聴覚皮質（AI）では、注意・集中は、あるタスクに関連しない音への応答を抑制すると共に、タスクに関連する音への応答を強化することで、周波数チューニングを強化していることが明らかになっている（Ohl & Scheich, 1996; Fritz et al., 2007a; Atiani et al., 2009; Galindo-Leon et al., 2009; O'Connell et al., 2014）。注意・集中は二次聴覚皮質（Bidet-Caulet et al., 2007; Herdman, 2011）、および聴覚連合領域（Grady et al., 1997; Jäncke et al., 1999）においても音誘発性反応の増強を引き起こすと考えられている。注意・集中のように、ニコチンの投与により音誘発反応を強化し、AIの周波数チューニング曲線を鋭くすることが示唆されているが、他の聴覚皮質領域への影響についてはほとんど知られていない。

ニコチンの音誘発性反応の増大を引き起こす仕組みは、音誘導性の皮質活性の持続時間の増強と特性周波数（Characteristic frequency; CF）音の強度に対する閾値の減少（Liang et al., 2006）、閾値に近い音の強度における反応の増強（Liang et al., 2008）、そしてCF音誘発性の興奮性シナプス活性の増強と非CF音での減少（Kawai et al., 2011; Intskirveli & Metherate, 2012）などが知られている。これらのニコチンの影響は、皮質内のニューロンにおいて（Askew et al., 2019; Kawai et al., 2011, 2013; Intskirveli & Metherate,

2012) および、皮質下でのニコチン性制御 (Askew et al., 2017; Sottile et al., 2017a, 2017b; Kawai et al., 2007; Tebecis, 1970) の複合的な作用であると考えられる。これらの結果から、全身性ニコチン曝露が、上行性聴覚経路のニューロンを直接調節することによって、認知機能を向上させる可能性があることを示唆している。また、これまでの研究では、局所的に AI 内に垂直に挿入された直線配列の多点電極を用いた局所電場電位 (LFP) または LFP から得られる電流源密度 (CSD) 解析により提唱されてきた (Kawai et al., 2007, 2011; Intskirveli & Metherate, 2012, 2016, 2021; Askew et al., 2017)。LFP はシナプス性反応を高い時間分解能で観測できるが (Einevoll et al., 2013)、一方で、観測できる電位変化は電極周辺部 (半径約 140  $\mu\text{m}$ ) に限定された部位のみである考えられており (Buzsáki, 2004)、皮質活性の拡がりの検出のためには、皮質領域を横切った多点電極の設置が必要となってしまう。そのため、ニコチンが AI 以外の皮質領域の神経活動にどのように影響するか、また一次及び非一次領域における神経活性の拡がりの制御については、ほとんど知られていない。急性的なニコチン曝露の空間的な影響を観測した研究として、ニコチンが側頭皮質を含む多くの脳領域で、血流の酸素化度合いに依存した信号である BOLD (Blood oxygenation level-dependent) 信号の増強を引き起こすことが知られている (Li et al., 2008; King et al., 2011; Bruijnzeel et al., 2014)。また、二次側頭皮質 (Te2) へのニコチン投与により、足底刺激とペアリングされた音に対する恐怖反応が減少することが知られている (Cambiaghi et al., 2015)。二次皮質におけるニコチンの影響はヒトの感覚皮質でも知られており、そこではニコチン曝露が一次及び二次体性感覚皮質での体性感覚依存的な変動関連反応に影響があった (Kodaira et al., 2013)。これらのデータは、ニコチンが複数の聴覚皮質の神経活性に影響を与えている可能性を示唆している。本研究ではこれらを、フラビン蛋白自家蛍光イメージング (FAI) を用いて検討した。

FAI は、開頭手術なしで麻酔下状態の動物で、感覚誘導性神経活性における空間的・時間的变化を観

測することができる (Shibuki et al., 2003; Murakami et al., 2004; Reinert et al., 2004; Weber et al., 2004; Takahashi et al., 2006; Hishida et al., 2007; Kubota et al., 2008; Tsukano et al., 2015)。フラビンタンパク質の蛍光反応は、生体内では主に、イオンチャンネル型グルタミン酸受容体 (AMPA) を介した後シナプス活性を仲介しており (Reinert et al., 2004; Hishida et al., 2007)、ミトコンドリア呼吸にも起因していると予測されているが、ヘモグロビンによる酸素供給や血圧には起因しないとされている (Reinert et al., 2004; Husson et al., 2007; but see Takahashi et al., 2018 for hemoglobin-dependent interference)。このイメージングでは、内因性フラビンタンパク質の蛍光変化、すなわちミトコンドリアのエネルギー代謝活性を介した FADH<sub>2</sub> (非蛍光型) から FAD (蛍光型) への転換を利用している (Reinert et al., 2007; Shuttleworth, 2010)。FAI は 200 ms 以内の神経反応を検出でき、刺激開始から 500 ms 付近で蛍光変化の最大値を見ることができる (Honma et al., 2013)。マウス聴覚野では、音誘発性のフラビン反応が直径 300 μm 程度の比較的小さい皮質領域を特定でき、AI における周波数地図を描画可能で、さらに一次と非一次、すなわち二次聴覚領域 (AII) と前側聴覚領域 (AAF)、背内側領域 (DM) のサブ領域を同時に検出することが可能である (Kubota et al., 2008; Tsukano et al., 2016; Yanagawa et al., 2017)。本研究では、この手法の強みを生かし、麻酔下のマウスにおける、音誘発性の聴覚皮質活性の時空間的な性質が、全身性ニコチン曝露によってどのような調節がなされるか検討した。

### D-3. 材料・方法

#### 動物

当研究で使用した全ての動物に対する処置は、Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of laboratory Animals, 2011)

に基づき管理され、創価大学動物実験委員会で認められたものである（承認番号: 18013, 19010, 20009, 21007）。動物は 12 時間の明暗周期下で飼養保管用施設にて収容されている。本研究の全ての実験において、C57BL/6J 系統の生後 36-40 日の雄マウスを使用した。実験終了後は、ウレタンの過量投与にてマウスを速やかに殺処分した。

### 生体内フラビンタンパク質蛍光イメージング

マウスはウレタン (1 mg/kg, Sigma) とキシラジン (13 mg/kg, Sigma) を腹腔内投与 (i.p.) で麻酔し、ヒーターマット上で 35°C を維持した。追加の麻酔は皮下カテーテルにより、ウレタン 0.2 mg/kg、キシラジン 2.6 mg/kg を必要に応じて補充した。頭頂部の毛を剃った後、1% リドカイン (Cat No. 125-05681, Wako) を頭頂部の皮下に投与し、0.25% ブピバカイン (Cat No. 88262, LKT laboratories) を頭頂部に塗布し、開頭手術による痛みが軽減されるよう局所麻酔した。頭蓋骨を露出させたあと、左聴覚皮質周辺の頭蓋骨表面を削り、薄く滑らかにした。薄くした頭蓋骨に 15 分以上、ミネラルオイルを浸した紙で覆った。頭頂部の頭蓋骨には、頭部固定用のアクリル板をセメントで固定し、防音チャンバー内のマニピュレーターでマウスの頭部が動かないよう金属版で水平に固定した。

フラビンイメージングは、4x 対物レンズ (UPL SApo, Olympus) を用いて、聴覚野皮質の上の頭蓋骨が見えるよう、70° 傾けた落射型蛍光顕微鏡 (BX50, Olympus) 上の CMOS カメラ (ORCA-Flash 4.0, Hamamatsu Photonics) で画像を得た。カメラは AD コンバーター (Power1401-3A, CED) を介して、Spike2 ソフトウェアで制御した。ダイクロイックミラー (T495lpxr, Chroma) を介した励起フィルター (ET470/40x, Chroma) を通った LED 光 ( $470 \pm 25$  nm, M470L3, ThorLabs) を用いて聴覚皮質を照射し、 $525 \pm 25$  nm (ET525/50m, Chroma) の蛍光フィルターを使用して蛍光反応を検出した。LED 光は Spike2 を介して、

T-cube LED ドライバー (LEDD18, ThorLabs) で制御した。振幅変調脈音 (Amplitude-modified tone; AM 音) は、5-20 kHz の搬送周波数を 20 Hz sine 波で調節 (WavePad Sound Editor, NCH) し、ASA mini sound analyzer (Etani Electronics, Japan) で音圧 (SPL; sound pressure level) を測定し、キャリブレーションしたものを使用した。音は PC 上の Tone Generator (NCH) で作られ、デジタルオーディオボード (SE-90PCI, Onkyo, Japan) を介して PC から接続されている増幅器 (SRM-323S, STAX) で増幅し、マウスの耳から前方へ 10 cm 離れた位置にあるヘッドホン (SR307, STAX) より出力した (Fig. 1A)。撮影時を含め、マウスの操作をする時以外は、遮光カーテンで防音チャンバー内を暗室にした。

イメージングの実験手順として、約 9 sec 間のトライアルを 8 回繰り返した。各トライアル 60 枚の画像 (ビニング後 352 x 352 pixels, 2.43 x 2.43 mm) を、0.14 sec /枚の露光時間と 10 msec のインターバルを設けて 6.67 Hz で撮影した。このトライアルを、8 回繰り返し 1 セットとし、合計 480 枚の画像を撮影した (0.025 Hz, 計 289 sec /セット)。撮影中は LED を ON にしたままにし、1 トライアル終了後、すぐ OFF にする。各トライアルで、AM 音は 31 枚目の画像 (トライアル開始 4.5 sec 後) から、500 msec (5 msec ランピング) の長さで出力した。画像は MATLAB ソフトウェア (MathWorks) で自作したプログラム (*I. 補足資料*) で記録・解析した。

### イメージング解析

MATLAB を使用し、各トライアルの音開始直前の 3 つの画像 (28-30 枚目) の光強度の平均を 60 枚の全ての画像から減算し、平均化した後、1 セット分 (8 トライアル分) を平均した。カメラなどの人工ノイズと生体ノイズを除去するため、各画像をガウシアンフィルター (kernel = 15 x 15,  $\sigma = 5$ ) で処理し、さらに、7 x 7 pixels の空間平均を行い、音活性中の 31-34 枚 (音開始から 0-0.59 msec) で最も低い

強度の場所を特定し、これを内部標準として、すべての画像における同じ場所の強度を減算した (Supplementary Data 1)。これらの処理により、AM 音によって誘発されたフラビン蛍光反応を疑似カラー画像で再現することができた (Fig. 1B, right)。

最大活性強度 (peak intensity) の解析においては、音活性中の 31-34 枚の画像で最も高い強度を特定し、すべての画像における同じ場所の強度を peak intensity として測定した。5 kHz においては、ROI (直径 150-250  $\mu\text{m}$ ) を設定し、AI, AII, AAF それぞれの領域における最大活性強度 (peak intensity) を求めた。また、活性領域 (Area) の解析においては、音開始直前の 3 つの画像の強度の標準偏差の 12.5 倍の閾値以上のものを検出し、pixel 数から実際の面積 (21025 pixels/mm<sup>2</sup>) を特定した。

### 薬剤投与

投与するニコチンは、ニコチン酒石酸塩水素塩 (N-5260, Sigma) を実験当日に生理食塩水で 1 mg/ml に溶かしたものを使用した。ニコチン投与においては、少なくとも 3 セット、20 kHz と 5 kHz で安定したイメージングができた後、2 mg/kg フリーベースとなる濃度で薄めたニコチンを腹腔内投与し、すぐにイメージングを開始した。1 セットごとに、5 kHz と 20 kHz を交互に与え、それぞれ 5 セットずつ行った。生理食塩水 (Saline) 投与の実験も、同様の方法で行った。

ニコチンのアンタゴニストとして、10  $\mu\text{M}$  dihydro- $\beta$ -erythroidine (DH $\beta$ E, D-149, Sigma) もしくは 10 nM methyllycaconitine (MLA, M-168, Sigma) を、人工脳脊髄液 (ACSF: 125 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM Glucose, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>) で溶かしたものを用意した。この溶液を、1  $\mu\text{l}$  のハミルトンシリンジ (7001KH) の先端にエポキシ樹脂で取り付けられたガラスインジェクター (先端直径 30-50  $\mu\text{m}$ ) に満たした。溶液の皮質内投与においては、20 kHz によって特定された聴覚反応

領域から、背側へ 300-500  $\mu\text{m}$  離れた場所の頭蓋骨に穿孔し、溶液で満たされたガラスインジェクターを、皮質表面から 400-500  $\mu\text{m}$  垂直に下した。DH $\beta$ E、MLA もしくは ACSF (vehicle) 溶液を、1 分間に 50 nl ずつ 10 分間かけて投与した。投与後、ニコチンの全身投与前に、少なくとも 3 セット、5 kHz と 20 kHz で安定したイメージングを行った。

### 統計解析

統計学的な比較は Microsoft Excel と MATLAB ソフトウェアを用いて行った。統計学的有意差は paired t-test、Student's t-test もしくは one-way ANOVA ( $\alpha = 0.05$ ) とその後の Tukey-Kramer test にて特定した。全平均データは平均  $\pm$  標準誤差 (SEM) で表している。

## **D-4. 結果**

### 聴覚野における音誘発性フラビン蛍光変化

フラビン蛍光イメージング (FAI) は、麻酔下のマウスにおいて、開頭手術なしで直径 1 mm 以上の広範な皮質領域における神経活性依存的な代謝変化を捉えることができる (Shibuki et al., 2003; Takahashi et al., 2006; Kubota et al., 2008; Baba et al., 2016; Tsukano et al., 2016)。本研究では、音誘発性のフラビン反応を得る際に、安定した記録のためマウスを水平に置き、落射型顕微鏡を 70° 傾け、4x 対物レンズを、励起フィルターを介した青色 LED と 500-550 nm の幅を持つ吸収フィルターと共に用いた (Fig. 1A)。蛍光変化の時間的経過を観察するために、9 sec 間の各トライアルで 60 枚の写真を撮影し、30 枚目の画像 (トライアル開始 4.5 sec 後) から AM 音 (500 ms) を与えた (Fig. 1B, 詳細は材料・方法を参照)。各トライアルでは、0.15 sec ごとに 60 枚の画像を取得し、各画像は 0.14 sec 間で撮影した (撮影間には 10 msec

の静止時間を取った)。各トライアルを8回、0.025 Hz (計4分49秒)で繰り返し、平均化した。各時点で平均化したあと、ガウシアンフィルターで人工ノイズを低減し、空間平均を取ることで生体ノイズを平滑化した。通常、蛍光強度は、開始4 sec間で徐々に減衰(ランダウン)し、音刺激前の0.44 sec間は平行に近くなった(Supplemental Figure 1)。刺激に起因する強度変化からこの減少を除去するために、音開始から0 secから0.59 secまでの4つの画像の中で、7 x 7 pixelsで平均化した最小強度の領域を策定し、それぞれ測定した60枚の画像から策定した座標の蛍光強度を測定し、1枚の画像全体の強度から減算した。この策定した領域は音によって反応のない部位であり、音のシグナル中での背景ノイズを除去するために使用でき、この減算により安定したベースラインを得られた。

Fig. 1Cは5 kHzと20 kHz AM音(60 dB SPL)に対する代表的なフラビン蛍光変化を示している。5 kHzの音刺激では3つの異なる活性領域を見ることができ、先行研究より(Tsukano et al., 2015)、それぞれ一次聴覚皮質(AI)、前側聴覚領域(AAF)、そして二次聴覚皮質(AII)と予測される(Fig. 1D)。20 kHzの音刺激は、通常、上記の3つの皮質領域が組み合わさったような広い活性を示した。20 kHzの音刺激に反応する最大活性強度(peak intensity)は、AIの5 kHzでの最大活性部位から平均して $522 \pm 50 \mu\text{m}$  (n = 9)の距離にあった(Fig. 1D 右下)。次に、20 kHz音刺激開始0.29 sec後の蛍光変化の音強度依存性をテストした(Fig. 1E)。音刺激開始0.29 sec時点での最大活性強度と活性領域の大きさ(activated area)は、音の強度が増加するにつれて同様に増加し、70 dB SPL前後で両パラメーター共に頭打ちとなった。両パラメーター共に、約60 dB SPLで最大応答の半分の応答が得られた。以降の実験では、フラビン蛍光イメージングの蛍光強度の定量化の検出限界もしくは頭打ちによって、ニコチンの効果の観察に影響を及ぼさないようにするために、50-60 dB SPLのAM音を使用した。

## 音誘発性皮質活性におけるニコチンの影響

次に、全身性ニコチン曝露 (2 mg フリーベース/kg, i.p.) が、AI と推測される部位における音誘発反応に及ぼす影響を調べた。ニコチンは、CF 部位で CF 音誘発反応を増強し、非 CF 音誘発反応を減少させることが知られており (Kawai et al., 2011)、音誘発反応の空間パターンを調節する可能性がある。20 kHz と 5 kHz の両方の音刺激のベースラインとして少なくとも 3 つの安定した画像を取得 (30 分以上) した後、20 kHz と 5 kHz の音を交互に 10 回連続与えた (各周波数 5 回ずつ、合計 50 分間)。最大活性強度 (Peak intensity) は、各音の周波数のベースライン応答の最大部位で、時間経過 (60 枚の画像) 全体で計測した。音誘発性の活性強度は、刺激開始 0.59 sec で最大に達し、平均最大活性時間は  $0.64 \pm 0.08$  sec だった。ニコチン投与下では、音刺激開始 0.29 sec から 0.74 sec での最大活性強度が増加し、ニコチン投与後最初の 5 分間の 0.29 sec 時点で約 63% 増加した (Fig. 2A-B, 以後、0 分から 4 分 49 秒は 0-5 min として示す)。ニコチン投与下における平均最大強度に達する時間は、刺激開始後  $0.58 \pm 0.03$  sec であり、投与前と有意的な差は見られなかった (Student's t-test,  $p=0.49$ )。ニコチン投与後、この増強は時間経過と共に減少し、有意的な増強は少なくとも 20-25 分まで続いた (Fig. 2B; また Table 1 も参照)。

本研究では、ニコチンがミトコンドリア機能に影響を及ぼすことが報告されていることを考慮し (Malińska et al., 2019)、全身性ニコチン曝露がフラビントキソクロムパルク質の蛍光にどのような影響を与えるかを、平均化せず、実際の蛍光強度を定量することによって確認した (Supplemental Figure 2)。ニコチン投与により、少なくとも最初の 5 分間は蛍光が有意に低下することから、ニコチンは電子伝達系を阻害し、フラビン補因子の生成を減少させることが示唆された。しかしながら、それにもかかわらず、ニコチン投与後に音による蛍光増加のニコチンによる影響がみられた (Fig. 2B、左)。したがって、音誘発性のフラビントキソクロムパルク質の蛍光反応におけるニコチン性増強の効果は過小評価されている可能性が示

唆される。

次に、反応閾値を超えるフラビン蛍光強度を持つ皮質の活性領域（activated area, 定義については材料・方法を参照）を測定した。活性化された領域は、音刺激開始後 0.59 sec で最大に達した。応答の初期（0-5 分）では、ニコチンによって活性領域が 0.29 sec から 0.74 sec にかけて増加した（Fig. 2C-D）。この増加した活性領域は、ベースライン活性領域のほぼ 3 倍に達した。平均活性領域の大きさは 20-25 分で減少したが、この時点でもまだベースラインの 2 倍以上の拡大がみられ、ほとんどの実験で少なくとも 45 分まで継続した（Fig. 2D, Table 2）。また、活性領域全体の平均強度も増強し、同様の時間的な傾向が見られた（Table 3）。

これらの結果は、ニコチン曝露は、最大強度が増加するにつれて局所神経活動を増加させ、音による活性領域を超えて、大脳皮質の広範な活動を促進し、聴覚皮質のより広い領域における神経細胞の活性が音により誘発されることが示唆された。注目すべきこととして、ニコチン投与により、音誘発性の最大活性部位が 0.59 sec の場合で  $293 \pm 51 \mu\text{m}$  変化した。一方、生理食塩水を投与した対象実験では、最大活性部位の変化がはるかに小さい ( $148 \pm 44 \mu\text{m}$ ) ことから、ニコチンによる活性化が AI における最大活性部位周辺の局所的な皮質活動を変化させる可能性が考えられる。

#### ニコチン影響下における皮質内ニコチン性受容体の関与

上述のニコチンの影響が、皮質内のニコチン性アセチルコリン受容体（nAChRs）によって仲介されるかどうかを調べるために、 $\alpha 4$  および  $\beta 2$  を含む nAChRs ( $\alpha 4\beta 2^*$ -nAChRs) の拮抗阻害剤である  $10 \mu\text{M}$  dihydro- $\beta$ -erythroidine (DH $\beta$ E)、もしくは  $\alpha 7$  サブユニットを含むホモマー ( $\alpha 7$ -nAChRs) の阻害剤である  $10 \text{ nM}$  methyllycaconitine (MLA) を、 $20 \text{ kHz}$  音の反応領域から約  $500 \mu\text{m}$  背側に、マウスに垂直方向

に下ろしたハミルトンシリンジから局所注入した (Fig. 3A)。ビヒクルである ACSF を注入したときに得られた反応と比較して、DH $\beta$ E を注入した場合、ニコチン投与後の音誘発による最大活性強度の増強を抑制できたが、活性領域の増強は阻止できなかった (Fig. 3B-C,E)。一方で、MLA 局所投与では、ニコチンによる最大活性強度や活性領域の増強をほとんど阻害しなかった (Fig. 3D-E)。これらの結果から、神経活動のニコチンによる調節は、最大活性強度部位周辺に局所的に存在する  $\alpha 4\beta 2^*$ -nAChRs を介する一方、活性領域のニコチン性増強には他のメカニズムが関与することが示唆された。

#### AI における非最適周波数の音誘発性最大活性部位に対するニコチンの影響

ニコチンは、CF 部位で CF 音誘発反応を増強し、非 CF 音誘発反応を減少させることが知られているため (Kawai et al., 2011)、次は、2 オクターブ離れた周波数 (非最適周波数) を持つ音によって誘発されたフラビントキニク質蛍光の最大活性部位において、ニコチンによる皮質神経活動の抑制がみられるか観察した。5 kHz 音を与えることで AI および AAF が明確に活性領域を示したマウスにおいて、トノトピー的に AI 内における 5 kHz (非最適) 音の最大強度部位で、20 kHz 音によるフラビントキニク質蛍光強度を定量化した (Fig. 4A-B)。5 kHz 音最大活性部位の時間経過における蛍光強度の変化は、20 kHz 最大活性部位 (最適周波数) と同様に、0.59 sec 付近で最大を示した (Fig. 4B の左図は Fig. 2B の左図と比較している)。ただし、非最適な周波数最大活性部位における蛍光強度の変化は、最適な周波数最大部位よりも変動が大きいことに注意が必要である。生理食塩水 (ビヒクル; Saline) の腹腔内注射では、蛍光強度の変化にほとんど影響がなかったが、ニコチン投与後の初期 (0-5 min) においては、5 kHz 音の最大活性部位で強度が増加した (Fig. 4B-C)。5 kHz の最大活性部位でのこの増強は、20 kHz の最大部位での増強より 2 倍ほど大きかった (133% vs. 63%)。これらの結果は、ニコチンが皮質活動の広がり

を促進することにより、非最適部位でのニューロン活動を強化することを示唆している。

#### 非一次聴覚皮質における蛍光強度に対するニコチンの影響

次に、ニコチンが、非一次聴覚皮質である AAF と AII の音誘発フラビン応答に影響を与えるかどうかを検討した。ニコチン投与後の、音刺激の 2 番目のセット (5-10 min) 中の 5 kHz 音誘発最大強度を解析した。AI における 20 kHz 音誘発最大蛍光変化と同様に、5 kHz 音は、AI においては 0.14 sec で活性変化が始まり、0.59 sec で最大を記録した (Fig. 5A-C)。注目すべきことは、同じ音で、AAF (Fig. 5D) と AII (Fig. 5E) において、同様の最大強度変化の時間的パターンが見られた。ニコチンは、AI だけでなく、いずれの皮質領域においても、0.14-0.44 sec の最大活性部位を有意に増加させるといった、非常に類似した反応を示した (Fig. 5C-E) が、生理食塩水の投与では、この増強は見られなかった (Fig. 5F)。ニコチン投与後の経時変化を調べたところ、こちらも AI 同様の類似したニコチンの影響が示された (Fig. 5G)。これらのデータから、AI、AAF、および AII において、音によって引き起こされるフラビン蛍光変化の時間的パターンが類似しており、ニコチンが一次および非一次の聴覚皮質において、音による皮質神経活動を同様に制御する可能性を示唆している。

#### **D-5. 考察**

これまでの先行研究では、AM (振幅変調) 音は、マウス聴覚皮質において音曝露による神経活性に伴うフラビントタンパク質の蛍光変化が引き起こされることが知られている (e.g., Takahashi et al., 2006; Baba et al., 2016)。本研究で、全身性ニコチン投与は、AI で最適周波数音によって引き起こされる最大活性と活性領域を増加させることが確認された。最大活性の増強は、皮質内の  $\alpha 4\beta 2^*$ -nAChRs によるも

のであることが確認されたが、活性領域の増加は、皮質内のニコチン性受容体の活性化によるものではないことがわかった。音誘発性の活性領域には、最適周波数音応答の最大活性部位のほか、非最適周波数音応答の最大活性部位も含まれており、この部位でのニコチンの影響は最適周波数音応答の最大活性部位の増強よりも大きいことがわかった。特に、音の活性化領域のニコチンによる増大は、皮質内の  $\alpha$ 4 $\beta$ 2\*-または  $\alpha$ 7-nAChRs に依存していないようなデータが示されており、皮質下 (Subcortical) や他のニコチン性受容体活性の影響が、この増大に関与している可能性がある。ニコチン投与は AI だけでなく、AAF と AII でも蛍光強度を増加させた。これらの結果から、全身性ニコチン投与は、一次および非一次の聴覚皮質において、皮質および皮質下の神経回路で nAChRs を活性化し、音によって引き起こされる神経活性のゲインを増加させる可能性が示唆された。

#### 皮質神経活性の観察における FAI の使用について

FAI は、従来の細胞外電気生理学的記録法に比べて、皮質活性の広がり进行评估する上で多くの利点がある。電極挿入による細胞外電気生理学的記録では、脳に損傷を与える可能性があるが、光学イメージングは侵襲的な手術の必要をなくすることができる。単一の電極では電気活動の範囲が制限され、神経活動の高密度なマップを構築することは困難である (Ebner & Chen, 1995)。広範な皮質領域の神経活性を知るためには、複数電極によって詳細な神経活動の空間的な情報を得ることができるが、広い範囲の損傷を避けることはできない。電極挿入は、神経細胞やグリア細胞、またはそれらのネットワークの損傷、さらには電極サイズが大きい場合は血管の損傷を引き起こし、細胞自身の損傷や細胞間ネットワークの破壊を招き、従来の脳構造から異なった状態の脳を観察してしまう危険性を孕んでいる (Chen et al., 2017)。FAI は比較的侵襲的に皮質活動をモニタリングすることができるが、特に重要なこととして、

FAI ではあらかじめ神経回路の接続が判明していない場合でも使用可能なところである。一方、FAI のいくつかの欠点として、時間分解能の低さ、蛍光源の到達する組織の深さの限界、および空間分解能の低さ（従来のカルシウムイメージングのような神経細胞単位のモニタリングは不可）である。しかしながら、本研究では、上記で説明した利点を活かし、マウスの聴覚皮質におけるニコチンの音誘発性皮質神経活動への影響を測定した。

### AI の聴覚情報処理におけるニコチン制御

本研究では、イメージング領域の近くにおける DH $\beta$ E の皮質内投与によって、全身性ニコチンに伴う音誘発性活性最大強度の増強が阻害されたが、活性領域の拡がりには影響を与えなかった。この結果は、先行研究結果と一致し、視床・皮質活動への  $\alpha$ 4 $\beta$ 2\*-nAChRs を介したニコチンの関与の可能性が示唆される（背景・目的を参照）。私たちは、先行研究の細胞外電気生理学的記録に基づき、ニコチンに対する感受性が比較的高いとされる青年期（P26-30）の雌マウスを使用した（Kawai et al., 2011）。局所電場電位（LFP）記録および電流源密度（CSD）解析により、 $\alpha$ 4 $\beta$ 2\*-nAChRs の活性化が、AI の第 2-4 層における「早期皮質内活性」（電流シンク発生から 3-20 ms）および「遅期皮質内活性」（電流シンク発生から 30-80 ms）のフェーズにおいて、CF 音誘発性の電流シンクを増強することが知られている。しかし、皮質内への DH $\beta$ E 投与は、視床・皮質入力とされる、上層の最も早い活性開始が記録される部位における、電流シンクの「入力」フェーズ（シンク発生の最初の 3 ms）のニコチンによる増強を阻害できなかった。この増強は視床・皮質系経路における  $\alpha$ 4 $\beta$ 2\*-nAChRs の活性化および視床・皮質伝達の同期化によるものである可能性がある（Kawai et al., 2007）。先行研究と今回の結果は、全身性ニコチン投与が、異なる場所（すなわち、視床・皮質繊維と皮質内神経細胞）に分布する  $\alpha$ 4 $\beta$ 2\*-nAChRs を活性化し、毛

帯視床ニューロンからそれらの投射を受ける皮質領域への情報伝達を増強し、皮質内の神経活動を増加させるという考えを支持するものである。皮質内  $\alpha 4\beta 2^*$ -nAChRs 阻害下での活性化領域の拡大は視床・皮質伝達の皮質下部の増強による可能性がある。しかしながら、ニコチンの他の脳領域への関与や活動（例えばミトコンドリアの代謝活動など）への影響は排除できず、さらなる研究が必要である。

本研究の当初の動機は、AIにおける LFP および CSD 解析に基づいて示唆されているニコチンによる聴覚情報処理のフィルタリングをさらに示すことだった (Metherate et al., 2012)。私たちの目的として、このニコチンによるフィルタリングを皮質表面におけるフラビンタンパク質の蛍光変化を観察することで可視化することだった。当初の予測では、ニコチン投与により、最適周波数音による最大活性強度が増強される一方で、最適周波数の最大活性部位から非最適周波数の最大活性部位に向かう皮質活動の拡散が抑制されると考えていた。しかし、本研究では、ニコチン投与によるフィルタリング現象は観察されず、最適周波数の最大活性部位だけでなく、非最適周波数の最大活性部位（5 kHz および 20 kHz の最適周波数音の両方に対して）においても、最適周波数音によるフラビンタンパク質応答が増強されることが示された。当初の予測を支持する証拠が得られなかった理由としては、非最適周波数の最大活性部位で観察されたフラビンタンパク質蛍光変化における抑制された活動と増強された活動の統合に起因する可能性がある。

最適周波数音反応と非最適周波数音反応のニコチンによる調節の程度とタイミングの違いにより、最適周波数音誘発活動が優位になり、音誘発性の蛍光強度が増強される可能性がある。以前の研究で、LFP/CSD 解析では、ニコチンが上層での CF 音誘発の「入力」および皮質内成分を増強することがわかっている（上述を参照）。特に、「入力」成分はニコチンにより約 70-80% 増強されたが、「早期皮質内活性」および「遅期皮質内活性」成分は上層の 100  $\mu\text{m}$  上で大きな音誘発の電流シンクを示し、わずかに

10-20%増加した。これらのデータは、CF 音刺激に対するニコチンによる視床・皮質入力の増強が皮質内の活性化よりも強いことを示唆し、最適周波数音反応の非最適周波数最大活性部位でのニコチンによる増強が最適周波数最大活性部位よりも比較して大きいという、私たちの結果に対して寄与し得るものである。その一方、非 CF (CF よりも 2 オクターブ上または下) 音誘発の電流シンクにおけるニコチンによる抑制は、電流シンクの「初期」成分 (シンク開始から最初の 20 ms) の振幅の一時的な低下であった。低下の程度に関しては、動物の年齢や性別に依存するが、強い抑制ではなかった (平均して最大で 0-20%)。さらに、非 CF 音誘発応答の「遅い」成分 (シンク開始から 30-80 ms) は、ニコチンの影響で 20-30%増強され、抑制されることはなかった。したがって、フラビンタンパク質の蛍光強度によって測定される代謝活動は、非最適周波数の最大活性部位における初期の抑制と、後に続く遅い応答の増強を組み合わせ、シナプス活動の広がり、総合的な影響を反映している可能性がある。これは、ニコチンが最大活性部位の周囲領域および非最適周波数の最大活性部位で、最適周波数音誘発の蛍光強度を増強したという結果を支持するものであると考える。

FAI を使用して、ニコチンのフィルタリング効果を検出できなかった別の理由は、LFP/CSD と FAI の測定応答特性、時空間分解能、感度の違いが挙げられる。LFP/CSD における応答特性は、フラビンタンパク質の蛍光反応に統合される可能性がある。LFP は、細胞膜を介したシナプス電流と双極子によって形成される、記録部位周辺に制限された細胞外電位変化のことである (Einevoll et al., 2013)。CSD は多点同時記録された LFP を、電極の配列方向 (例えば、皮質に対する深さ方向) で 2 階微分をすることで、電流源を推定する方法である (Mitzdorf, 1985) が、この CSD 解析は、電極位置の深さに沿ったシナプス活動の時空間情報を得ることができ、ニューロンの情報処理のパターンを検出することが可能である (Mitzdorf, 1985; Nicholson & Freeman, 1975)。シンクの開始は、マウスでは音刺激開始から約 17 ms であ

る (Intskirveli et al., 2016)。一方、フラビンタンパク質の蛍光変化は、主に入力後の活動に関連し、細胞内イベントの代謝要求に依存することが知られている (Llano et al., 2009; Reinert et al., 2007; Shibuki et al., 2003)。音刺激によるフラビンタンパク質の蛍光応答が始まる時間は、百 msec から数百 msec の範囲にある (上記参照)。フラビンタンパク質の蛍光変化はシナプス活性の後に起こり、細胞内の信号処理の統合を必要とするため、応答開始時間が長くなる。したがって、FAI を使用してニコチンのフィルタリング効果を検出することは、細胞内の統合の過程で埋もれてしまう可能性がある。FAI によってモニタリングされた音による活動のニコチン性制御は、フラビンタンパク質の蛍光変化の空間分解能にも限界がある可能性がある。本研究では、AM 音がマウスの AI、AAF、および AII でフラビンタンパク質の蛍光応答を引き起こすことが、先行研究の結果と比較して確認された (Honma et al., 2013; Takahashi et al., 2006)。音によって活性化される領域の空間分解能は、先行研究で測定されたものと比較可能であり (例: Tsukano et al., 2015; Baba et al., 2016)、5 kHz および 20 kHz 音によって引き起こされる最大活性部位を使用して、音誘発反応のニコチン性制御を調べた。5 kHz 音と 20 kHz 音によって誘発される最大活性部位は、平均で約 550  $\mu\text{m}$  離れていることがわかった。*in vitro* でも、フラビンタンパク質の蛍光強度の分解能は 100-200  $\mu\text{m}$  を超える (Llano et al., 2009)。LFP のように外部電極によって捕捉される電気信号を生成するニューロンの距離は推定で約 140  $\mu\text{m}$  程度と言われている (Buzsáki, 2004) が、100  $\mu\text{m}$  置きに配置された複数の電極を使用した層別解析により、明確な応答特性を得ることができる。一方、皮質表面で検出されるフラビンタンパク質の蛍光は、光の散乱や代謝活性を受けるフラビンタンパク質源の距離に依存すると考えられるが、第 2/3 層の多数の樹状突起と細胞体に分布するミトコンドリアからの集合的な蛍光変化を反映していることが考えられる (Tohmi et al., 2014)。したがって、ニコチンによるフィルタリング効果は、空間的に分散した複数の内在性蛍光信号源によって不明瞭になってしまう可

能性がある。さらに注意すべきこととして、血液中のヘモグロビンがフラビンタンパク質の発する緑色蛍光を吸収するため、フラビンタンパク質の蛍光変化がヘモグロビンによる影響を受ける可能性がある (Takahashi et al., 2018)。ヘモグロビンによるこの干渉は、*in vivo* のイメージング下では特に注意すべき点である。しかし、私たちの画像解析では、音誘発性の蛍光変化に使用された同じ画像内の背景信号を内部コントロールとして使用したことにより、ヘモグロビンの干渉や光散乱ノイズが、音誘発性信号に与える影響を間接的に減らすことができた。フラビンタンパク質の蛍光の空間的解像度と感度を向上させるためには、Takahashi らによって実施されたようなより直接的な方法 (より良い光路系の確保など) を用いるなど、さらなる研究が必要であると考えられる。

最後に、私たちの解析はフラビンタンパク質蛍光の感度の低さによって制限されている可能性がある。*in vitro* の先行研究において、ベースラインから 1% 以上の蛍光強度の増加がみられる場合、それはシナプス応答に対応している、つまり、*in vitro* では電気刺激で誘発されたシナプス電位とフラビンタンパク質の蛍光の活性化の閾値は区別できなかった (Llano et al., 2009)。フラビン蛍光シグナルのこれらの特性が *in vivo* で同じように適用できるかどうかは不明だが、もしそうであった場合、私たちのイメージングシステムにおけるフラビン蛍光シグナルの限界で、1% 未満のフラビンシグナルを示す非最適周波数部位でのニコチン性フィルタリングの検出を見落としている可能性がある。

#### フラビンタンパク質蛍光変化におけるニコチンの影響

ニコチンのミトコンドリアへの影響は、観測結果の解釈に影響を与える可能性がある。私たちの解析では、全身性ニコチン投与により、5 分後にフラビンタンパク質蛍光が低下することが明らかになった (Supplemental Figure 2)。この蛍光の低下は、全身性ニコチン曝露による血漿中ニコチン濃度の変化に

似ており、濃度は5分後に最大を迎え、その後15分後には約90%、60分後には約97%減少することが知られている (Pekonen et al., 1993)。したがって、蛍光の低下は、一過性の血漿中ニコチン濃度の上昇が、直接的に電子伝達鎖の複合体 I での電子フローを阻害し (Cormier et al., 2001; Xie et al., 2005)、フラビン補因子であるフラビンモノヌクレオチド (FMN) および、それに伴って、酸化型である FAD が複合体 II で減少することによるものと考えられる。ニコチンによるフラビタンパク質の音誘発性蛍光反応の増強が、初期の5分以降、ミトコンドリアへの阻害がない状態でも起こっている可能性はあるものの、ミトコンドリアの阻害下でなお、ニコチンがフラビタンパク質の音誘発性蛍光変化を増強するメカニズムは明確ではない。ニコチンと音刺激でリクルートされるミトコンドリア集団が、細胞単位、もしくは細胞内部位や機能単位で異なる可能性がある。先行研究を繙くと、シナプスと非シナプスのミトコンドリアの機能が異なっていることが知られている (Brown et al., 2006; Davey et al., 1997; Lores-Arnaiz & Bustamante, 2011; Naga et al., 2007; Petersen et al., 2019; Villa et al., 2006)。ニコチン曝露と音刺激が同じミトコンドリア集団に作用するのかどうかは、今後の研究が要求される。

#### AAF および AII におけるニコチン性制御

先行研究では、カルシウムイメージング (AI, AAF, AII, 超音波領域) (Issa et al., 2014; Liu et al., 2019) や FAI (AI, AAF, AII, DM) (Tsukano et al., 2016) を用いて、マウスの聴覚皮質で少なくとも4つのトポピー領域が活性化されることが明らかにされている。しかし、本実験では、5 kHz の音刺激では、AI と DM を空間的には区別できなかったが、AI (または DM)、AAF、AII は識別可能であった。これらのデータは、MGv における神経細胞が AI だけでなく AAF (Lee, 2004; Polley et al., 2007; Redies et al., 1989; Tsukano et al., 2017) や AII (Tsukano et al., 2017; Ohga et al., 2018; Storace et al., 2011) にも直接投射してい

るとする先行研究結果に一致している。また、ニコチン性制御は、これらの3つの皮質領域間で違いはみられなかった。ニコチン性受容体は、側頭葉皮質 (Lavine et al., 1997) や、視床の内側膝状体からの軸索が通過する領域である膝状体側頭葉線維 (Bieszczad et al., 2012) の視床・皮質終末に密集して存在していることが知られている。これらの解剖学的データは、ニコチン投与により、MGv ニューロンが  $\alpha 4\beta 2^*$ -nAChRs を介したニコチン性活性に応答すること (Sottile et al., 2017b)、そして、視床・皮質系経路の軸索線維における  $\alpha 4\beta 2^*$ -nAChRs を介した視床・皮質伝達の同期化が起こるといった機能的な証拠と一致している (Kawai et al., 2007)。これらの研究は、ニコチンが MGv から AI、AAF、AII への視床・皮質伝達を強化する可能性を示唆している。ただし、認知機能における3つの聴覚領域の解剖学的な違いを含む潜在的な違いを考慮すると (Bidet-Caulet et al., 2007; Herdman, 2011; Shi et al., 2019)、音情報処理およびそのニコチン調節の回路機構は異なると考えられる。将来的には、聴覚皮質領域の異なる性質を明らかにするために、より高い時間的および空間的分解能での研究が必要となる。

以上より、本研究では、これまで知られていたようなニコチン性フィルタリング効果を視覚化することはできなかったが、ニコチンが音刺激誘発性の皮質活性に及ぼす影響の新たな知見を提示できた。AII、AAF でもニコチン性制御の影響が AI 同様に強く表れることから、聴覚システムの高次の情報処理においてもコリン作動性制御が大きな役割を果たす可能性が示唆された。背景・目的で示したように、全身性ニコチン曝露が、健常者の非喫煙者における聴覚認知機能の増強を引き起こすメカニズムとして、フィルタリング機構が関わっていることが示唆されているが、今後の展開として、AII、AAF といった高度領域を含む複合的解析とそれと同時によりミクロな視点、神経細胞および微小回路の活性化のメカニズムを知ることで聴覚野における注意集中のメカニズムの解明がなされると期待される。

D-6. 

Figure 1

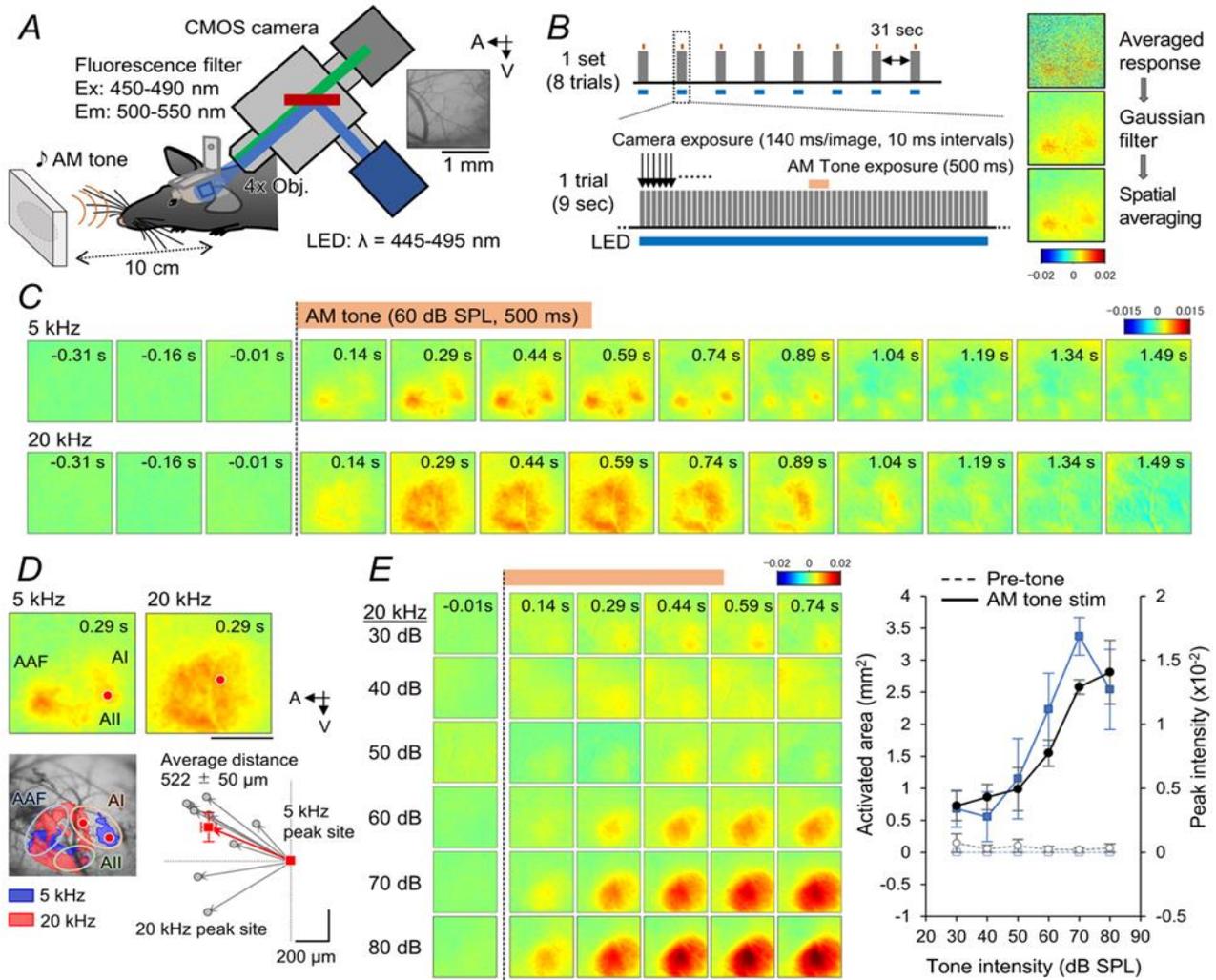


Fig. 1. マウス聴覚皮質における音刺激によるフラビン蛍光反応

(A) FAI のセットアップの概略図。右の皮質画像は聴覚皮質直上から観測した明視野画像を示している。A は頭側、V は腹側を表す。

(B) イメージングプロトコルと画像解析の概略図。左側は 1 セットのイメージングを示しており、0.025 Hz で繰り返される 8 つのトライアル (1 トライアル 9 sec、31 sec 間隔) を示す。1 トライアルは 60 枚の画像 (0.14 sec の露光時間、黒い矢印) を 6.67 Hz (10 msec の静止時間) で撮影し、トライアル中は LED を照射し続ける (青線)。トライアル開始から 4.5 sec 後に AM 音 (刺激時間 500 msec、オレンジ線) を与えた。右側には、画像処理のフローチャートが示されており、60 枚の画像ごとに 8 トライアルの平均化 (上)、ガウシアンフィルター (中間)、7 x 7 pixels の空間平均化 (下) の順で画像処理を行った。カラーバーは、音刺激前のベースライン (28-30 枚目の画像 : 音刺激前の 3 枚の画像) の平均強度に対する蛍光変化を示した。

(C) 5 kHz (上) および 20 kHz (下) の音に対する代表的な時間経過画像。画像中にある各数値は、音刺激開始 (縦破線) からの時間を示している。オレンジ線は AM 音刺激 (500 ms) を示した。

(D) AI の最大活性強度の位置 (Peak site) を解析した。上側は 5 kHz および 20 kHz 音に対する蛍光反応の画像を示し、それぞれの最大活性強度の位置を赤点で示した。黒いスケールバーは 1 mm を表す。下側左は、5 kHz (青) および 20 kHz (赤) 音の応答領域を明視野画像上の対応する最大活性部位に重ね合わせたものである。楕円はおおよその AI (オレンジ)、AAF (青)、AII (緑) を表す。下側右は、5 kHz の最大活性部位から個々 (灰色) の、および平均 (Average distance、赤) の 20 kHz の Peak site までの方向と距離を示した (n = 9)。

(E) FAI の音強度依存性を示した。左側は、20 kHz の 30-80 dB SPL の 10 dB ごとの刺激によって引き起こされる反応の違いである。右側のグラフは、刺激強度に基づく活性領域 (Activated area、青) と最大活性強度 (Peak intensity、黒) を、音刺激開始後 0.29 sec (実線) と音刺激開始直前 (破線) で比較したものである (n = 3, エラーバーは標準誤差)。

**Figure 2**

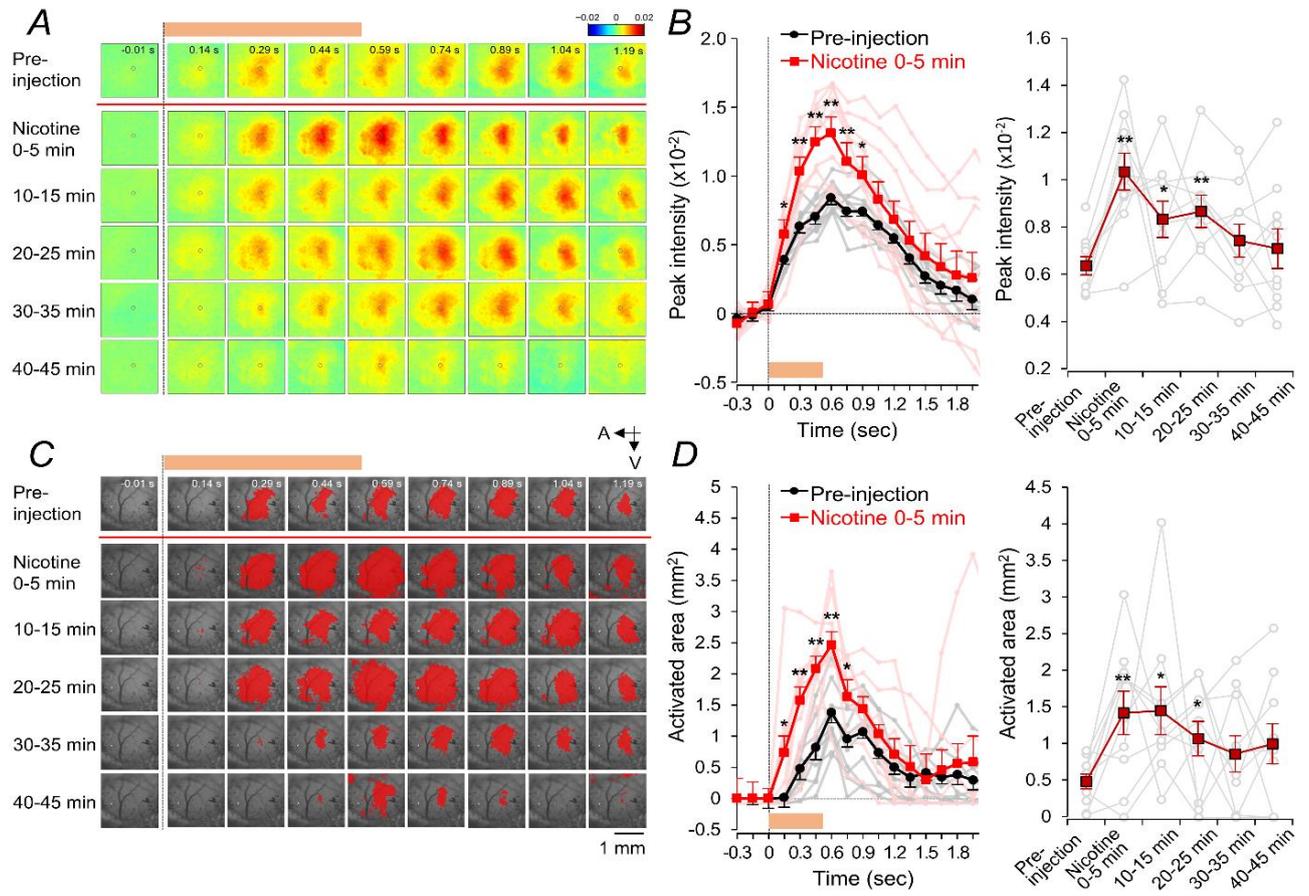


Fig. 2. 音誘発性フラビントキパク質蛍光の最大強度および活性領域へのニコチンの効果

(A) ニコチン注入前後のフラビントキパク質蛍光反応の時間経過画像。全身性ニコチン投与後の5分前の20 kHz音による反応（ニコチン投与前）および投与後5分おきの5つの画像セットを示した。垂直の実線は、音の開始を表しており、その左には音開始から-0.01 secの画像を示している。オレンジの太線でAM音刺激（500 msec）を示した。画像内の黒円は、ニコチン投与前の0.29-0.59 secの画像の中で見つかった最大強度部位を示している。

(B) 最大活性強度へのニコチンの影響をグラフで示した。左：ニコチン投与前（Pre-injection、黒）とニコチン投与後の0-5分（Nicotine 0-5 min、赤）の平均最大強度の時間経過（ $n=10$ ）を示した。薄い点と線は、各サンプルにおけるニコチン投与前（灰）と投与後（薄赤）を示している。右：刺激開始後0.44 secの最大強度におけるニコチンの影響を時間経過で示した（ $n=10$ ）。各時間点で、投与前とニコチンの比較をpaired t-test（\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$ ）で行った。

(C) ニコチン投与前後の活性領域の時間経過を(A)と同じ画像データから示した。Aは頭側、Vは腹側を表す。

(D) 活性領域へのニコチンの影響をグラフで示した。左：ニコチン投与前（Pre-injection、黒）とニコチン投与後の0-5分（Nicotine 0-5 min、赤）の平均活性領域の時間経過（ $n=10$ ）を示した。薄い点と線は、各サンプルにおけるニコチン投与前（灰）と投与後（薄赤）を示している。右：刺激開始後0.44 secの最大強度におけるニコチンの影響を時間経過で示した（ $n=10$ ）。各時間点で、投与前とニコチンの比較をpaired t-test（\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$ ）で行った。

**Figure 3**

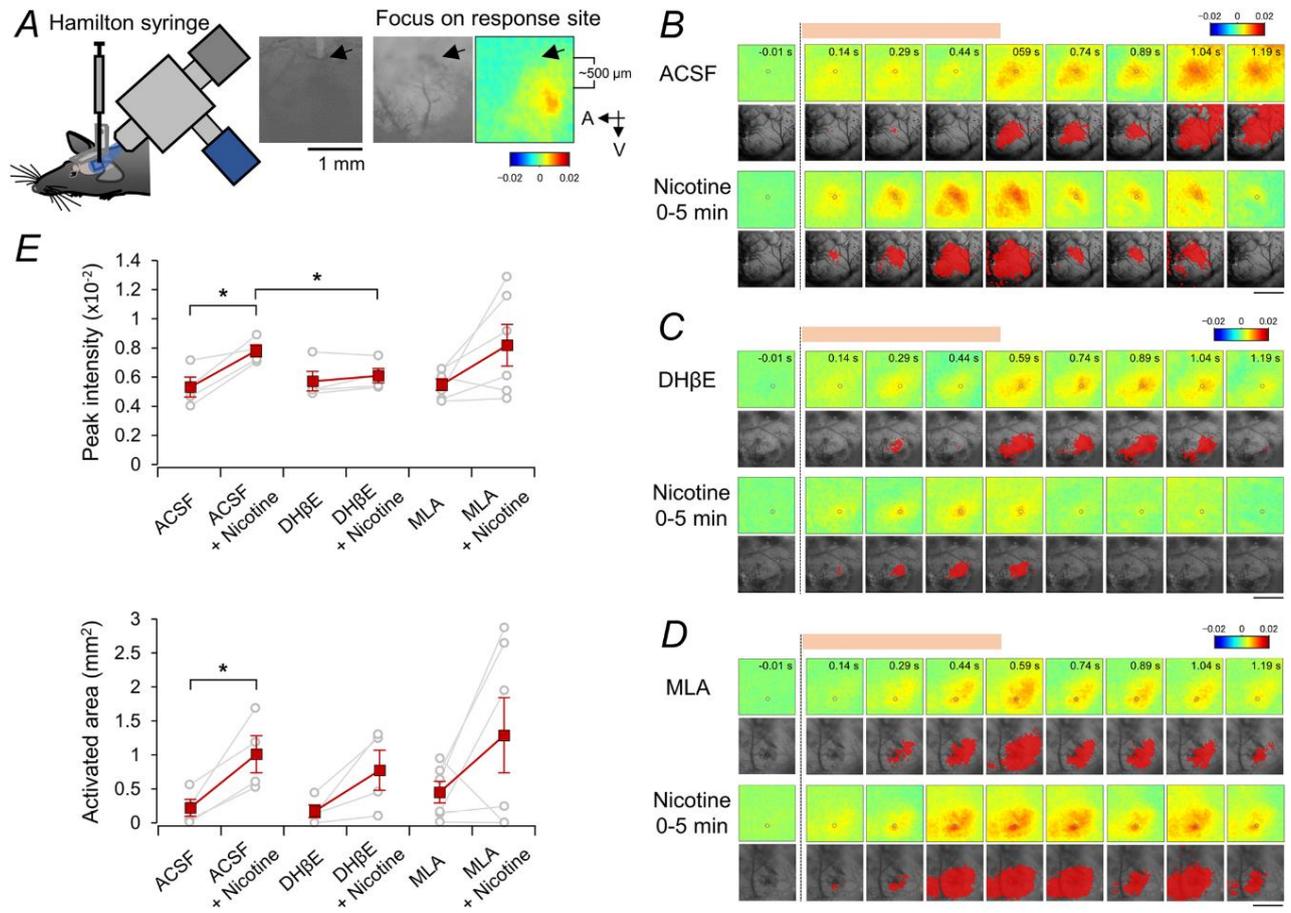


Fig. 3. 皮質ニコチン性受容体の阻害によるフラビントク質蛍光反応の調節

(A) 局所的なアンタゴニスト注入箇所を示した。左図は皮質への局所注入の模式図、右図は注入箇所(矢印)を示し、音誘発応答領域よりも 500  $\mu\text{m}$  背内側に注入した。A は頭側、V は腹側を表す。

(B-D) ACSF (B)、DH $\beta$ E (C)、MLA (D) の局所的な注入および全身的なニコチン投与後の代表的なフラビントク質蛍光応答の画像および活性領域を示した。各上段の蛍光応答画像内の黒円は、ニコチン投与前の 0.29-0.59 sec の画像の中で見つかった最大強度部位を示している。下段には、活性領域を赤色で明視野画像上に表示した。黒いスケールバーは 1 mm を表す。

(E) ビヒクルまたは阻害剤注入後 (ACSF、DH $\beta$ E、MLA)、およびニコチン投与 0-5 分間のデータポイントにおける最大活性強度 (上図) および活性領域 (下図) を示した。薄い白抜き丸点と灰色線は、各サンプルを示し、赤い四角と線は平均値を表している。ACSF (n=4)、DH $\beta$ E (n=4)、MLA (n=6)、各コンディションの比較は paired t-test (\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$ ) で行った。

**Figure 4**

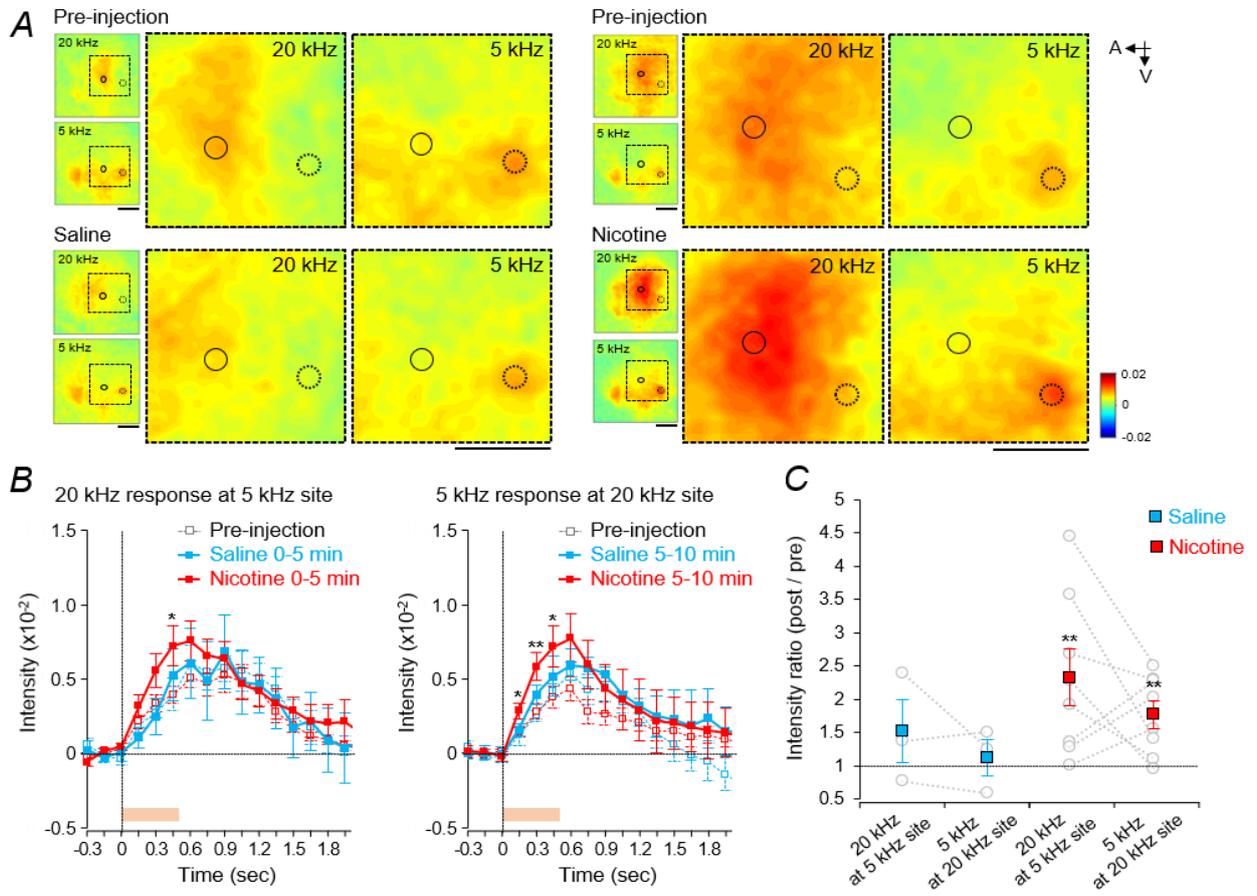


Fig. 4. フラビンタンパク質蛍光の空間的および時間的な解析によるニコチン性制御

(A) 生理食塩水 (左側) またはニコチン投与 (右側) の前 (上段: Pre-injection) 後 (下段: Saline, Nicotine) の最適および非最適周波数最大活性部位におけるフラビンタンパク質蛍光反応。左の画像のボックス領域は、20 kHz (左側の拡大図) または 5 kHz (右側の拡大図) 音誘発反応を示した。実線と破線の円は、同じ皮質上で最適および非最適周波数音によって誘発される最大活性強度部位を示している。スケールバーは 500  $\mu\text{m}$ 。A は頭側、V は腹側を表す。

(B) 非最適周波数最大活性部位におけるニコチンによる蛍光強度の影響。左側は、生理食塩水 (青) またはニコチン (赤) 投与時に 5 kHz (非最適周波数) 最大活性部位で測定された 20 kHz 音による平均強度変化の時間経過を示した。右側は、生理食塩水 (Saline, 水色) またはニコチン (Nicotine, 赤) 投与時に 20 kHz (非最適周波数) 最大活性部位で測定された 5 kHz 音による平均強度変化の時間経過を示した。白抜き点と破線は、生理食塩水またはニコチン投与前を示し、四角の点は投与後の応答を表している。(Saline;  $n = 3$ , Nicotine;  $n = 8$ , \*\*  $p < 0.01$ , paired t-test、各コンディションでの投与前と比較)。

(C) 生理食塩水 (Saline, 水色) またはニコチン (Nicotine, 赤) による非最適周波数最大活性部位での最適周波数音で誘発された蛍光強度の比較。生理食塩水またはニコチンの各実験における投与後の強度を、0.14 sec、0.29 sec、0.44 sec での投与前の蛍光強度に正規化し、平均化した。白抜き丸点と灰色線は、各サンプルを示し、色付きの四角は平均値を表している (Saline:  $n = 3$ , Nicotine:  $n = 8$ , 投与前と投与後の比較、\*\*  $p < 0.01$ , Student's t-test)。

**Figure 5**

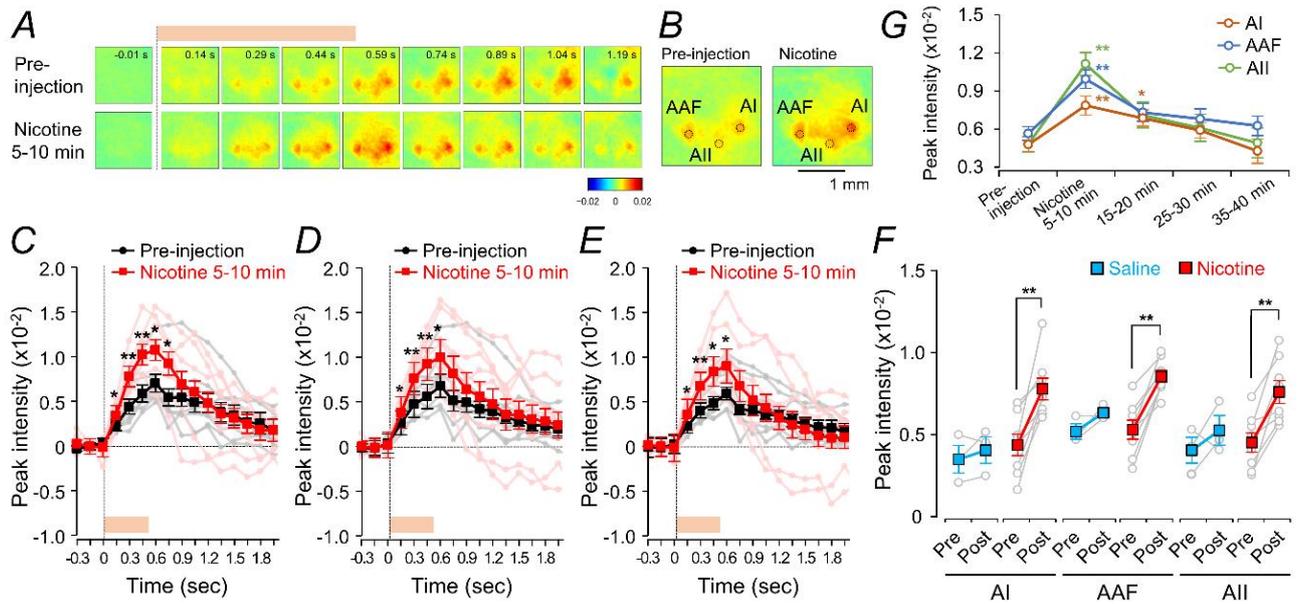


Fig. 5. 一次および非一次の皮質領域におけるニコチンの影響

(A) ニコチン投与前 (上段) および投与後 (下段) の 5 kHz 音によるフラビンタンパク質の蛍光変化を表している。オレンジの太線は音の暴露時間 (500 msec) を示している。

(B) 5 kHz 音の刺激開始 0.29 sec における AI、AAF、および AII の最大活性部位のニコチンの影響を示した。ニコチン投前 (Pre-injection) およびニコチン投与後の 5-10 分間の 3 つの異なる最大活性部位を黒円で表した。

(C-E) ニコチン投与前 (黒) および投与後の 5-10 分間の平均最大活性時間経過 (赤) (Pre-injection vs. Nicotine,  $n = 7$ , \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , paired t-test) AI (C)、AAF (D)、および AII (E)。

(F) AI、AAF、および AII における音開始 0.29 sec における生理食塩水 (青) またはニコチン (赤) 投与前 (Pre) および投与後 (Post) の最大活性強度 (Saline:  $n = 3$ , Nicotine:  $n = 7$ , Pre vs. Post, \*\*  $p < 0.01$ , paired t-test) を表している。

(G) AI (オレンジ)、AAF (青)、および AII (緑) における音開始 0.29 sec の最大活性強度に対するニコチンの影響の経時変化を表したグラフ (Pre-injection を基準に、 $n = 7$ , \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , paired t-test)。

## D-7. 補足資料

### Tables

**Table.1 Time course of nicotine effects on 20 kHz tone-induced peak intensity**

Peak intensity	Pre-injection		Nicotine 0-5 min		Nicotine 10-15 min		Nicotine 20-25 min		Nicotine 30-35 min		Nicotine 40-45 min	
	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
0.14 sec	0.00392 ± 0.00025		0.00577 ± 0.00069 *		0.00510 ± 0.00055		0.00480 ± 0.00049		0.00417 ± 0.00042		0.00433 ± 0.00037	
0.29 sec	0.00635 ± 0.00039		0.01034 ± 0.00078 **		0.00832 ± 0.00077 *		0.00866 ± 0.00068 **		0.00742 ± 0.00070		0.00708 ± 0.00084	
0.44 sec	0.00704 ± 0.00035		0.01248 ± 0.00090 **		0.00934 ± 0.00104		0.00955 ± 0.00100 *		0.00870 ± 0.00102		0.00731 ± 0.00100	
0.59 sec	0.00842 ± 0.00034		0.01312 ± 0.00105 **		0.01012 ± 0.00126		0.01101 ± 0.00111 *		0.00918 ± 0.00092		0.00832 ± 0.00095	
0.74 sec	0.00744 ± 0.00050		0.01106 ± 0.00103 **		0.00982 ± 0.00121		0.01053 ± 0.00117 *		0.00901 ± 0.00118		0.00794 ± 0.00085	

\* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , Paired  $t$ -test compared with Pre-injection

**Table.2 Time course of nicotine effects on 20 kHz tone-induced area size**

Area size (mm <sup>2</sup> )	Pre-injection		Nicotine 0-5 min		Nicotine 10-15 min		Nicotine 20-25 min		Nicotine 30-35 min		Nicotine 40-45 min	
	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
0.14 sec	0.013 ± 0.008		0.736 ± 0.319 *		0.214 ± 0.126		0.114 ± 0.099		0.109 ± 0.069		0.093 ± 0.055	
0.29 sec	0.479 ± 0.101		1.574 ± 0.265 **		1.445 ± 0.326 *		1.065 ± 0.235 *		0.855 ± 0.249		0.993 ± 0.275	
0.44 sec	0.819 ± 0.157		2.087 ± 0.162 **		1.605 ± 0.398		1.153 ± 0.257		1.294 ± 0.341		0.964 ± 0.318	
0.59 sec	1.379 ± 0.155		2.463 ± 0.266 **		2.280 ± 0.460		1.920 ± 0.357		1.648 ± 0.407		1.518 ± 0.443	
0.74 sec	0.956 ± 0.176		1.635 ± 0.216 *		1.937 ± 0.408 *		1.310 ± 0.249		1.341 ± 0.411		1.039 ± 0.377	

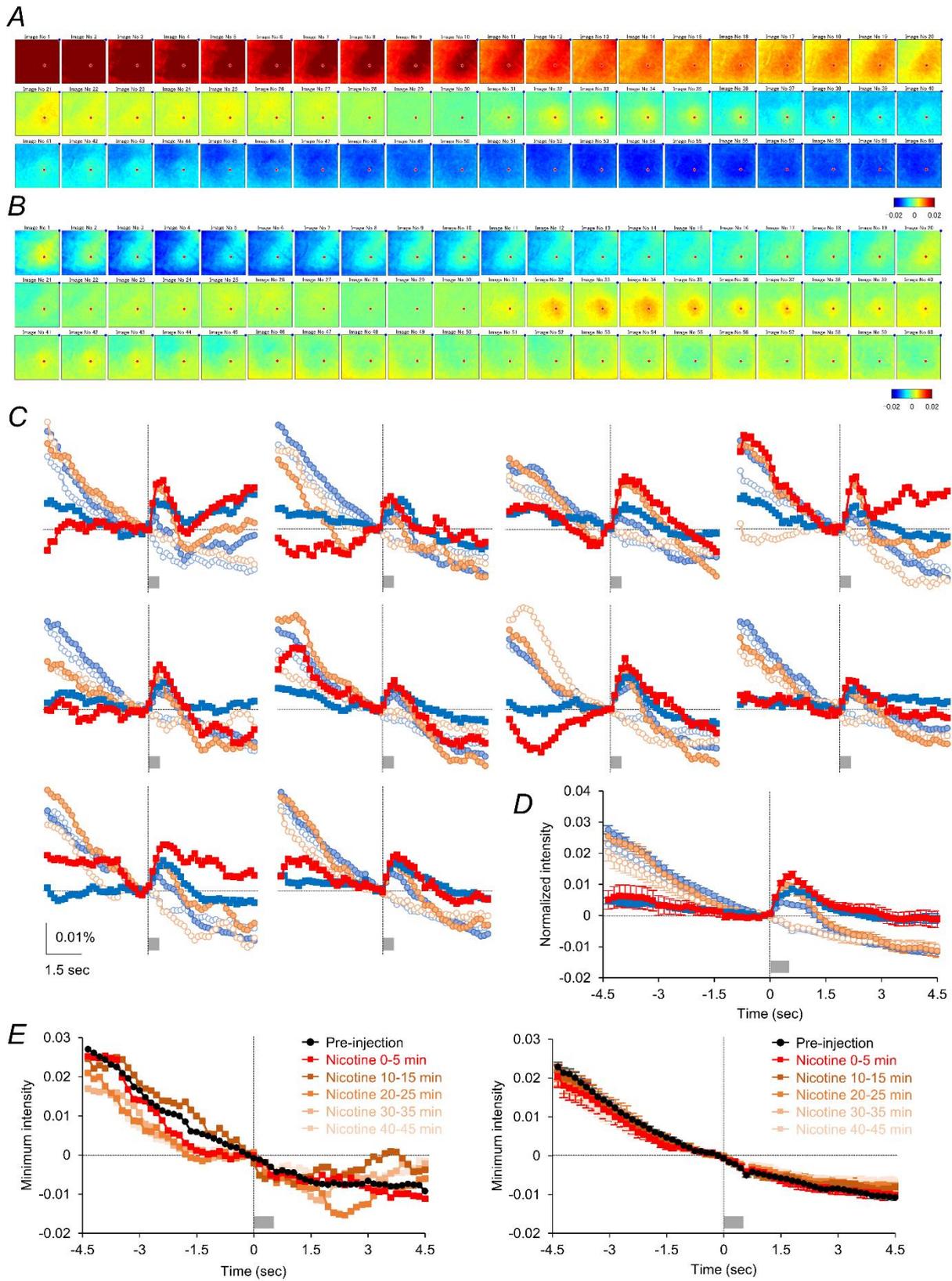
\* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , Paired  $t$ -test compared with Pre-injection

**Table.3 Time course of nicotine effects on 20 kHz tone-induced area intensity**

Area intensity	Pre-injection		Nicotine 0-5 min		Nicotine 10-15 min		Nicotine 20-25 min		Nicotine 30-35 min		Nicotine 40-45 min	
	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
0.14 sec	0.00144 ± 0.00042		0.00389 ± 0.00095 *		0.00418 ± 0.00097 *		0.00150 ± 0.00076		0.00220 ± 0.00091		0.00276 ± 0.00094	
0.29 sec	0.00487 ± 0.00033		0.00760 ± 0.00045 **		0.00703 ± 0.00035 **		0.00696 ± 0.00092 *		0.00616 ± 0.00077		0.00523 ± 0.00095	
0.44 sec	0.00621 ± 0.00036		0.00836 ± 0.00050 **		0.00743 ± 0.00040 *		0.00726 ± 0.00096		0.00666 ± 0.00082		0.00543 ± 0.00101	
0.59 sec	0.00675 ± 0.00027		0.00824 ± 0.00050 *		0.00779 ± 0.00038 *		0.00762 ± 0.00108		0.00728 ± 0.00033		0.00723 ± 0.00054	
0.74 sec	0.00621 ± 0.00044		0.00779 ± 0.00054 *		0.00715 ± 0.00082		0.00758 ± 0.00112		0.00720 ± 0.00037		0.00714 ± 0.00052	

\* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , Paired  $t$ -test compared with Pre-injection

# Supplemental Figure 1



Supplemental Fig. 1. 最小または最大蛍光強度部位における音誘発性蛍光強度変化

(A) 20 kHz AM 音により誘発されたフラビンタンパク質蛍光画像のセット (60 枚の画像における 8 回トライアルの平均) を示した。音誘発中 (画像番号 31-34) に見つかったピーク強度 (赤点) と最小強度 (青点) の位置を、すべての画像に適用した。カラースケールは、音開始前の平均基準強度に対する蛍光変化を示した (画像番号 28-30)。

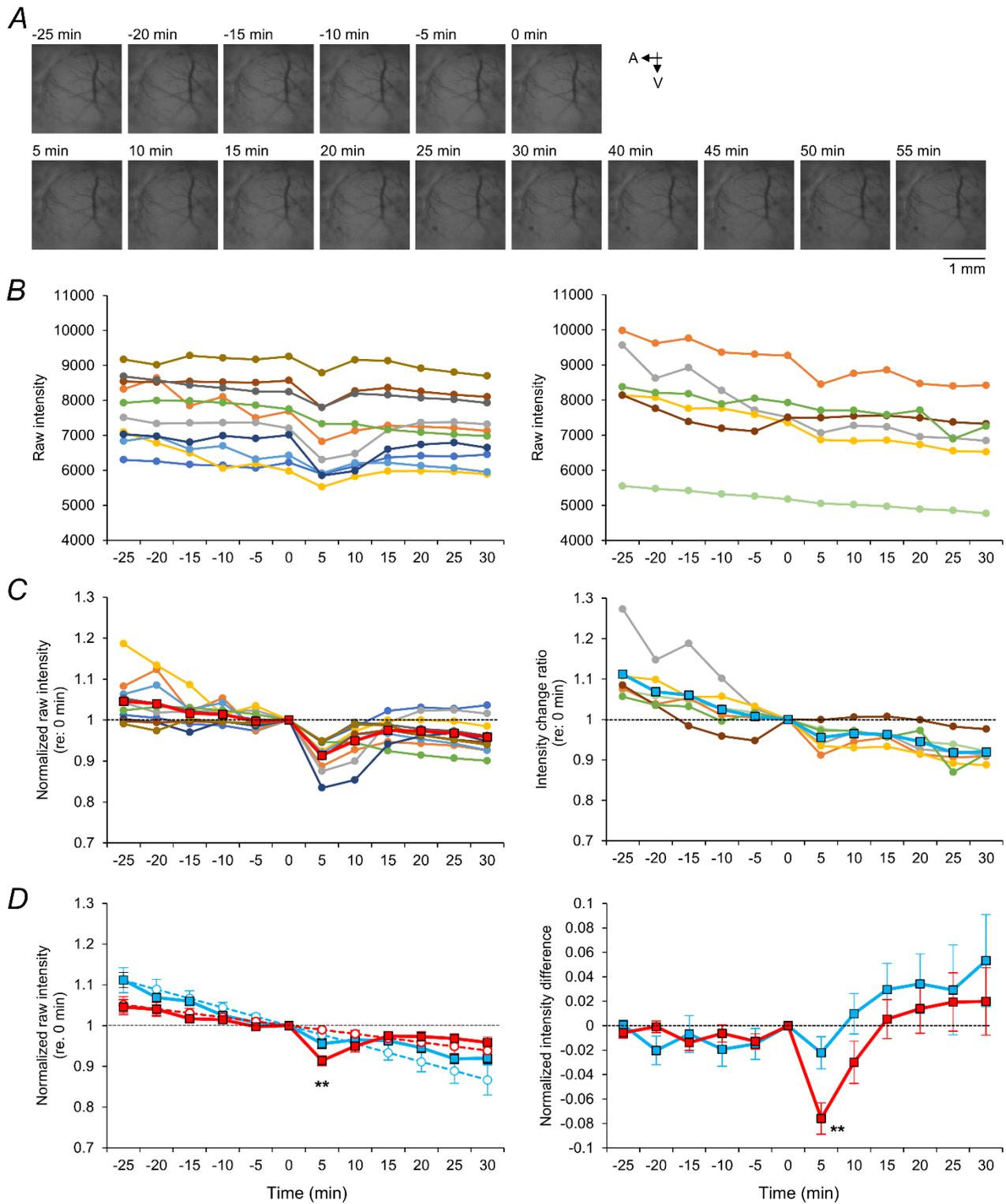
(C) (A) の最小強度を差し引いた画像を示した。

(C) 10 匹のマウスにおけるニコチン投与前 (青) およびニコチン投与後 0-5 分間 (赤) の最小 (白抜き円)、最大 (色付き円)、および差分 (色付き四角) 強度の経時変化を示した。差分強度では、各時点の最小強度を最大強度から差し引いた値。灰色の太線は音刺激 (500 msec) を示している。スケールバーは蛍光強度 (垂直) と時間 (水平) を示した。

(D) (C) における強度の平均 (Normalized intensity) を経時的に示した。

(E) 最小強度 (Minimum intensity) の経時変化に対するニコチンの影響。左側は、ニコチン投与前 (ニコチン投与の 5-10 分前、黒) およびニコチン投与後の 5 分ごと (ラベル参照) の最小強度の経時変化を示した。右側は、10 匹のマウスの平均最小強度の経時変化を示した。

**Supplemental Figure 2**



Supplemental Fig. 2. ベースラインの蛍光強度におけるニコチンの影響

(A) 5分間隔でのニコチン投与前 (-25~0 min) およびニコチン投与後 (5~55 min) の明視野皮質画像 (音刺激前のベースライン) を示した。A は頭側、V は腹側を表す。

(B) ニコチン (左) および生理食塩水 (右) 投与前後の明視野画像における強度 (Raw intensity) の経時変化を示した。各データポイントは、音開始前の3つのベースライン (画像番号 28-30) の画像全体の平均強度を表している。

(C) B のデータを、ニコチン (左) および生理食塩水 (右) 投与後の明視野画像における、各データをサンプルごとの0分で平均化した強度 (Normalized raw intensity (re: 0 min)) の経時変化を示す。ニコチン (赤、n=10) および生理食塩水 (青、n=6) の平均経時変化もプロットした。

(D) 明視野の強度の実験結果とその予測の平均経時変化を示した。左側の赤色付き四角と、青色付き四角は、(C) と同じデータを表している。白抜き円は、各投与別 (ニコチン: 赤い点線、生理食塩水: 青い点線) の-25~0分の明視野画像における強度の線形回帰直線のデータポイントを平均したものである。右側は、実験データと回帰直線データの平均化された強度の差の経時変化を示した。各時間点で個々の線形回帰直線を実験データポイントから差し引いた結果のデータポイントを、ニコチン (n=10) および生理食塩水 (n=6) の結果において平均化したもの (Normalized intensity difference) を示している (生理食塩水を基準に、\*\*  $p < 0.01$ 、unpaired t-test)。

## D-8. 参考文献

- Adler LE, Hoffer LJ, Griffith J, Waldo MC, Freedman R (1992) Normalization by nicotine of deficient auditory sensory gating in the relatives of schizophrenics. *Biol Psychiatry* 32:607–616.
- Askew C, Intskirveli I, Metherate R (2017) Systemic Nicotine Increases Gain and Narrows Receptive Fields in A1 via Integrated Cortical and Subcortical Actions. *eNeuro* 4(3):ENEURO.0192-17.
- Askew CE, Lopez AJ, Wood MA, Metherate R (2019) Nicotine excites VIP interneurons to disinhibit pyramidal neurons in auditory cortex. *Synapse* 73(9):e22116.
- Atiani S, Elhilali M, David S V, Fritz JB, Shamma SA (2009) Task difficulty and performance induce diverse adaptive patterns in gain and shape of primary auditory cortical receptive fields. *Neuron* 61:467–480.
- Baba H, Tsukano H, Hishida R, Takahashi K, Horii A, Takahashi S, Shibuki K (2016) Auditory cortical field coding long-lasting tonal offsets in mice. *Sci Rep* 6:34421.
- Behler O, Breckel TPK, Thiel CM (2015) Nicotine reduces distraction under low perceptual load. *Psychopharmacology* 232(7):1269-1277.
- Bidet-Caulet A, Fischer C, Besle J, Aguera P-E, Giard M-H, Bertrand O (2007) Effects of selective attention on the electrophysiological representation of concurrent sounds in the human auditory cortex. *J Neurosci* 27:9252–9261.
- Bieszczad KM, Kant R, Constantinescu CC, Pandey SK, Kawai HD, Metherate R, Weinberger NM, Mukherjee J (2012) Nicotinic acetylcholine receptors in rat forebrain that bind <sup>18</sup>F-nifene: relating PET imaging, autoradiography, and behavior. *Synapse* 66:418–434.
- Brown MR, Sullivan PG, Geddes JW (2006). Synaptic mitochondria are more susceptible to Ca<sup>2+</sup> overload than

nonsynaptic mitochondria. *J Biol Chem* 281:11658–11668.

Bruijnzeel AW, Alexander JC, Perez PD, Bauzo-Rodriguez R, Hall G, Klausner R, Guerra V, Zeng H, Igari M, Febo

M (2014) Acute Nicotine Administration Increases BOLD fMRI Signal in Brain Regions Involved in Reward Signaling and Compulsive Drug Intake in Rats. *Int J Neuropsychopharmacol* 18(2):pyu011.

Buzsáki G (2004) Large-scale recording of neuronal ensembles. *Nat Neurosci* 7:446-451.

Cambiaghi M, Grosso A, Renna A, Concina G, Sacchetti B (2015) Acute administration of nicotine into the higher order auditory Te2 cortex specifically decreases the fear-related charge of remote emotional memories.

*Neuropharmacology* 99:577–588.

Cormier A, Morin C, Zini R, Tillement JP, Lagrue G (2001) In vitro effects of nicotine on mitochondrial respiration and superoxide anion generation. *Brain Res* 900:72–79.

Chen R, Canales A, Anikeeva P (2017) Neural recording and modulation technologies. *Nat Rev Mater* 2:1-16

Davey GP, Canevari L, Clark JB (1997) Threshold effects in synaptosomal and nonsynaptic mitochondria from hippocampal CA1 and paramedian neocortex brain regions. *J Neurochem* 69(6):2564-70

Domino EF, Kishimoto T (2002) Tobacco smoking increases gating of irrelevant and enhances attention to relevant tones. *Nicotine Tab Res* (1):71-78.

Ebner TJ, Chen G (1995) Use of voltage-sensitive dyes and optical recordings in the central nervous system. *Progress in neurobiology* 46:463–506.

Einevoll GT, Kayser C, Logothetis NK, Panzeri S (2013) Modelling and analysis of local field potentials for studying the function of cortical circuits. *Nat Rev Neurosci* 14:770–785.

Friedman J, Horvath T, Meares R (1974) Tobacco smoking and a “stimulus barrier.” *Nature* 248:455–456.

- Fritz JB, Elhilali M, David S V, Shamma SA (2007a) Does attention play a role in dynamic receptive field adaptation to changing acoustic salience in A1? *Hear Res* 229(1-2):186–203.
- Fritz JB, Elhilali M, Shamma SA (2007b) Adaptive changes in cortical receptive fields induced by attention to complex sounds. *J Neurophysiol* 98(4):2337–2346.
- Galindo-Leon EE, Lin FG, Liu RC (2009) Inhibitory plasticity in a lateral band improves cortical detection of natural vocalizations. *Neuron* 62:705–716.
- Gilbert DG, Sugai C, Zuo Y, Rabinovich NE, McClernon FJ, Froeliger B (2007) Brain indices of nicotine's effects on attentional bias to smoking and emotional pictures and to task-relevant targets. *Nicotine Tab Res* 9(3):351-63.
- Grady CL, Van Meter JW, Maisog JM, Pietrini P, Krasuski J, Rauschecker JP (1997) Attention-related modulation of activity in primary and secondary auditory cortex. *Neuroreport* 8:2511–2516.
- Herdman AT (2011) Neuroimaging evidence for top-down maturation of selective auditory attention. *Brain Topogr* 24(3-4):271–278.
- Hishida R, Kamatani D, Kitaura H, Kudoh M, Shibuki K (2007) Functional local connections with differential activity-dependence and critical periods surrounding the primary auditory cortex in rat cerebral slices. *NeuroImage* 34:679–693.
- Honma Y, Tsukano H, Horie M, Ohshima S, Tohmi M, Kubota Y, Takahashi K, Hishida R, Takahashi S, Shibuki K (2013) Auditory Cortical Areas Activated by Slow Frequency-Modulated Sounds in Mice. *PLoS ONE* 8(7): e68113.
- Husson TR, Mallik AK, Zhang JX, Issa NP (2007) Functional imaging of primary visual cortex using flavoprotein autofluorescence. *J Neurosci* 27:8665–8675.

- Intskirveli I, Metherate R (2012) Nicotinic neuromodulation in auditory cortex requires MAPK activation in thalamocortical and intracortical circuits. *J Neurophysiol* 107:2782–2793.
- Intskirveli I, Joshi A, Vizcarra-Chacón BJ & Metherate R (2016) Spectral breadth and laminar distribution of thalamocortical inputs to A1. *J Neurophysiol* 115:2083–2094.
- Intskirveli I, Metherate R (2021) Nicotine Enhances Amplitude and Consistency of Timing of Responses to Acoustic Trains in A1. *Front Neural Circuits* 15:597401.
- Issa JB, Haeffele BD, Agarwal A, Bergles DE, Young ED, Yue DT (2014) Multiscale Optical Ca<sup>2+</sup> Imaging of Tonal Organization in Mouse Auditory Cortex. *Neuron* 83:944–959.
- Jäncke L, Mirzazade S, Shah NJ (1999) Attention modulates activity in the primary and the secondary auditory cortex: a functional magnetic resonance imaging study in human subjects. *Neurosci Lett* 266(2):125–128.
- Kassel JD (1997) Smoking and attention: a review and reformulation of the stimulus-filter hypothesis. *Clin Psychol Rev* 17(5):451–478.
- Kawai H, Lazar R, Metherate R (2007) Nicotinic control of axon excitability regulates thalamocortical transmission. *Nat Neurosci* 10:1168–1175.
- Kawai HD, Kang HA, Metherate R (2011) Heightened nicotinic regulation of auditory cortex during adolescence. *J Neurosci* 31:14367–14377.
- Kawai HD, La M, Kang H-A, Hashimoto Y, Liang K, Lazar R, Metherate R (2013) Convergence of nicotine-induced and auditory-evoked neural activity activates ERK in auditory cortex. *Synapse* 67(8):455-68.
- Kerlin JR, Shahin AJ, Miller LM (2010) Attentional gain control of ongoing cortical speech representations in a “cocktail party”. *J Neurosci* 30:620–628.

- King J, Huang W, Chen W, Heffernan M, Shields J, Rane P, Bircher R, DiFranza JR (2011) A comparison of brain and behavioral effects of varenicline and nicotine in rats. *Behav Brain Res* 223:42–47.
- Knott VJ, Bolton K, Heenan A, Shah D, Fisher DJ, Villeneuve C (2009) Effects of acute nicotine on event-related potential and performance indices of auditory distraction in nonsmokers. *Nicotine Tob Res* 11:519–530.
- Kodaira M, Wasaka T, Motomura E, Tanii H, Inui K, Kakigi A (2013) Effects of acute nicotine on somatosensory change-related cortical responses. *Neuroscience* 229:20–26.
- Kubota Y, Kamatani D, Tsukano H, Ohshima S, Takahashi K, Hishida R, Kudoh M, Takahashi S, Shibuki K (2008) Transcranial photo-inactivation of neural activities in the mouse auditory cortex. *Neurosci Res* 60:422–430.
- Lavine N, Reuben M, Clarke PB (1997) A population of nicotinic receptors is associated with thalamocortical afferents in the adult rat: laminal and areal analysis. *The Journal of comparative neurology* 380:175–190.
- Lee CC, Imaizumi K, Schreiner CE, Winer JA (2004) Concurrent tonotopic processing streams in auditory cortex. *Cereb Cortex* 14(4):441–451.
- Li Z, DiFranza JR, Wellman RJ, Kulkarni P, King JA (2008) Imaging brain activation in nicotine-sensitized rats. *Brain Res* 1199:91–99.
- Liang K, Poytress BS, Chen Y, Leslie FM, Weinberger NM, Metherate R (2006) Neonatal nicotine exposure impairs nicotinic enhancement of central auditory processing and auditory learning in adult rats. *Eur J Neurosci* 24:857–866.
- Liang K, Poytress BS, Weinberger NM, Metherate R (2008) Nicotinic modulation of tone-evoked responses in auditory cortex reflects the strength of prior auditory learning. *Neurobiol Learn Mem* 90:138–146.
- Liu J, Whiteway MR, Sheikhattar A, Butts DA, Babadi B, Kanold PO (2019) Parallel Processing of Sound

Dynamics across Mouse Auditory Cortex via Spatially Patterned Thalamic Inputs and Distinct Areal

Intracortical Circuits. *Cell Rep* 27(3):872-885.e7.

Llano DA, Theyel BB, Mallik AK, Sherman SM, Issa NP (2009) Rapid and sensitive mapping of long-range connections in vitro using flavoprotein autofluorescence imaging combined with laser photostimulation. *J Neurophysiol* 101:3325–3340.

Lores-Arnaiz S, Bustamante J (2011) Age-related alterations in mitochondrial physiological parameters and nitric oxide production in synaptic and non-synaptic brain cortex mitochondria. *Neuroscience* 188:117–124.

Malińska D, Więckowski MR, Michalska B, Drabik K, Prill M, Patalas-Krawczyk P, Walczak J, Szymański J, Mathis C, Van der Toorn M, Luettich K, Hoeng J, Peitsch MC, Duszyński J, Szczepanowska J (2019) Mitochondria as a possible target for nicotine action. *J Bioenerg Biomembr* 51:259–276.

Metherate R, Intskirveli I, Kawai HD (2012) Nicotinic filtering of sensory processing in auditory cortex. *Front Behav Neurosci* 6:44.

Mitzdorf U (1985) Current source-density method and application in cat cerebral cortex: Investigation of evoked potentials and EEG phenomena. *Physiol Rev* 65:37–100.

Murakami H, Kamatani D, Hishida R, Takao T, Kudoh M, Kawaguchi T, Tanaka R, Shibuki K (2004). Short-term plasticity visualized with flavoprotein autofluorescence in the somatosensory cortex of anaesthetized rats. *Eur J Neurosci* 19:1352–1360.

Naga KK, Sullivan PG, Geddes JW (2007) High cyclophilin D content of synaptic mitochondria results in increased

vulnerability to permeability transition. *J Neurosci* 27:7469–7475.

Neelon MF, Williams J, Garell PC (2011) Elastic Attention: Enhanced, then Sharpened Response to Auditory Input as Attentional Load Increases. *Front Hum Neurosci* 5:41.

Nicholson C, Freeman JA (1975) Theory of current source-density analysis and determination of conductivity tensor for anuran cerebellum. *J Neurophysiol* 38:356–368.

O’Connell MN, Barczak A, Schroeder CE, Lakatos P (2014) Layer specific sharpening of frequency tuning by selective attention in primary auditory cortex. *J Neurosci* 34:16496–16508.

Ohga S, Tsukano H, Horie M, Terashima H, Nishio N, Kubota Y, Takahashi K, Hishida R, Takebayashi H, Shibuki K (2018) Direct relay pathways from lemniscal auditory thalamus to secondary auditory field in mice. *Cereb Cortex* 28:4424–4439.

Ohl FW, Scheich H (1996) Differential frequency conditioning enhances spectral contrast sensitivity of units in auditory cortex (field AI) of the alert Mongolian gerbil. *Eur J Neurosci* 8:1001–1017.

Okamoto H, Stracke H, Wolters CH, Schmael F, Pantev C (2007) Attention improves population-level frequency tuning in human auditory cortex. *J Neurosci* 27:10383–10390.

Pekonen K, Karlsson C, Laakso I, Ahtee L (1993) Plasma nicotine and cotinine concentrations in mice after chronic oral nicotine administration and challenge doses. *Eur J Pharm Sci* 1:13–18.

Petersen MH, Willert CW, Andersen JV, Waagepetersen HS, Skotte NH, Nørremølle A (2019) Functional differences between synaptic mitochondria from the striatum and the cerebral cortex. *Neuroscience* 406:432–443.

Polley DB, Read HL, Storace DA, Merzenich MM (2007) Multiparametric auditory receptive field organization

across five cortical fields in the albino rat. *J Neurophysiol* 97:3621–3638.

Redies H, Brandner S, Creutzfeldt OD (1989) Anatomy of the auditory thalamocortical system of the guinea pig. *J*

*Comp Neurol* 282:489–511.

Reinert KC, Dunbar RL, Gao W, Chen G, Ebner TJ (2004) Flavoprotein autofluorescence imaging of neuronal

activation in the cerebellar cortex in vivo. *J Neurophysiol* 92:199–211.

Reinert KC, Gao W, Chen G, Ebner TJ (2007) Flavoprotein autofluorescence imaging in the cerebellar cortex in

vivo. *J Neurosci Res* 85(15):3221–3232.

Shi Z, Yan S, Ding Y, Zhou C, Qian S, Wang Z, Gong C, Zhang M, Zhang Y, Zhao Y, Wen H, Chen P, Deng Q, Luo

T, Xiong Y, Zhou Y (2019) Anterior Auditory Field Is Needed for Sound Categorization in Fear Conditioning

Task of Adult Rat. *Front Neurosci* 13:1374.

Shibuki K, Hishida R, Murakami H, Kudoh M, Kawaguchi T, Watanabe M, Watanabe S, Kouuchi T, Tanaka R

(2003) Dynamic imaging of somatosensory cortical activity in the rat visualized by flavoprotein

autofluorescence. *J Physiol* 549:919–927.

Shuttleworth CW (2010) Use of NAD(P)H and flavoprotein autofluorescence transients to probe neuron and

astrocyte responses to synaptic activation. *Neurochem Int* 56:379–386

Smucny J, Olincy A, Eichman LS, Tregellas JR (2015) Neuronal effects of nicotine during auditory selective

attention. *Psychopharmacology (Berl)* 232:2017–2028.

Sottile SY, Hackett TA, Cai R, Ling L, Llano DA, Caspary DM (2017a) Presynaptic Neuronal Nicotinic Receptors

Differentially Shape Select Inputs to Auditory Thalamus and Are Negatively Impacted by Aging. *J Neurosci*

37:11377–11389.

- Sottile SY, Ling L, Cox BC, Caspary DM (2017b) Impact of ageing on postsynaptic neuronal nicotinic neurotransmission in auditory thalamus. *J Physiol* 595:5375–5385.
- Storace DA, Higgins NC, Read HL (2011) Thalamocortical pathway specialization for sound frequency resolution. *The Journal of comparative neurology* 519:177–193.
- Takahashi K, Hishida R, Kubota Y, Kudoh M, Takahashi S, Shibuki K (2006) Transcranial fluorescence imaging of auditory cortical plasticity regulated by acoustic environments in mice. *Eur J Neurosci* 23:1365–1376.
- Takahashi M, Urushihata T, Takuwa H, Sakata K, Takado Y, Shimizu E, Suhara T, Higuchi M, Ito H (2018) Imaging of neuronal activity in awake mice by measurements of flavoprotein autofluorescence corrected for cerebral blood flow. *Front Neurosci* 11:723.
- Tebecis AK (1970) Properties of cholinergic neurones in the medial geniculate nucleus. *Br J Pharmacol* 38:117–137.
- Tohmi M, Meguro R, Tsukano H, Hishida R, Shibuki K (2014) The extrageniculate visual pathway generates distinct response properties in the higher visual areas of mice. *Curr Biol* 24(6):587–597.
- Tsukano H, Horie M, Bo T, Uchimura A, Hishida R, Kudoh M, Takahashi K, Takebayashi H, Shibuki K (2015) Delineation of a frequency-organized region isolated from the mouse primary auditory cortex. *J Neurophysiol* 113:2900–2920.
- Tsukano H, Horie M, Hishida R, Takahashi K, Takebayashi H, Shibuki K (2016) Quantitative map of multiple auditory cortical regions with a stereotaxic fine-scale atlas of the mouse brain. *Sci Rep* 6:1–12.
- Tsukano H, Horie M, Ohga S, Takahashi K, Kubota Y, Hishida R, Takebayashi H, Shibuki K (2017) Reconsidering Tonotopic Maps in the Auditory Cortex and Lemniscal Auditory Thalamus in Mice. *Front Neural Circuits* 11:14.

- Villa RF, Gorini A, Hoyer S (2006) Differentiated effect of ageing on the enzymes of Krebs' cycle, electron transfer complexes and glutamate metabolism of non-synaptic and intra-synaptic mitochondria from cerebral cortex. *J Neural Transm* 113:1659–1670.
- Weber B, Burger C, Wyss MT, von Schulthess GK, Scheffold F, Buck A (2004) Optical imaging of the spatiotemporal dynamics of cerebral blood flow and oxidative metabolism in the rat barrel cortex. *Eur J Neurosci* 20:2664–2670.
- Woldorff MG, Gallen CC, Hampson SA, Hillyard SA, Pantev C, Sobel D, Bloom FE (1993) Modulation of early sensory processing in human auditory cortex during auditory selective attention. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8722–8726.
- Xie YX, Bezard E, Zhao BL (2005) Investigating the receptor-independent neuroprotective mechanisms of nicotine in mitochondria. *J Biol Chem* 280:32405–32412.
- Yanagawa Y, Takasu K, Osanai H, Tateno T (2017) Salicylate-induced frequency-map reorganization in four subfields of the mouse auditory cortex. *Hear Res.* 351:98-115.

## E. 第3章：

### マウス一次聴覚野第3/4層における視床・皮質系神経回路のニコチン制御

#### E-1. 要約

マウス一次聴覚皮質（AI）において、急性的なニコチン投与後、最も感受性の高い特性周波数（CF）の音に対する応答の増大と、CFから2オクターブ離れた音（非CF）の応答の低下が起こることが知られ、シグナルーノイズ比を向上させることで、周波数特異的な音の認識を向上させる仕組みが示唆されている。このフィルター機構の1つの機序としては、視床からAIの主な入力層である第3/4層への入力において、ニコチン性アセチルコリン受容体（nAChRs）が、投射経路の軸索の活性の同期化を引き起こし、皮質応答を増強させることが知られている。しかし、nAChRsを介した皮質内制御に関与する細胞や機構など、特に、感度調整に関わるとされる抑制性介在細胞への関与に関しては未だ明らかにされていない。本実験では、抑制性介在細胞がこのフィルター機構に関与しているのではないかという仮説を立て、auditory thalamocortical（TC）スライスを作成し、検証を行った。本実験において、*in vivo*の局所電場電位（LFP）でニコチンの影響が神経回路レベルで制御している可能性が示唆された。また *in vitro* スライスの実験では、Fast spiking（FS）抑制性細胞へのTC入力の減少が見られ、これまでの興奮性細胞へのニコチン性制御とは逆の制御が行われていることが示唆された。また、興奮性細胞および抑制性細胞のダブルパッチの実験において、興奮性細胞に投射する直接的な抑制性後シナプス電流（IPSC）の減少は確認されなかった。一方で、興奮性細胞におけるTC誘発性の活動電位はニコチンで減少したことから、ニコチンがTC入力の増強と皮質回路内での活性減少の2つの役割を担っている可能性が示唆された。一方で、TC誘発性の興奮性および抑制性シナプス応答は、共に増加する、もしくは減少する細胞が存在しており、ニコチンが細胞種、または神経回路特異的な制御を行っている可能性が示唆され

た。

## E-2. 背景・目的

ニコチンは、感覚情報処理機能の強化に作用することが知られている。たとえば、健常者の非喫煙者において、喫煙は、ヒトの脳波（EEG）によって記録された聴覚誘発電位を促進する（Domino, 2003）。また、ヒトを含む哺乳類の認知および注意行動において、ニコチンが感覚情報処理機能の向上に深く関わっていることも知られている（Picciotto, 2003; Levin et al., 2006）。感覚情報処理機能におけるニコチン性増強のメカニズムは未だ明らかにされていないが、感覚フィルタリング（Sensory filtering）機構がそのメカニズムの解明に重要な手がかりとなる可能性がある。感覚フィルタリングとは、特異的な情報（シグナル）の応答を増幅し、非特異的な情報（ノイズ）を減らすことによって、シグナルーノイズ比を向上させる機構であるが、この情報処理機構においてはニコチン性アセチルコリン受容体（nAChRs）を介したコリン作動性システムの関与が報告されている（Levin, 2002; Picciotto, 2003; Disney et al., 2007）。

音の情報は、耳の内耳にある蝸牛（Cochlea）の基底膜にて振動場所の違いから、周波数別で神経応答に変換される。この周波数別の分布はトノトピー（Tonotopy）と呼ばれ、その後の聴覚情報処理経路である、脳幹の蝸牛神経核（Cochlear nucleus）と上オリブ核（Superior olivary nucleus）、下丘（Inferior colliculus）、視床内の腹側内側膝状体（Ventral medial geniculate nucleus, MGv）、そして大脳的一次聴覚皮質（Primary auditory cortex, AI）と、各領域においても保存されている。AIにおけるトノトピーは、実験法によって観測される周波数勾配に違いが認められるものの（Stiebler et al., 1997; Guo et al., 2012; Issa et al., 2014; Tsukano et al., 2015）、発達に伴い形成されることが分かっている。例えば、げっ歯類の音の臨界期において、ある周波数音の長時間の暴露により、その周波数音に対する応答する部位が増大し（de Villiers-Sidani et al., 2007）、一方で、ホワイトノイズ等のノイズ音を暴露すると、周波数特異性を失った無秩序な周波数地図を形成したり、細胞のチューニングカーブ（周波数と音圧に対する応答性）の拡大、

つまり音応答の選択性が減少したりしてしまうことが知られており (Zhang et al., 2002; Chang & Merzenich, 2003)、AI におけるトノトピーは経験依存的に獲得した情報処理システムであることが分かる。これらの AI の周波数特異性は視床の MGv でのトノトピー形成が先に行われた後に形成されるが、MGv からの視床・皮質軸索は主に第 3/4 層に投射されており (近年では、第 1 層にも第 3/4 層と同様の伝達速度を持つ投射が確認されている; Taesian et al., 2018)、他の層に比べ、第 3/4 層で最も音に対するチューニングがなされており、最も音に対して鋭敏に応答する部位であることが知られている (Chen et al., 2011; Hackett et al., 2011; Li et al., 2014)。この第 3/4 層のチューニング機構は、第 3/4 層内での興奮性の再帰的な活性および抑制性フィードフォワード (Feed-forward) 入力といった局所的な神経回路を介して、音応答の選択性、正確性、速さを増加させていることが知られている (Wehr & Zador 2003; Liu et al., 2007; Sun et al., 2010; Zhou et al., 2012; Li et al., 2014; Intskirveli et al., 2016; Sun et al., 2019)。従って、コリン作動性の情報処理機構は、第 3/4 層の神経回路を制御している可能性があり、実際に、Froemke らの実験によると、成熟したラットの AI で、ある周波数の音刺激とマイネルト核 (Nucleus basalis of Meynert) の電気刺激とのペアリングによって、ペアリングした音に対する特異性が増大することが観察されている (Froemke et al., 2007)。これは、マイネルト核から AI へ投射されるコリン作動性ニューロンからのアセチルコリンによる可塑的な変化で、音刺激誘発性の興奮性および抑制性シナプス入力の変化によるものと考えられたが、どういった神経回路および細胞が関わっているかは明らかとなっていない。

近年の電気生理学的研究では、急性のニコチン投与が、AI の特性周波数 (CF) 誘発反応を増強し、非 CF (CF より 2 オクターブ下の周波数) 反応を減少させることがわかった (Kawai et al., 2011)。これはニコチン性フィルタリング (Nicotinic filtering) と呼ばれており、TC 間での伝達の増強 (特異的情報) と皮質間での伝達の減少 (非特異的情報) が同時に起こることによって、聴覚反応の感受性が鋭敏とな

ることが示唆される。TC 間での伝達の増強に関しては、Kawai らの実験から、視床・皮質系経路上に nAChRs の存在が示唆されており、この nAChRs の活性によって視床・皮質軸索の同期性活性の増加によって、第 3/4 層の興奮性細胞へのシナプス伝達効率が增大することが知られている (Kawai et al., 2007)。

また、中脳および視床におけるニコチン性制御の関与も示唆されており、シグナル・ノイズ比の向上を引き起こすことが知られている (Tebecis, 1970; Askew et al., 2017; Sottile et al., 2017)。皮質内回路においても、ニコチンの投与により抑制性 VIP<sup>+</sup> (Vasoactive intestinal peptide 陽性) 細胞に大きな脱分極反応を示し、活動電位を引き起こすことで、抑制性 Somatostatin 陽性 (SOM<sup>+</sup>) 細胞の脱抑制を引き起こすことが解っている (Askew et al., 2019)。また、第 1 層の抑制性 5-HT<sub>3A</sub> receptor 陽性 (5-HT<sub>3A</sub>R<sup>+</sup>) 細胞にも nAChRs が存在していることが確認されており、この細胞は 4 層の抑制性 Parvalbumin 陽性 (PV<sup>+</sup>) 細胞の脱抑制を引き起こし、MGv からの入力ゲートリングを制御している可能性が高い (Takeshian et al., 2018)。また、ERK (Extracellular signal-related kinase) を介したシグナリング経路を皮質内で選択的に阻害すると、ニコチンによる音応答増強が起きなくなるため、上記のようなニコチン性の神経回路制御に加えて、細胞内分子への制御も示唆されており (Intskirveli & Metherate, 2012; Kawai et al., 2013)、この細胞内分子制御により AMPA 型グルタミン酸受容体のリン酸化などを引き起こすことで、興奮性応答の増強を引き起こす可能性を示唆している (当研究室の未発表のデータ)。

以上のように、第 3/4 層への聴覚皮質内で記録されたこれらのニコチンの効果は、皮質内および皮質下のニコチン性活性の複合的な作用であり、nAChRs の挙動は興奮性細胞のみならず、抑制性細胞を含んだ皮質神経回路内でも重要な役割を果たす考えられているが、ニコチン性フィルタリング機構においては、関連する抑制性細胞や神経回路は明らかにされていない。本研究では、音誘発性のニコチン性活性作用において、視床・皮質系経路依存的な抑制性細胞、特に第 3/4 層でフィードフォワード抑制に

関わっているとされている FS (Fast spiking) 細胞 (ほとんどが PV<sup>+</sup>細胞) の関与の可能性を検討し、またそれによって興奮性細胞の出力にどのような変化が起こるかを観察し、ニコチン性フィルタリングと神経回路について検討した。

### E-3. 材料・方法

#### 動物

当研究で使用した全ての動物に対する処置は、Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (US National Research Council Committee, 2011) に基づき管理され、創価大学動物実験委員会で認められたものである。動物は 12 時間の明暗周期下で飼養保管用施設にて収容されている。本研究の実験において、C57BL/6J 系統および GAD67-GFP ノックインマウスである ICR.Cg-Gad1<tm1.1Tama>系統のマウスを使用した。

#### AI 第 3/4 層における in vivo 局所電場電位記録

C57BL/6J 系統の生後 26-30 日の雌マウスを使用し、ウレタン (1 mg/kg, Sigma) とキシラジン (13 mg/kg, Sigma) を腹腔内投与 (i.p.) で麻酔した後、ヒーターマット上で 35°C を維持した。追加の麻酔は、針をあらかじめ挿入しておき、ウレタン 0.325 mg/kg、キシラジン 3.25 mg/kg を必要に応じて補充した。左の聴覚皮質 (ACx) を露出させるため、開頭手術を行い、その後の操作はすべて防音チャンバー内で行った。はじめに、先行研究で示されている通り (Kawai et al., 2007)、AI の場所を特定するために、皮質表面において人工脳脊髄液 (ACSF: 125 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM Glucose, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>) で満たしたガラスピペット (<1 MOhm、直径 30-50 μm) を使用し、

純音刺激 (100 msec) に応答する局所電場電位 (LFP) を記録することで、聴覚皮質における周波数地図を特定した (5-20 kHz、1/3 オクターブステップ)。使用した純音 (pure tone) は PC 上の Tone Generator (NCH) で作られ、デジタルオーディオボード (SE-90PCI, Onkyo, Japan) を介して PC から接続されている増幅器 (STAX, SRM-323S) で増幅された後、マウスの耳から 15 cm 前方に置かれたスピーカー (SR307, STAX) から出力された。作成された純音は ASA mini sound analyzer (Etani Electronics, Japan) でキャリブレーションした。LFP はフィルタリングおよび増幅され (1.5-300 Hz, AB 651J, NIHON KOHDEN)、デジタル化され (Power 1401 mkII, CED)、PC 上の Axograph X で記録した。聴覚刺激の最低閾値である表面特性周波数 (CF) 部位を決定 (より低い強度である 30-40 dB SPL を使用して、明確に周波数地図を観察) した後、皮質表面から 300-400  $\mu\text{m}$  (視床・皮質入力層と推定) まで電極を挿入した。そして、反応の最も早い開始時間 (10.6-15.9 kHz の範囲) が得られる音周波数を決定し、30-40 dB SPL で CF 音誘発性 LFP として記録した。LFP の傾きの安定したベースラインを得た後、生理食塩水で溶解させたニコチン (6 mg/kg、ニコチン酒石酸塩水素塩, N-5260, Sigma) を腹腔内投与した。CF 音誘発 LFP は、3 分間隔で 60 分間記録した。

### In vivo でのデータ解析

Axograph X を使用して、LFP の最大振幅 (最大値  $\pm 0.3$  ms を平均化) と標準偏差、および音刺激前の標準偏差を解析した。LFP 応答は、25 回の刺激ごとと、その平均を測定し、ニコチンの投与前後で比較した。また、音刺激前の標準偏差の解析は、25 回の刺激前 100 ms のそれぞれの波形での標準偏差を求め、その平均をニコチンの投与前後で比較した。

### In vitro 聴覚視床・皮質 (TC) スライス作製

イソフルランで麻酔したマウス（雌 C57BL/6J, P26-30、および雌 ICR, P26-30）を断頭し、すぐに冷やして酸素（95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>）でバブリングした ACSF（125 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM Glucose, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, ~4°C）に移した。先行研究同様に、視床の腹側内側膝状核（MGv）から AI への投射を含む、TC スライス（400-500 μm）を準備した（Cruikshank et al., 2002）。対角線上に 15-20°でカットした後、室温で酸素を常に供給している ACSF 中で 1 時間以上インキュベートした。

### ホールセルパッチ記録

TC スライスを、水浸チャンバー内へ移し、自動温度調整器（TC-324B, WARNER INSTRUMENT CORPORATION）にて 25°C に保温された ACSF が常に灌流（2-3 ml/min）した状況を保つようにした。ホールセルパッチを行うガラスピペット（3-7 MΩ）は、以下の組成の内液を満たして使用した、140 mM K-gluconate, 10 mM KCl, 2 mM Mg-ATP, 0.5 mM Na<sub>2</sub>-GTP, 10 mM phosphocreatine, 10 mM HEPES, 0.5 mM EGTA, 0.3-0.5% biocytin（pH 7.28-7.32, KOH で調整）。EPSC-IPSC バランスを観察する実験では、140 mM CsMeSO<sub>3</sub>, 10 mM CsCl, 2 mM Mg-ATP, 0.4 mM Na<sub>2</sub>-GTP, 10 mM phosphocreatine, 10 mM HEPES, 0.5 mM EGTA, 2 mM QX-314（細胞膜非透過性 Na<sup>+</sup>チャンネル阻害剤）, 0.3-0.5% biocytin（pH 7.28-7.32, CsOH で調整）の内液を用いた。反応は電圧固定および電流固定モード（MultiClamp 700B, Axon CNS）で測定し、2-5 kHz のローパスフィルターと増幅（MultiClamp 700B, Axon CNS）と 20 kHz のサンプリングレートでデジタル化され（Digidata 1440A, Axon CNS）、PC 上の Axograph X で記録した。各実験プロトコルは Axograph X で作成し、制御した。ホールセル記録は、皮質表面から 30-40% 以内に位置する AI 第 3/4 層

の細胞を微分干渉顕微鏡 (IR-DIC) でモニターしながら、適切な細胞を探索して行った。抑制性細胞のホールセル記録においては、青色の励起光で励起させ、緑色の蛍光をモニターすることで、GFP 陽性細胞を特定することができるため、IR-DIC で細胞の状態を見ながら、並行使用して探索した。細胞の内在特性 (活動電位や入力抵抗など) は、矩形電流注入によって取得した。FS 細胞は、GFP 陽性でかつ、矩形電流注入により最大が 100 Hz 以上の活動電位を起し、活動電位間の時間が一定である (adaptation が起こらない) ものを FS 細胞と定義した (Oswald et al., 2009)。

#### 視床・皮質系経路刺激

TC 間の求心性線維の刺激をするために、平行双極性電極を上視床放線 (Superior thalamic radiation, STR) をまたいで置いた。複数のパルス (0.4 ms の二相性パルス) の刺激 (50-100 msec 間隔) は刺激装置とアイソレーター (DS4, Digitimer) から流した。

TC 刺激誘発性の活動電位を記録する実験では、パッチした後、いくつかの強度で刺激を行い、TC 誘発性の興奮性後シナプス電位 (EPSP) があることを特定したのち、強い刺激 (最大 400  $\mu$ A、通常 100-200  $\mu$ A) を流し、活動電位が引き起こされるか特定した。引き起こされない場合でも十分大きい EPSP が観察される場合 (10 mV 以上)、灌流されている通常の ACSF から exciting ACSF (126 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 25 mM Glucose, 0.5 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>) に切り替える。TC 刺激誘発性 EPSC-IPSC の測定でも同様に、通常の ACSF で視床・皮質系経路刺激誘発性の EPSC が観測された後、exciting ACSF に切り替えた後、単一シナプスかどうかの検討を行い、IPSC が観測される刺激強度で、電圧固定を -90 mV から +30 mV まで 20 mV のステップで固定し、TC 刺激誘発性の後シナプス電位を測定した。

FS細胞におけるTC誘発性の単一シナプスEPSC記録に関する実験では、単一シナプス性だと予測されるEPSCを、EPSCが得られる最も小さい刺激で特定した。 $-65\text{ mV}$ （塩化物イオンの平衡電位に近く、塩化物イオンの影響を極力抑えるため）に電圧固定した細胞で、STRを $0.1\text{ Hz}$ 、 $100\text{-}300\text{ }\mu\text{A}$ の強度で、all-or-noneの応答が見られるまで繰り返した。TC入力があることが確認されたら、反応の得られなくなるまで刺激強度をラフに下げていき、反応が得られなくなったらそこから強度を少しずつ（ $1\text{-}5\text{ }\mu\text{A}$ ）あげていき、 $10\text{-}15$ 回同じ強度の刺激によるEPSCの発生確率を観測した。

### In vitroでの薬剤投与

活動電位記録におけるニコチン投与は、exciting ACSFに溶かしたニコチン（ $1\text{ }\mu\text{M}$ ）を、十分にベースラインが安定した後、灌流投与しているexciting ACSFから切り替えた。10分間の投与後、再びexciting ACSFへ切り替え、観察した。

皮質内への局所投与に関しては、 $30$ ゲージの針（外側 $0.3\text{ mm}$ 、内側 $0.15\text{ mm}$ ）をマニピレーターに固定して操作することにした。ACSF（もしくはexciting ACSF）とACSF（もしくはexciting ACSF）に溶かしたニコチン（ $0.3\text{ }\mu\text{M}$ ）の入った2つのシリンジ（ $50\text{ ml}$ ）を用意し、重力供給方式で局所的に投与した（約 $0.17\text{ ml/min}$ ）。ACSF投与中、十分にベースラインが安定した後、ニコチンに切り替え、5分間投与し、その後再度ACSFに切り替え、回復させた。局所投与用の針の先端は、記録電極から $300\text{ }\mu\text{m}$ 程度脳スライスに対して前側へ、スライスに触れないよう少し浮かせて静置させた。

### In vitroでのデータ解析

静止膜電位測定に関しては、得られた波形における特定の時間内の平均振幅から得ることができた。

膜電位の変動は、1 秒間の bin を設定し、静止膜電位からある変動が起こる時間がどれだけあったかを累積分布で示している。

活動電位の数の測定では、Axograph X を使用し、1 トライアルの 5 回の刺激に対して、活動電位がどれだけ発生したかをカウント、その発生数をトライアル数で割ったものである。

単一シナプス性 EPSC の実験では、刺激が入っていない状態のノイズレベルの標準偏差から 3 倍以上の振幅を持つものを EPSC として計測しており、それ以外は発生していないものとしてカウントしている。FS 誘発性の IPSC の計測も同様で、ベースラインノイズの標準偏差から 3 倍以上のものを IPSC として測定し、振幅を計測し振幅の平均値と振幅の標準偏差を算出した。

### 統計解析

統計学的な比較は Microsoft Excel と MATLAB ソフトウェアを用いて行った。統計学的有意差は paired t-test、unpaired Student's t-test にて集団解析を行い、累積分布では Kolmogorov-Smirnov test にて有意差を特定した。全平均データは平均±標準誤差 (SEM) で表している。

## **E-4. 結果**

### AI 第 3/4 における音誘発性 LFP でのニコチン性制御

先行研究の *in vivo* の電気生理学的実験において、AI の視床・皮質系入力層である第 3/4 層での CF 誘発性 LFP は、全身性ニコチン投与により応答速度の上昇と、傾きの増加が見られる。同時に、非 CF 誘発性 LFP では、反応時間の遅延と傾きの減弱が見られる (Kawai et al., 2011; Intskirveli & Metherate, 2012)。

本実験においても同様に、LFP を AI 第 3/4 層で測定し、CF と非 CF で反応を誘発し、ニコチンの影響を

調べた (Fig. 1)。ニコチンの腹腔内投与前と後で、25 回の音刺激に対する反応を比較すると、CF での反応の LFP の最大振幅は増加しており、そのばらつきは減少していることが観察され (Fig. 1B)、平均して  $63.3 \pm 18.7\%$  の増加、 $25.3 \pm 4.5\%$  の減少が見られた (Fig. 1D)。一方、非 CF での反応の LFP の最大振幅は減少 (平均して  $-24.3 \pm 18.0\%$ ) しているが、そのばらつきに関しては大きな違いは見られなかった (Fig. 1C,  $-12.7 \pm 14.8\%$ )。また、音が入る前の自発性 LFP の変動を測定すると、ニコチンが減少させていることがわかった (Fig. 1E, Baseline:  $33.8 \pm 4.3\%$ , Nicotine:  $22.0 \pm 1.0\%$ )。データとして示してはいないが、オシレーション解析をしても、 $\theta$  波から  $\gamma$  波の周波数帯でパワーの優位な減少が見られた。以上のことから、CF 音誘発性の刺激に対しては、入力のばらつきを小さくする、つまり神経活性の同期化が起こり、反応の増強を引き起こしていることが考えられる。非 CF 音の刺激に関しては、ばらつきに変化がないため、CF 音での反応のような同期化以外のメカニズムで、反応が減弱していると考えられる。また、刺激を与えていない状態での LFP の変動の減少や低周波数帯でのオシレーションの減少は、皮質神経回路における非同期化が起こっていると考えられているため、ニコチンが神経回路の非同期化を引き起こしている可能性を示唆している。したがって、*in vivo* における LFP の実験結果から、ニコチン投与により①入力の同期化、②非特異的反應の同期化以外での減弱、③皮質神経回路の非同期化の少なくとも3つが引き起こされていると示唆され、ニコチンの神経回路依存的な制御の可能性が考えられる。

#### 視床・皮質系経路活性依存的活動電位へのニコチンの影響

背景・目的で述べたように、ニコチンの神経活性の機序は複雑な制御を行っているが、皮質カラム内などの微小神経回路においてどのような制御が行われているか未解明な部分が多く、特にフィルタリン

グシステムにおけるニコチン性の神経回路は明らかとなっていない。しかし、LFPの実験で示されるように、ニコチンが神経回路への制御を行っている可能性が高いため、視床・皮質 (auditory thalamocortical: TC) スライスを作成し、*in vivo* における脳の活性状態に近い環境で神経回路活性を知るために、exciting ACSF (高  $K^+$ , 低  $Mg^+$ ,  $Ca^{2+}$ 濃度; Graupner & Reyes, 2013) 中で、興奮性細胞 (Pyramidal neuron: PN) にホールセルパッチクランプを行い、TC 依存的な神経活性を調べた。Exciting ACSF を与えると、静止膜電位 ( $V_{rest}$ ) が上昇し (ACSF:  $-70.4 \pm 2.4$  mV, exciting ACSF:  $-62.6 \pm 1.6$  mV)、自発性活性が増幅される (Fig. 2A-D)。この自発性活性の増幅は、平均的な標準偏差の変化はなく (ACSF:  $0.23 \pm 0.045$  mV, exciting ACSF:  $0.29 \pm 0.08$  mV)、全体的にばらつきに変化が起こるといふより、活性状態と非活性状態のアップ・ダウンの状態が繰り返される (Fig. 2C-D)。Exciting ACSF 下では、神経活性が起こりやすい状態になっているため、TC スライスで、腹側内側膝状体 (Ventral medial geniculate body, MGv) から AI の 3/4 層への経路上にある上視床放線 (Superior thalamic radiation, STR) に刺激電極を置き、電気刺激することで活動電位を測定することができる (Fig. 2E)。通常の ACSF 下では活動電位が起きない細胞も、高い確率 (number of spike / trial, ACSF:  $0.70 \pm 0.33$ , exciting ACSF:  $2.01 \pm 0.50$ ) で活動電位を引き起こすことができた (Fig. 2E-F)。次に、ニコチンの影響を調べるため、exciting ACSF にニコチン ( $1 \mu M$ ) を加えてスライス全体に灌流させたところ、活動電位の発火率が減少した (Fig. 2G-H, number of spike / trial, exciting ACSF:  $1.65 \pm 0.85$ , Nicotine:  $0.49 \pm 0.28$ , Wash:  $0.70 \pm 0.27$ )。ニコチンによるゆるやかな膜電位の脱分極はある (Fig. 2I, exciting ACSF:  $-63.8 \pm 1.4$  mV, Nicotine:  $-62.1 \pm 1.1$  mV, Wash:  $-60.5 \pm 1.9$ , % change  $2.65 \pm 0.96\%$ ) もの、活動電位の減少はそれをはるかに上回る (Fig. 2H,  $-76.2 \pm 11.8\%$ )。以上より、Exciting ACSF は興奮性を増加させ、TC 入力による活動電位の発火率を向上させるが、驚くべきことに、ニコチンの投与によって、その発火率が著しく減少する。先行研究で、ニコチンが TC 経路上の軸索活性を増強させ、入力

同期化による増強を引き起こすことが知られている (Kawai et al., 2007) ため、活動電位 (出力) の増強を予測していたが、それとは反対のことが引き起こされる結果となった。

### Fast spiking 抑制性細胞における TC 刺激誘発性単一シナプス EPSC へのニコチンの影響

興奮性細胞での活動電位の制御機構はいくつか考えられるが、ニコチンが神経回路への影響がある可能性があること (Fig. 1)、またいくつかの抑制性神経細胞に nAChRs の発現が確認されていること (Poorthuis et al., 2013; Koukouli et al., 2017)、そして、AI においても第 1 層の抑制性細胞からの第 2/3 層への脱抑制機構があること (Letzkus et al., 2011; Takesian et al., 2018) などから、抑制性細胞、とくに皮質神経回路内においてフィードフォワード抑制に関する Fast spiking (FS) 細胞の制御について検討した。抑制性細胞は、大脳皮質内の神経細胞の約 20% を占めていることが知られているが、抑制性細胞に特異的にパッチするために、抑制性細胞の神経伝達物質の GABA の合成酵素である Glutamic acid decarboxylase 67 (GAD67) に GFP 遺伝子をノックインしたトランスジェニックマウス ICR.Cg-Gad1<tm1.1Tama> (Tamamaki et al., 2003) を用いて、Fig. 2 同様に TC スライスを作成した。GFP の蛍光反応が確認できた細胞であり、電流注入により早く (最大発火頻度が 100 Hz 以上)、かつ活動電位が頻発しても活動電位間の時間間隔が広くならない (adaptation が起こらない) 発火パターン (Oswald et al., 2009) が観測できたものを FS 細胞とし (Fig. 3A 左下)、その細胞で STR を刺激した時の反応を調べた。AI 第 3/4 層での興奮性細胞における先行研究から、STR での刺激強度を上げるに伴い、EPSC の発生確率 (Success rate) が徐々に上昇し、やがて 100% となる。刺激強度と発生確率はシグモイド曲線を描くことが知られ、またその EPSC はほぼ一定の振幅を持っていることが知られている (Kawai et al., 2007)。3/4 層の FS 細胞でも同様の EPSC の挙動をみることができ、FS 細胞も TC 由来の単一シナプス

を形成していることが示唆された (Fig. 3A-B)。TC 刺激誘発性の EPSC の発生確率が 100% でないところで繰り返し刺激したのち、ニコチンを皮質内へ局所的に投与すると、EPSC の発生確率が減少した (Fig. 3C-D; Baseline:  $45.8 \pm 11.3\%$ , Nicotine:  $25.8 \pm 11.6\%$ , Wash:  $50.0 \pm 14.6\%$ )。一方で EPSC の振幅には大きな影響は見られなかった (Fig. 3E; Baseline:  $126.0 \pm 77.1$  pA, Nicotine:  $139.6 \pm 91.5$  pA, Wash:  $123.5 \pm 84.8$  pA)。この結果から、ニコチン投与により、FS 細胞への TC 入力への伝達効率が減少することが観察され、抑制的な制御が行われている可能性が示唆された。

#### FS 細胞誘発性の IPSC へのニコチンの影響

FS 細胞は皮質内において、局所的 ( $< 100 \mu\text{m}$ ) なフィードフォワードな神経回路を構築していると考えられている (Li et al., 2014)。FS 細胞からの直接的な入力に対して、ニコチンの制御があるかどうかを調べるため、AI の第 3/4 層における興奮性細胞と、その細胞に投射する FS 細胞にダブルホールセルパッチクランプを行った (Fig. 4A)。興奮性細胞を  $-30$  mV に電位固定し、一方の電流固定した FS 細胞で閾値以上の電流 (40 Hz, 200-500 pA) で 5 回連続刺激し、活動電位を引き起こすことで、単一の抑制性後シナプス電流 (IPSC) の入力を記録した (Fig. 4B)。ニコチンの皮質内への局所投与後、1 回目の刺激に対する IPSC の振幅に大きな変化はなかった (Fig. 4C 左, Baseline:  $88.0 \pm 17.2$  pA, Nicotine:  $85.4 \pm 18.3$  pA, Wash-1:  $85.5 \pm 18.6$  pA, Wash-2:  $77.4 \pm 16.4$  pA) が、振幅のばらつきがわずかに減少した (Fig. 4C 右, Baseline:  $17.3 \pm 2.5$  pA, Nicotine:  $15.5 \pm 2.5$  pA, Wash-1:  $17.0 \pm 3.3$  pA, Wash-2:  $15.4 \pm 3.0$  pA)。また、5 回の刺激に対する IPSC の振幅をすべて解析したところ、3 回目以降の刺激に対してわずかな振幅の減少が見られたものの、大きな変化は見られなかった (Fig. 4D, 1 回目 Nicotine:  $0.94 \pm 0.036$ , Wash:  $0.96 \pm 0.059$ 、2 回目 Nicotine:  $0.96 \pm 0.027$ , Wash:  $0.97 \pm 0.043$ 、3 回目 Nicotine:  $0.92 \pm 0.034$ , Wash:  $0.94 \pm 0.035$ 、4 回目

Nicotine:  $0.93 \pm 0.033$ , Wash:  $0.95 \pm 0.044$ , 5 回目 Nicotine:  $0.90 \pm 0.044$ , Wash:  $0.95 \pm 0.047$ )。以上のことから、ニコチンは FS 細胞から興奮性細胞への伝達に関して、直接的には大きく関与していないと考えられる。

### TC 誘発性シナプス応答へのニコチンの影響の検討

これまでのデータから、直接的な FS 抑制性細胞からの興奮性細胞へのニコチン性制御はあまりないものの、FS に対する TC 入力減少 (Fig. 3) といった間接的に制御が行われている可能性がある。第 3/4 層の興奮性細胞における TC 誘発性のシナプス応答を観察するために、パッチした細胞において、固定電圧を変えながら STR を電気刺激することで、その細胞におけるシナプス電流-電圧曲線 (I-V カーブ) を求めることができる (Fig. 5A)。より正確にシナプス応答を単離するために、電極内液には  $K^+$  チャンネルを阻害する  $Cs^+$ 、および活動電位の発生を抑えるために  $Na^+$  チャンネルの阻害剤である QX-314 を含めている (詳しくは材料・方法を参照)。-90 mV から 20 mV ステップで +30 mV まで固定電圧を変更し、それぞれの電圧で TC 誘発性シナプス応答を得た (Fig. 5A 左) あと、刺激を与えない状態でニコチンを 5 分間投与し、再び固定電圧を変えてシナプス応答を確認した (Fig. 5A 右)。TC 入力のみ (皮質内興奮性細胞からの入力を含まない) の影響を知るために、応答開始から 1 ms の電流変化を調べると、ニコチン投与により I-V カーブにおける傾きが減少した (Fig. 5B-D, Nicotine:  $0.71 \pm 0.082$ , Wash:  $0.66 \pm 0.17$ )。一方で、全体的なシナプス応答に関しては、有意的な変化は見られなかったものの (Fig. 5B-D; Nicotine:  $0.90 \pm 0.13$ , Wash:  $0.69 \pm 0.12$ )、観察した細胞 6 つのうち、2 つは応答性が増加し、3 つの細胞では応答性の減少が確認された (Fig. 5D 右)。細胞によりニコチン性制御に違いがある可能性が示唆されたため、それぞれの細胞での EPSC と IPSC を単離して影響を調べた (Fig. 5E-H)。 $Cl^-$  の平衡電位 (-66.0 mV) に

近い-70 mV で電位固定し記録したシナプス応答を EPSC とし、IPSC を含む反応と考えられる-50 mV で記録したシナプス応答から-70 mV でのデータを減算することで、計算的に IPSC を求めた。ニコチン投与により、EPSC および IPSC が共に減少する細胞 (Fig. 5E) と、共に増強する細胞 (Fig. 5E) が確認されたが、全体的な平均を取ると EPSC (Baseline:  $182.2 \pm 73.5$  pA, Nicotine:  $147.0 \pm 46.4$  pA, Wash:  $106.2 \pm 45.5$  pA) も IPSC (Baseline:  $131.2 \pm 63.3$  pA, Nicotine:  $122.9 \pm 36.7$  pA, Wash:  $125.1 \pm 54.2$  pA) も有意的な差は見られなかった (Fig. 5G)。増加率、および減少率に違いがあるかを確認するために、EPSC と IPSC の比をみたところ、一部の細胞を除き、ほとんどが EPSC/IPSC の比が減少しており (Fig. 5H, slope, Baseline: 0.83, Nicotine: 0.73, Wash: 1.2, I/E ratio, Baseline:  $1.51 \pm 0.30$ , Nicotine:  $1.23 \pm 0.28$ , Wash:  $0.87 \pm 0.025$ )、減少した細胞だけで統計学的な解析をした場合、有意的な差が認められた ( $p = 0.0098$ , paired t-test)。これらのことから、ニコチンにより TC 入力のみ興奮性入力は減少しているため、TC 入力は抑えられているにも関わらず、TC 誘発性の皮質内回路活性に伴う EPSC、IPSC に関しては、細胞ごとにニコチンの制御が異なるものの、興奮性優性のバランスをもたらす可能性が示唆された。

## E-5. 考察

本研究では、AI の第 3/4 層におけるニコチン性制御について、抑制性細胞、特に FS 細胞における制御、および興奮性細胞を含む神経回路への制御の検討を行った。第 4 層の興奮性細胞における FS 細胞誘発性の IPSC への直接的な制御はほぼないと考えられるものの、TC 経路における抑制作用があると示唆された。フィードフォワード (Feed-forward) 経路の観点からみると、皮質内回路の活性を促す作用があると考えられるが、TC 誘発性活動電位はむしろ減少する結果となった。しかしながら、TC 誘発性の興奮性・抑制性入力を分けて解析すると、興奮性・抑制性共に活性増加のある細胞と減少傾向にあ

る細胞があり、ニコチンの制御が細胞依存的もしくは回路依存的である可能性が高まった。このような結果から、ニコチン性フィルタリング機構は当初の仮説であった、抑制性細胞によるものである可能性はあるものの、その制御機構は神経回路依存的な可能性があり、さらなる検討を要する必要がある。

### 音誘発性応答におけるニコチン性制御について

本研究で、まず *in vivo* の実験においては、CF 音活性依存的反応と非 CF 音活性依存的反応、そして自発活性状態において、ニコチンの制御が異なっている可能性があることが示唆された。LFP は細胞外電位変化をとらえることができ、その要因は個々の神経細胞における膜電位変化を反映しているが、記録電極周辺の細胞の活性変化としてとらえられる。CF 音誘発性の反応において、LFP の最大振幅の標準偏差の減少が見られたが、これは TC 経路における軸索活性の同期性が向上したためと考えられ、先行研究と矛盾しない (Kawai et al., 2007)。Kawai らによると、TC 軸索での活動電位の同期化が  $\alpha 4\beta 2^*$ -nAChRs を介して引き起こされ、結果的に皮質内での音応答開始のタイミングが早くなることが記されている。また、彼らによると、TC 軸索発火のタイミングも早くなると同時に変動も小さくなる。よって、CF 音応答における変動も小さくなったと考えられる。一方で、非 CF 音における応答の変動に大きな影響はなく、シナプス入力変動の制御による減少ではないことが考えられる。非 CF 音活性は皮質内を平行に伝播していくことが考えられている (Kaur et al., 2005; Happel et al., 2010) が、自発状態 (Baseline)、すなわち TC 入力前の皮質内は変動が小さくなっていることを考えると、むしろ変動が大きくなっている可能性が高い。当然考えられることとして、非 CF 音もその音に対する CF 領域では上記のようなニコチン性増強が行われているはずなので、この減少はニコチンの皮質内制御によるものであると考えられるが、TC 入力前は皮質内変動を小さくしている、これはつまり皮質内状態が脱同期化 (Desynchronization)

している状態であり、この状態は注意・集中やマウスが危険にさらされている時などに見られ、情報処理能力を向上させている状態であると考えられている (Harrero et al, 2008; Cohen & Munsell, 2009; Harris & Thiele, 2011)。この皮質内脱同期化はコリン作動性ニューロンによって引き起こされることが示唆されており、さらに抑制性細胞によって引き起こされている可能性があるが (Eggerman et al., 2014; Chen et al., 2015)、AI の第 3/4 層ではこのような制御機構は明確になっていない。

#### 興奮性細胞、および抑制性細胞におけるニコチン性制御について

海馬培養組織における先行研究では、興奮性細胞のシナプス後部において、ニコチンによる  $\alpha 7$ -nAChRs の活性を介した  $\text{Ca}^{2+}$  の濃度の増加が、GluA1 サブタイプを含む AMPA 受容体の PSD (Postsynaptic density: シナプス後肥厚) への挿入と安定化を引き起こし、これにより EPSC の振幅の増加が引き起こされることが示されている (Halff et al., 2014)。本研究室での永山氏の研究によると、視床・皮質スライスにおいて、AI の第 3/4 層における興奮性細胞では、ニコチン投与により自発性 EPSC の振幅の増加が見られることがわかっている (未発表データ)。また、音誘発性 LFP 反応のニコチンによる増強と GluA1 のリン酸化部位である Ser-845 のリン酸化に相関性があることも示唆されており、さらにそれらのニコチンによる増強は ERK、または PKA を介したシグナリング経路にあることが確認されている (未発表データ)。したがって、AI での第 3/4 層で CF 誘発性興奮を増加させるニコチンのメカニズムの一つとして、Ser-845 のリン酸化を介した興奮性活性増強が考えられるが、これらはニコチン投与によって引き起こされる非 CF 音応答の減弱や自発活性の減少に対しては説明がつかない。しかしながら、本研究で言及してはいないが、LFP でのニコチン活性は約 1 時間、少なくとも 30 分以上継続するため、それらの経時的な活性維持においては、これらのような後シナプスでのシグナリングや AMPA 受容体の

修飾が大きく関わってくる可能性が考えられる。

神経回路内における抑制性介在細胞については、近年の研究で、マウスがひげを動かしたとき、感覚皮質第 2/3 層では脱抑制が引き起こされる (Eggermann et al., 2014)。これはさらなる研究の結果、コリン作動性の VIP<sup>+</sup>細胞が SOM<sup>+</sup>細胞の脱抑制を引き起こすことで起こると明らかにされた (Gasselinet al., 2021)。また別の視覚皮質の研究では、SOM<sup>+</sup>細胞が内在性アセチコリンによって活性化することができ、PV<sup>+</sup>細胞および興奮性細胞の抑制をすることで、LFP の脱同期化が引き起こされると示唆されている (Chen et al., 2015)。聴覚皮質においては、第 1 層にアセチコリンにより活性できる抑制性 5-HT<sup>+</sup>細胞が存在し、MGv の刺激に応答する興奮性細胞および PV<sup>+</sup>細胞の EPSP の振幅を制御していることが明らかにされた (Takesian et al., 2018)。また別の研究においても、第 1 層の抑制性細胞がニコチンで活性化することがわかっており、第 2/3 層の PV<sup>+</sup>細胞の脱抑制を引き起こすことが示唆されており (Letzkus et al., 2011)、また、VIP<sup>+</sup>細胞がニコチン性活性を引き起こすことによって SOM<sup>+</sup>細胞の脱抑制を引き起こすことが示唆されている (Askew et al., 2019)。本実験においては、FS 細胞から興奮性細胞への直接的な制御がなかったが、TC からの単一シナプスにおけるニコチンの制御があったため、間接的にニコチンによる FS への作用が考えられる。TC の単一シナプスの発生確率の減少の機序として現段階では情報が少ないが、複数回連続刺激に対する paired pulse ratio に関しては、特に変化は見られず、放出確率の減少ではないため前シナプス的な調節機構ではなく、また FS 細胞の内在的特性にも大きな変化は見られないため、今後の研究課題である。

興奮性細胞における活動電位の発火率の低下に関しても、これまでの *in vivo* での先行研究からは驚きの結果であるが、ニコチンの皮質内投与における TC 誘発性のシナプス応答を測定すると、TC 入力自体は減少している可能性がある。一方で、TC 誘発性の皮質内回路活性におけるシナプス応答は興奮性優

位となる可能性があり、また、シナプス応答においても細胞特異的な制御の可能性が示唆されるため、複雑な神経活性制御、神経回路制御が行われていると考え、より詳しく検討が必要となる。また、活動電位の発生の観点からみると、マウス TC スライス上で、UP state と呼ばれる活動電位がパケット状に生み出される、もしくはシナプス入力同期化される状態が TC 経路の刺激によって皮質内で引き起こされ、皮質内の細胞の TC 刺激依存的な活動電位は、ほとんどこの UP state 中に発生していることがわかっている (Krause et al., 2014)。しかしながら、覚醒状態のラットの AI では 500 msec 以上続く UP state の発生確率は 0.4% であるという報告もあり、この UP state の影響は未だ議論の余地がある。

Wehr & Zador の *in vivo* ホールセルパッチクランプの実験によると、音刺激によって興奮性入力が起こると、約 4 msec で抑制性入力が起こり、最初の興奮性入力に活動電位が起こるタイミングが一気に消失する、つまり、音刺激から 4 msec 以内に活動電位が引き起こされるという結果が得られている (Wehr & Zador, 2003)。これは音刺激によって、皮質内の抑制性細胞を介したフィードフォワードな抑制性入力が起こっていると考えられる。彼らはこの興奮性入力と抑制性入力のバランス自体は、CF から離れた音でも変わらないことを示すと同時に、CF から離れることで、入力が弱くなり、活動電位発生のランダム性が大きくなってしまったため、CF から離れた音では活動電位が起きにくいと結論付けた。また、Liu らによると、皮質内神経回路によって音のチューニング曲線のバンド幅が最大約半分になることを突き止め、皮質内回路によるチューニングシステムを明らかにした (Liu et al., 2007)。さらにこの皮質内回路において、閾値以上のチューニングにおいて、皮質内興奮性入力が CF 領域の活動電位の閾値を下げ、フィードフォワードな抑制性入力が、CF から離れた部位での閾値を増加させるモデルが提唱されている (Zhou et al., 2012)。一方で、近年の研究では、前脳基底核からのコリン性軸索は、音により活性が起こるが、AI のニューロンで一般的に知られているような最適な周波数活性は示さず、どんな最

適周波数を持つ細胞の近くでも、同じような 9.5 kHz 付近を最大とするチューニングがなされるといった報告もある (Zhu et al., 2023)。

興奮性と抑制性入力のバランスにおいてコリン性制御があるかに関しては、今後より詳細な検討が必要であるが、少なくとも、コリン性制御を受けやすい細胞とそうでない細胞が存在する可能性は高く、さらに TC 誘発性の抑制性細胞へのシナプス入力にも影響があるため、今後、ニコチン性制御における特異的な細胞種または神経回路が存在し、それらのニコチン性フィルタリング機構に関与する可能性について今後検討していきたい。

E-6. 図

Figure 1

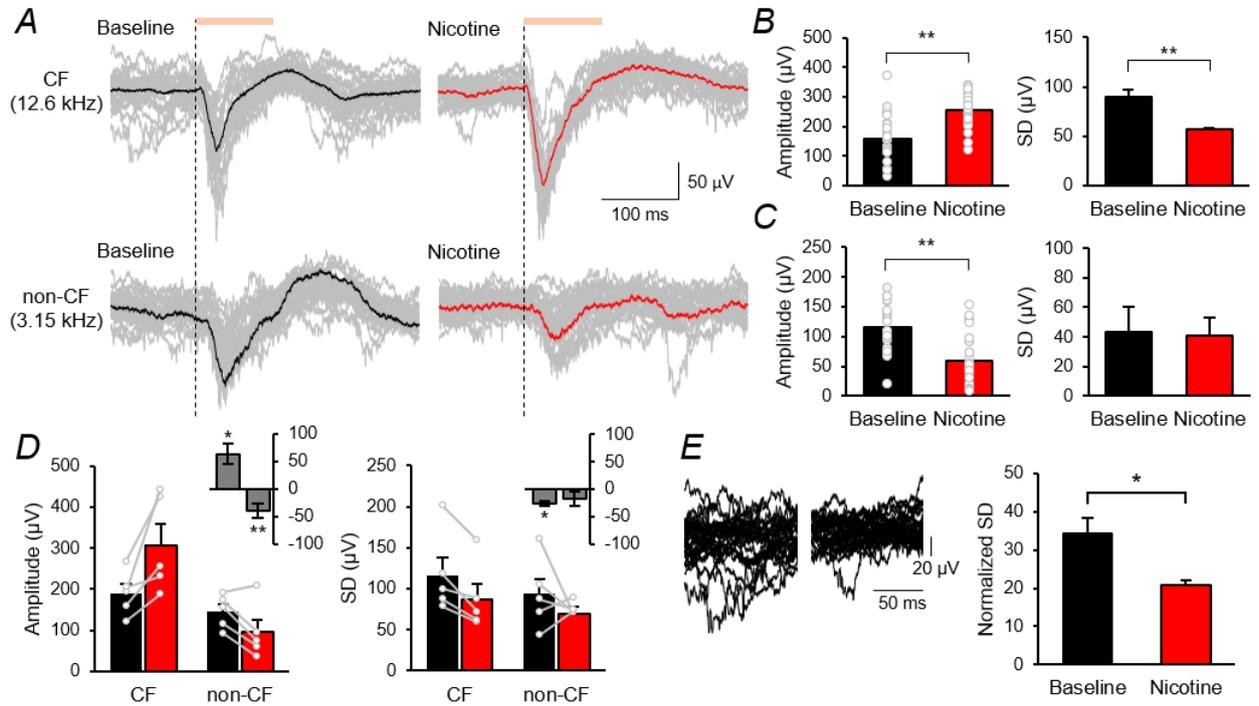


Fig. 1. CF、非 CF 音誘発性応答におけるニコチンの影響

(A) ニコチン投与前 (左側、Baseline) と後 (右側、Nicotine) での、AI の第 2/3 層における CF (上段, 12.6 kHz) と非 CF (下段, 3.15 kHz) 音誘発性 LFP 変化を記録した代表的な波形を示す。黒および赤で示した波形が、25 回刺激の平均波形である。各刺激に対する波形は灰色で示している。垂直の破線は、CF および非 CF 音の開始時で、音の曝露時間はオレンジの太線で示した。

(B) (A) の波形における、CF 音誘発性の LFP の最大強度 (左、Amplitude) とその変動 (右、標準偏差; SD) を Baseline (黒) と Nicotine (赤) で比較した。最大強度のグラフ内の各点は各刺激に対する反応を示している。エラーバーは標準誤差 (Baseline vs. Nicotine, \*\*  $p < 0.01$ , paired t-test)。

(C) (A) の波形における、非 CF 音誘発性の LFP の最大強度 (左、Amplitude) とその変動 (右、標準偏差; SD) を Baseline (黒) と Nicotine (赤) で比較した。最大強度のグラフ内の各点は各刺激に対する反応を示している。エラーバーは標準誤差 (Baseline vs. Nicotine, \*\*  $p < 0.01$ , paired t-test)。

(D) 5 匹のマウスにおける、CF 音 (グラフ内左側) と非 CF 音 (グラフ内右側) 誘発性の LFP の最大強度 (左、Amplitude) とその変動 (右、標準偏差; SD) を Baseline (黒) と Nicotine (赤) で比較した。灰色で表した点と線は、各サンプルを能わしている。挿入された図は、Baseline から比較した変化量 (%) を示している。エラーバーは標準誤差 (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , paired t-test)。

(E) 図の左側にて、音活性前の自発性 LFP のニコチン投与前 (左) の 25 波形と、投与後 (右) の波形を示した。また、左側の各波形の 100 ms 中で得られた変動を、右側のグラフで Baseline と Nicotine で比較した (\*  $p < 0.05$ , paired t-test)。

**Figure 2**

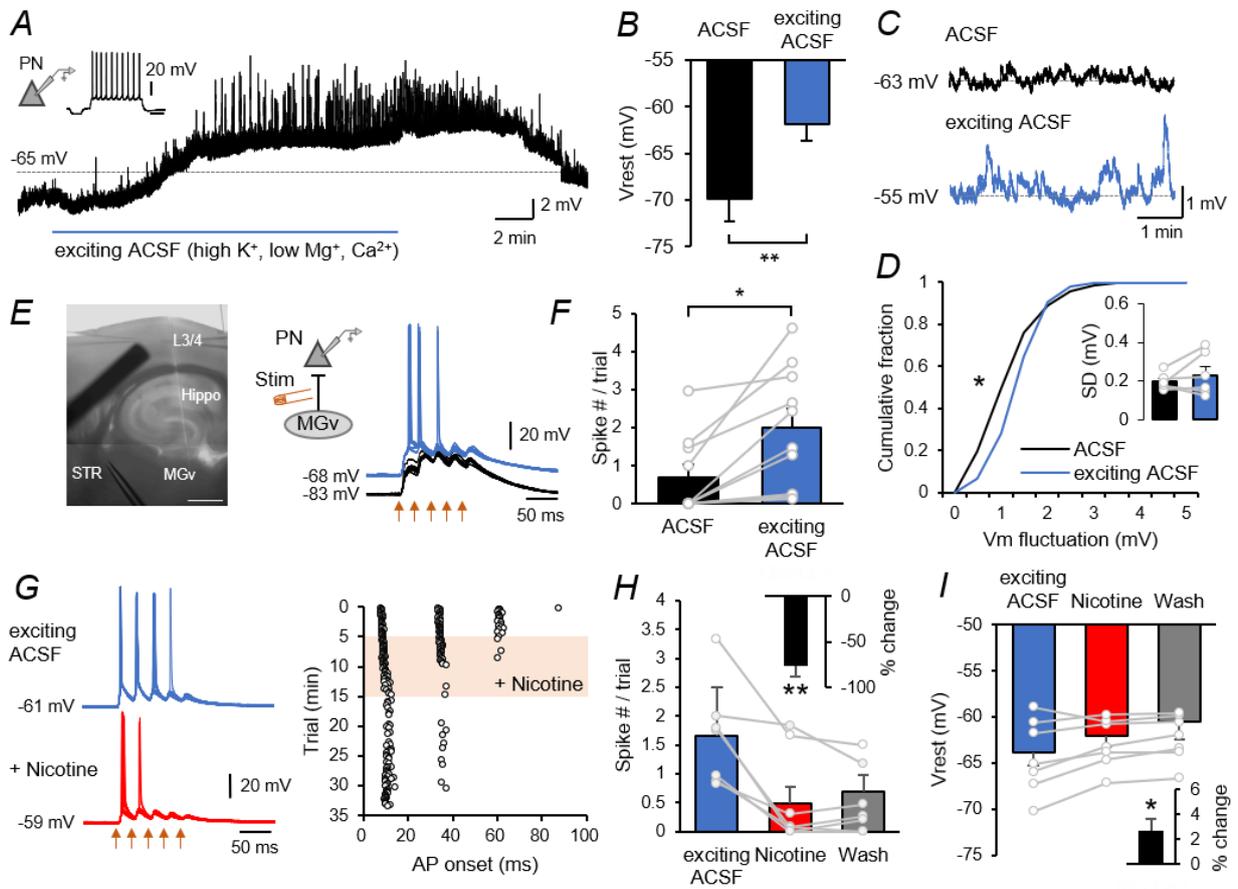


Fig. 2. TC 刺激誘発性活動電位におけるニコチンの影響

(A) Exciting ACSF 灌流に伴う自発性活性の影響。興奮性と予測される錐体細胞 (Pyramidal neuron; PN) でホールセルパッチクランプを行い、電流固定を行なった。青い太線中で exciting ACSF をチャンバー全体的に投与した。細胞の模式図と実際の矩形刺激 (100 pA, 500 msec) による通常発火の波形を左上に示した。

(B) 通常の ACSF (黒) と exciting ACSF (青) 中における静止膜電位 ( $V_{rest}$ ) を比較した ( $n=9$ , ACSF vs. exciting ACSF,  $**p < 0.01$ , paired t-test)

(C) 通常の ACSF (黒) と exciting ACSF (青) の代表的な波形を示した。

(D) 通常の ACSF (黒) と exciting ACSF (青) における静止膜電位の変動 ( $V_m$  fluctuation) を、累積分布で表した (解析方法は材料・方法を参照、 $*p < 0.05$ , Kolmogorov-Smirnov test)。挿入されているグラフは通常の ACSF (黒) と exciting ACSF (青) における静止膜電位の標準偏差 (SD) を表しており、各点は各サンプルを意味している。

(E) 視床経路の刺激による活動電位の発生。左の明視野図は、実際の記録部位 (第 3/4 層; L3/4)、電気刺激部位 (STR)、局所薬剤投与部位 (L3/4 からやや内側) を表している。中央の模式図は、記録細胞と刺激電極、MGv の位置関係を簡略して示した。右側の波形は、実際に記録した通常 ACSF (黒)、exciting ACSF (青) 中での STR 刺激 (5 回, 40 Hz, 100 pA) 各 10 回行った反応を重ねたものである。オレンジの矢印のタイミングで刺激している。L3/4: 第 3/4 層、Hipp: Hippocampus、STR: Superior thalamic radiation、MGv: Ventral medial geniculate body、PN: Pyramidal neuron、Stim; Stimulation。

(F) 通常の ACSF (黒) と exciting ACSF (青) における活動電位の数を比較したグラフである。1 トライアル (5 回, 40 Hz, 50-200 pA) 刺激中における活動電位の数を示した。各点はパッチした細胞の各データである ( $n=9$ , ACSF vs. exciting ACSF,  $*p < 0.05$ , paired t-test)。エラーバーは標準誤差。

(G) 左の波形は、実際に記録した exciting ACSF (青) とニコチン投与 (赤) 下での STR 刺激 (5 回, 40 Hz, 50-200 pA) 各 10 回行った反応を重ねたものである。オレンジの矢印のタイミングで刺激している。右側は、トライアルと活動電位の発生したタイミング (白抜きの丸、AP onset) をあらかわしたもので、オレンジで色付けされているトライアル中でニコチンが投与されている。

(H) Exciting ACSF (青) とニコチン投与下 (赤)、またニコチン投与終了後 (灰) の各トライアルにおける活動電位の数の平均の変化を示している。各点はパッチした細胞ごとのデータを示している。右上に挿入されている図は、各データを exciting ACSF のデータで平均化したもので、%変化を表している ( $n=6$ , exciting ACSF vs. Nicotine,  $**p < 0.01$ , paired t-test)。エラーバーは標準誤差。

(I) Exciting ACSF (青) とニコチン投与下 (赤)、またニコチン投与終了後 (灰) の静止膜電位の変化を示している。各点はパッチした細胞ごとのデータを示している。右下に挿入されている図は、各データを exciting ACSF のデータで平均化したもので、%変化を表している ( $n=7$ , exciting ACSF vs. Nicotine,  $**p < 0.01$ , paired t-test)。エラーバーは標準誤差。

**Figure 3**

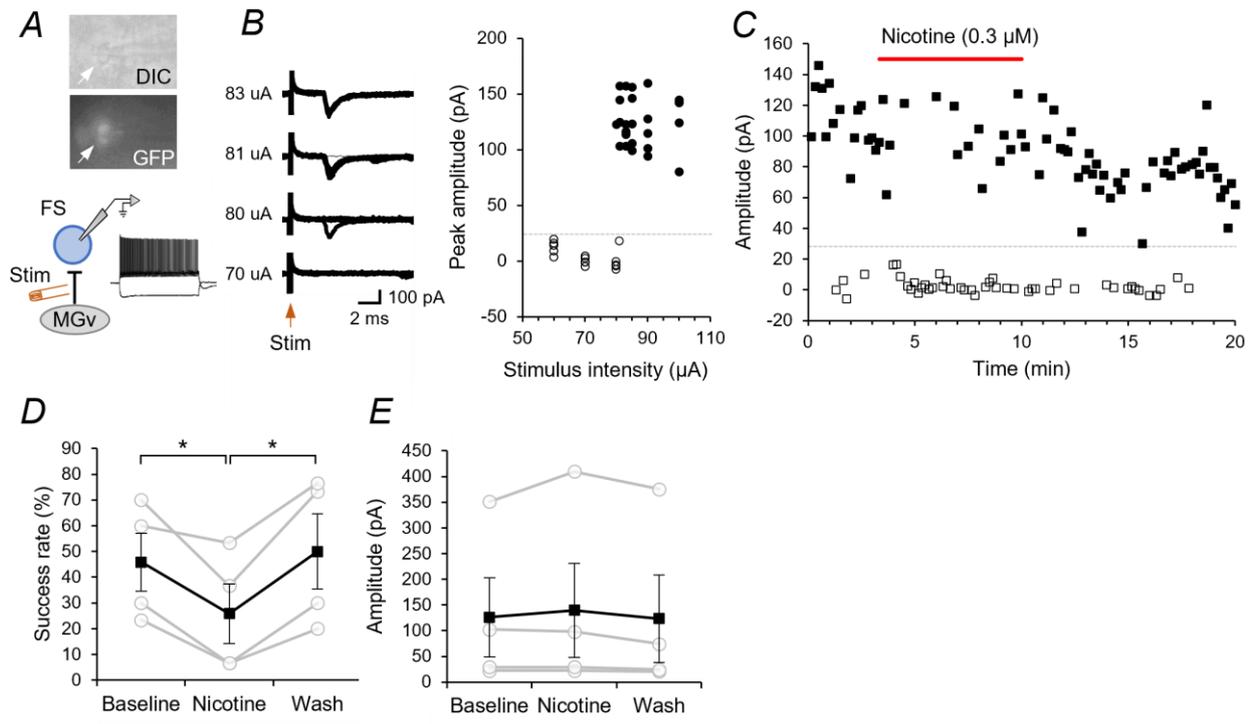


Fig. 3. FS 抑制性細胞における TC 刺激誘発性単一シナプス電流へのニコチンの影響

(A) FS 抑制性細胞の判別方法。DIC (上段) と GFP (下段) 画像。矢印は GFP 陽性細胞。下の模式図は、記録細胞と刺激電極、MGv の位置関係を簡略して示した。その右側には実際の矩形刺激による速い発火パターンの波形を示した。FS: Fast spiking neuron、Stim: Stimulation、MGv: Ventral medial geniculate body

(B) 左側の4つの波形は、-70 mV で電位固定を行い、STR での刺激強度を変えた時の EPSC の波形の違いを示した。それぞれ 15 回ずつ行った刺激の応答の波形を重ねて示している。右側は、刺激強度とそれに伴って出現する EPSC の最大振幅をグラフで表した。黒丸は閾値を超えているもの、白抜き丸は閾値を超えなかったものを表している。灰色の点線は閾値を示している。

(C) EPSC の最大振幅の経時変化。赤い太線の部分で、ニコチンを局所投与していた。(B) 同様に、黒四角は閾値を超えている反応 (Success)、白抜きの四角は閾値を超えなかった反応を表している。灰色の点線は閾値を示している。

(D) ニコチン投与前 (Baseline)、投与中 (Nicotine)、投与後洗浄中 (Wash) における、EPSC の出現確率 (Success rate) を表した。各点はパッチした4つの細胞を表しており、黒四角は平均を表している (n = 4, Baseline vs. Nicotine, Nicotine vs. Wash, \*  $p < 0.05$ , unpaired t-test)。エラーバーは標準誤差。

(E) ニコチン投与前 (Baseline)、投与中 (Nicotine)、投与後洗浄中 (Wash) における、EPSC の振幅を表した。各点は (D) 同様にパッチした4つの細胞を表しており、黒四角は平均を表している (n = 4, Baseline vs. Nicotine, Nicotine vs. Wash, \*  $p < 0.05$ , unpaired t-test)。エラーバーは標準誤差。

**Figure 4**

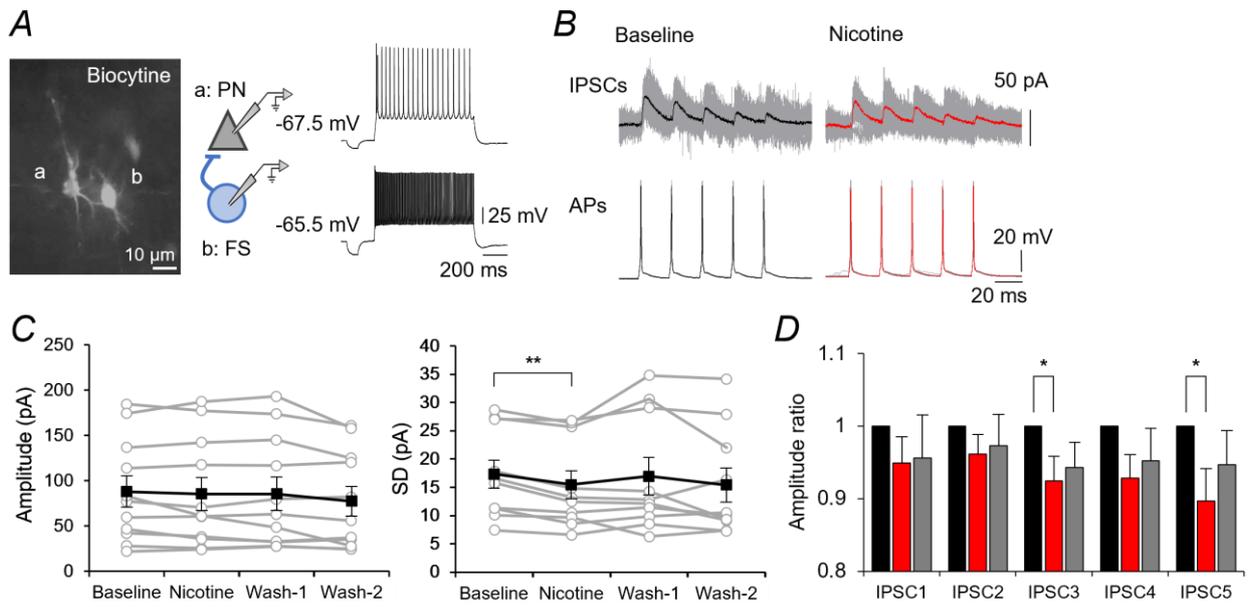


Fig. 4. FS 抑制性細胞誘発性 IPSC へのニコチンの影響

(A) 左図は実際に記録した後、Biocytine での染色画像。a, b の細胞は中央の模式図でも a, b を表しており、右の波形は a と b の細胞それぞれに矩形刺激(200 pA)した際の発火の波形を示した。PN: Pyramidal neuron、FS: Fast spiking neuron。

(B) (A) の b の細胞で活動電位(下段、APs)を 5 回(40 Hz)起こしたことによる a の細胞における IPSC(上段)に対して、ニコチン投与前(Baseline、黒)と投与中(Nicotine、赤)の波形を示している。灰色はそれぞれの刺激と反応を表しており、黒と赤の濃い線は、それぞれ 10 回の平均の波形を示している。

(C) ニコチン投与前(Baseline)、投与中(Nicotine)、投与後洗浄中(Wash-1,2)における、FS 細胞誘発性の IPSC の振幅(左、Amplitude)とその標準偏差(右、SD)を表した。各点はパッチした 11 ペアの細胞を表しており、黒四角は平均を表している(n = 11, Baseline vs. Nicotine, \* $p < 0.05$ , unpaired t-test)。エラーバーは標準誤差。

(D) ニコチン投与前(黒)、投与中(赤)、投与後洗浄中(灰)における、FS 細胞誘発性の IPSC の振幅を投与前で平均化したものを、5 回の刺激により誘発された IPSC ごとに表した(n = 11, Baseline vs. Nicotine, \* $p < 0.05$ , unpaired t-test)。エラーバーは標準誤差。

**Figure 5**

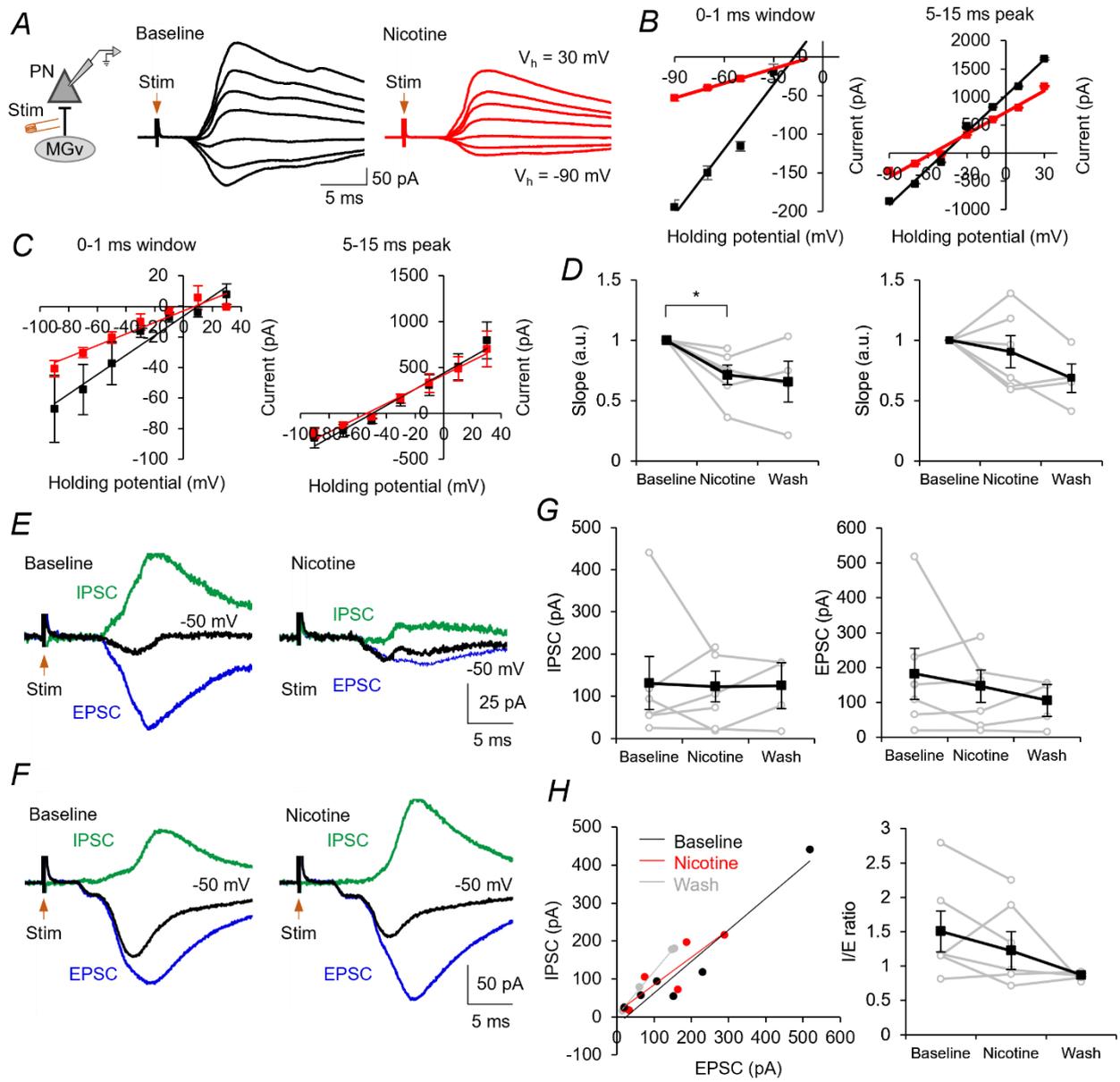


Fig. 5. TC 誘発性シナプス応答のニコチンの影響

(A) 左の模式図は、記録細胞と刺激電極、MGv の位置関係を簡略した図である。ニコチン投与前 (Baseline, 黒) と投与 5-11 分後 (Nicotine, 赤) における、固定電圧 ( $V_h$ ) の違いによる代表的な TC 誘発性シナプス電流を重ねて示した。一つの波形は固定した電圧で 5 回の刺激に対する応答を平均化したものである。電圧固定は -90 mV から +30 mV まで 20 mV ステップで行った。オレンジの矢印の位置で STR を電気刺激している。PN: Pyramidal neuron、Stim: stimulation、MGv: Ventral medial geniculate body。

(B) (A) の波形をもとにした I-V カーブを示した。各固定電圧におけるシナプス応答の開始から 1 ms (左) と 5-15 msec 中の最大振幅 (右) をグラフで示した。黒はニコチン投与前を示し、赤はニコチン投与後を示している。実線は、それぞれのコンディションにおける最小二乗法に基づく近似線を示している。

(C) 6 つのパッチした細胞の各固定電圧におけるシナプス応答の開始から 1 msec (左) と 5-15 msec 中の最大振幅 (右) の平均をグラフで表した。黒はニコチン投与前を示し、赤はニコチン投与後を示している。実線は、それぞれのコンディションにおける最小二乗法に基づく近似線を示している。エラーバーは標準誤差。

(D) 6 つのパッチした細胞における、TC 誘発性のシナプス応答の開始から 1 msec (左) と 5-15 msec 中の最大振幅 (右) の I-V カーブのスロープを、ニコチン投与前 (Baseline)、投与中 (Nicotine)、投与後洗浄中 (Wash) で比較したグラフを示している。すべて Baseline の値で平均化している。灰色で示した点と線は各細胞を表し、黒はその平均を表している ( $n=6$ , Baseline vs. Nicotine, \*  $p < 0.05$ , unpaired t-test)。エラーバーは標準誤差。

(E) ニコチン投与前 (Baseline, 左) と投与 5-11 分後 (Nicotine, 右) において、ニコチン投与により TC 誘発性 EPSC (青) と IPSC (緑) が減少したパターンの代表的な波形を示した。EPSC は -70 mV に電圧固定した時の波形を用い、IPSC は -50 mV に電圧固定した場合の波形から -70 mV ( $\equiv Cl^-$  の平衡電位 -66.0 mV) での波形を減算したものを示した。オレンジの矢印の位置で STR を電気刺激している。

(F) ニコチン投与前 (Baseline, 左) と投与 5-11 分後 (Nicotine, 右) において、ニコチン投与により TC 誘発性 EPSC (青) と IPSC (緑) が増大したパターンの代表的な波形を示した。(E) 同様に、EPSC は -70 mV に電圧固定した時の波形を用い、IPSC は -50 mV に電圧固定した場合の波形から -70 mV での波形を減算したものを示した。オレンジの矢印の位置で STR を電気刺激している。

(G) 6 つのパッチした細胞における、TC 誘発性 IPSC (左) と EPSC (右) の最大振幅を、ニコチン投与前 (Baseline)、投与中 (Nicotine)、投与後洗浄中 5 分間 (Wash) で比較したグラフを示している。灰色で示した点と線は各細胞を表し、黒は全細胞の平均を表している。エラーバーは標準誤差。

(H) 左のグラフは、細胞ごとの TC 誘発性 EPSC、IPSC の大きさの関係を、ニコチン投与前 (Baseline, 黒)、投与中 (Nicotine, 赤)、投与後洗浄中 (Wash, 灰) で表している。実線は、それぞれのコンディションにおける最小二乗法に基づく近似線を示している。右のグラフは、IPSC/EPSC の比を、ニコチン投与前 (Baseline)、投与中 (Nicotine)、投与後洗浄中 5 分間 (Wash) で比較したグラフを示している。灰色で示した点と線は各細胞を表し、黒は全細胞の平均を表している。エラーバーは標準誤差。

## E-7. 参考文献

- Askew C, Intskirveli I, Metherate R (2017) Systemic nicotine increases gain and narrows receptive fields in A1 via integrated cortical and subcortical actions. *eNeuro* 4.
- Askew CE, Lopez AJ, Wood MA, Metherate R (2019) Nicotine excites VIP interneurons to disinhibit pyramidal neurons in auditory cortex. *Synapse* 73(9):e22116.
- Chang EF, Merzenich MM (2003) Environmental Noise Retards Auditory Cortical Development. *Science* 300:498-502.
- Chen X, Leischner U, Rochefort NL, Nelken I, Konnerth A (2011) Functional mapping of single spines in cortical neurons in vivo. *Nature* 475:501–505.
- Chen N, Sugihara H, Sur M (2015) An acetylcholine-activated microcircuit drives temporal dynamics of cortical activity. *Nat Neurosci* 18:892–902.
- Cohen MR, Maunsell JHR (2009) Attention improves performance primarily by reducing interneuronal correlations. *Nat Neurosci* 12:1594–1600.
- Cruikshank SJ, Rose HJ, Metherate R (2002) Auditory thalamocortical synaptic transmission in vitro. *J Neurophysiol* 87:361–384.
- de Villers-Sidani E, Chang EF, Bao S, Merzenich MM (2007) Critical period window for spectral tuning defined in the primary auditory cortex (A1) in the rat. *J Neurosci* 27(1):180-189.
- Dineley KT, Pandya AA, Yakel JL (2015) Nicotinic ACh receptors as therapeutic targets in CNS disorders. *Trends Pharmacol Sci* 36:96–108 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2014.12.002>.
- Disney AA, Aoki C, Hawken MJ (2007) Gain Modulation by Nicotine in Macaque V1. *Neuron* 56:701–713.

- Domino EF, Kishimoto T (2002) Tobacco smoking increases gating of irrelevant and enhances attention to relevant tones. *Nicotine Tab Res* (1):71-78.
- Eggermann E, Kremer Y, Crochet S, Petersen CCH (2014) Cholinergic Signals in Mouse Barrel Cortex during Active Whisker Sensing. *Cell Rep* 9:1654–1660.
- Froemke RC, Merzenich MM, Schreiner CE (2007) A synaptic memory trace for cortical receptive field plasticity. *Nature* 450(7168):425-9.
- Gasselín C, Hohl B, Vernet A, Crochet S, Petersen CCH (2021) Cell-type-specific nicotinic input disinhibits mouse barrel cortex during active sensing. *Neuron* 109:778-787.e3.
- Graupner M, Reyes AD (2013) Synaptic input correlations leading to membrane potential decorrelation of spontaneous activity in cortex. *J Neurosci* 33(38):15075-85.
- Guo W, Chambers AR, Darrow KN, Hancock KE, Shinn-Cunningham BG, Polley DB (2012) Robustness of cortical topography across fields, laminae, anesthetic states, and neurophysiological signal types. *J Neurosci* 32:9159–9172.
- Hackett TA, Barkat TR, O'Brien BMJ, Hensch TK, Polley DB (2011) Linking topography to tonotopy in the mouse auditory thalamocortical circuit. *J Neurosci* 31:2983–2995.
- Halff AW, Gómez-Varela D, John D, Berg DK (2014) A novel mechanism for nicotinic potentiation of glutamatergic synapses. *J Neurosci* 34:2051–2064.
- Happel MFK, Jeschke M, Ohl FW (2010) Spectral integration in primary auditory cortex attributable to temporally precise convergence of thalamocortical and intracortical input. *J Neurosci* 30:11114–11127.
- Harris KD, Thiele A (2011) Cortical state and attention. *Nat Rev Neurosci* 12:509–523.

Herrero JL, Roberts MJ, Delicato LS, Gieselmann MA, Dayan P, Thiele A (2008) Acetylcholine contributes through muscarinic receptors to attentional modulation in V1. *Nature* 454:1110–1114.

Hromádka T, Zador AM, De Weese MR (2013) Up states are rare in awake auditory cortex. *J Neurophysiol* 109:1989–1995.

Intskirveli I, Metherate R (2012) Nicotinic neuromodulation in auditory cortex requires MAPK activation in thalamocortical and intracortical circuits. *J Neurophysiol* 107:2782–2793.

Issa JB, Haeffele BD, Agarwal A, Bergles DE, Young ED, Yue DT (2014) Multiscale optical Ca<sup>2+</sup> imaging of tonal organization in mouse auditory cortex. *Neuron* 83: 944–959.

Kaur S, Rose HJ, Lazar R, Liang K, Metherate R (2005) Spectral integration in primary auditory cortex: Laminar processing of afferent input, in vivo and in vitro. *Neuroscience* 134:1033–1045.

Kawai HD, Kang HA, Metherate R (2011) Heightened nicotinic regulation of auditory cortex during adolescence. *J Neurosci* 31:14367–14377.

Kawai H, Lazar R, Metherate R (2007) Nicotinic control of axon excitability regulates thalamocortical transmission. *Nat Neurosci* 10:1168–1175.

Koukoulis F, Rooy M, Tziotis D, Sailor KA, O'Neill HC, Levenga J, Witte M, Nilges M, Changeux JP, Hoeffler CA, Stitzel JA, Gutkin BS, Digregorio DA, Maskos U (2017) Nicotine reverses hypofrontality in animal models of addiction and schizophrenia. *Nat Med* 23:347–354.

Krause BM, Raz A, Uhlrich DJ, Smith PH, Banks MI (2014) Spiking in auditory cortex following thalamic stimulation is dominated by cortical network activity. *Front Syst Neurosci* 8:1–24.

Kruglikov I, Rudy B (2008) Perisomatic GABA Release and Thalamocortical Integration onto Neocortical

Excitatory Cells Are Regulated by Neuromodulators. *Neuron* 58:911–924.

Letzkus JJ, Wolff SBE, Meyer EMM, Tovote P, Courtin J, Herry C, Lüthi A (2011) A disinhibitory microcircuit for associative fear learning in the auditory cortex. *Nature* 480:331–335.

Levin ED (2002) Nicotinic receptor subtypes and cognitive function. *J Neurobiol* 53:633–640.

Levin ED, McClernon FJ, Rezvani AH (2006) Nicotinic effects on cognitive function: Behavioral characterization, pharmacological specification, and anatomic localization. *Psychopharmacology (Berl)* 184:523–539.

Li LY, Ji XY, Liang F, Li YT, Xiao Z, Tao HW, Zhang LI (2014) A Feedforward Inhibitory Circuit Mediates Lateral Refinement of Sensory Representation in Upper Layer 2/3 of Mouse Primary Auditory Cortex. *J Neurosci* 34:13670–13683.

Liu BH, Wu GK, Arbuckle R, Tao HW, Zhang LI (2007) Defining cortical frequency tuning with recurrent excitatory circuitry. *Nat Neurosci* 10:1594–1600.

Maggi L, Sher E, Cherubini E (2001) Regulation of GABA release by nicotinic acetylcholine receptors in the neonatal rat hippocampus. *J Physiol* 536:89–100.

Picciotto MR (2003) Nicotine as a modulator of behavior: Beyond the inverted U. *Trends Pharmacol Sci* 24:493–499.

Poorthuis RB, Bloem B, Verhoog MB, Mansvelder HD (2013) Layer-specific interference with cholinergic signaling in the prefrontal cortex by smoking concentrations of nicotine. *J Neurosci* 33:4843–4853.

Oswald AM, Doiron B, Rinzel J, Reyes AD (2009) Spatial profile and differential recruitment of GABAB modulate oscillatory activity in auditory cortex. *J Neurosci* 29(33):10321–34.

Rose HJ, Metherate R (2005) Auditory thalamocortical transmission is reliable and temporally precise. *J*

Neurophysiol 94:2019–2030.

Schiff ML, Reyes AD (2012) Characterization of thalamocortical responses of regular-spiking and fast-spiking neurons of the mouse auditory cortex in vitro and in silico. *J Neurophysiol* 107:1476–1488.

Sottile SY, Hackett TA, Cai R, Ling L, Llano DA, Caspary DM (2017) Presynaptic neuronal nicotinic receptors differentially shape select inputs to auditory thalamus and are negatively impacted by aging. *J Neurosci* 37:11377–11389.

Sottile SY, Ling L, Cox BC, Caspary DM (2017) Impact of ageing on postsynaptic neuronal nicotinic neurotransmission in auditory thalamus. *J Physiol* 595:5375–5385.

Sun YJ, Wu GK, Liu BH, Li P, Zhou M, Xiao Z, Tao HW, Zhang LI (2010) Fine-tuning of pre-balanced excitation and inhibition during auditory cortical development. *Nature* 465(7300):927-31.

Sun YJ, Liu BH, Tao HW, Zhang LI (2019) Selective Strengthening of Intracortical Excitatory Input Leads to Receptive Field Refinement during Auditory Cortical Development. *J Neurosci* 39(7):1195-1205.

Stiebler I, Neulist R, Fichtel I, Ehret G (1997) The auditory cortex of the house mouse: left-right differences, tonotopic organization and quantitative analysis of frequency representation. *J Comp Physiol A* 181: 559–571.

Takesian AE, Bogart LJ, Lichtman JW, Hensch TK (2018) Inhibitory circuit gating of auditory critical-period plasticity. *Nat Neurosci* 21:218–227.

Tamamaki N, Yanagawa Y, Tomioka R, Miyazaki JI, Obata K, Kaneko T (2003) Green Fluorescent Protein Expression and Colocalization with Calretinin, Parvalbumin, and Somatostatin in the GAD67-GFP Knock-In Mouse. *J Comp Neurol* 467:60–79.

TEBĒECIS AK (1970) Properties of cholinceptive neurones in the medial geniculate nucleus. *Br J Pharmacol*

38:117–137.

Tsukano H, Horie M, Bo T, Uchimura A, Hishida R, Kudoh M, Takahashi K, Takebayashi H, Shibuki K (2015)

Delineation of a frequency-organized region isolated from the mouse primary auditory cortex. *J Neurophysiol*

113(7):2900-20.

Wehr M, Zador AM (2003) Balanced inhibition underlies tuning and sharpens spike timing in auditory cortex.

*Nature* 426:442–446.

Zhang LI, Bao S, Merzenich MM (2002) Disruption of primary auditory cortex by synchronous auditory inputs

during a critical period. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(4):2309-2314.

Zhou Y, Mesik L, Sun YJ, Liang F, Xiao Z, Tao HW, Zhang LI (2012) Generation of spike latency tuning by

thalamocortical circuits in auditory cortex. *J Neurosci* 32:9969–9980.

Zhu F, Elnozahy SE, Lawlor J, Kuchibhotla K V (2022) A parallel channel of state-dependent sensory signaling

from the cholinergic basal forebrain to the auditory cortex. *bioRxiv:2022.05.05.490613*

## F. 第4章：結論

本研究において、マウス聴覚野におけるニコチン性制御について、以下の結果が得られた。まず、第2章では、①ニコチン投与により、AM音誘発性フラビンタンパク質蛍光応答が、 $\alpha 4\beta 2^*$ -nAChRsを介して増強された。これは神経活性が増強していると考えて差支えなく、この増強は少なくとも25分以上続き、ニコチンがすでに代謝されていると考えられる時間を越えて活性が続いていると示唆される。活性強度においては、音の強度を約10 dB上げるのと同じくらいの蛍光強度変化があり、ニコチンの強い活性制御を表している。②蛍光応答の広がり、皮質内の $\alpha 4\beta 2^*$ -nAChRs、 $\alpha 7$ -nAChRs非依存的に増強され、別のシステムが関与している可能性を示唆している。従来考えられていたCF領域の活性増強、非CF領域での活性減少といったフィルタリングの様相は確認できず、③CF領域、非CF領域共に同様の活性増強となった。また、④AIIやAAFといった非一次領域においても、AI同様に蛍光強度増強が引き起こされていることが分かった。当初の目的であった、ニコチン性フィルタリングの可視化はできなかったが、ニコチンの大規模かつ強力な活性増強制御が観察でき、大脳皮質におけるコリン作動性制御に関する一つの知見を提示したと考える。とりわけ、DH $\beta$ Eの局所注入により、CF領域における蛍光強度増強は阻害できたものの、蛍光強度の広がりにはほぼ阻害できなかったことは、この2者に対して独立した活性制御をもたらしている証左であり、興味深い結果であったと考える。また、AII、AAFといった部位でも活性増強が確認され、これは皮質内のnAChRs非依存的と考えられ、視床からの投射制御もAIと異なるため、今後の研究により新たな制御機構の解明に期待したい。

第3章では、まず⑤ニコチン投与により、CF音誘発性のLFPが増強し、反応のばらつきが小さくなっていること、また非CF音に対する反応は、ばらつきは変わらず、振幅が減少していたことが分かった。つまり、異なるメカニズムで活性の増強と減弱が行われている可能性がある。また、*in vitro*のTC

スライス実験では、⑥FS細胞からの興奮性細胞への直接的なニコチン性制御はなかった一方で、⑦FS細胞におけるTC誘発性のEPSCのsuccess rateは減少しており、TC誘発性フィードフォワード抑制の減少が示唆されたが、⑧TC誘発性の活動電位が抑制されてしまうことが分かった。これまでの先行研究から考えるに、TC回路における活動電位の減少は、興奮性・抑制性共に減少している可能性があり、実際に調べてみると⑨興奮性・抑制性共に増加、もしくは共に減少していることが分かった。一方で、⑩増強、もしくは減少のバランスはいずれにせよ興奮性に偏ってくることも分かった。これらは細胞特異的、もしくは回路特異的なニコチン性制御がある可能性が示唆されるため、今後はより詳細な解析が必要となってくる。一つのアイデアとして、以前の私たちの研究室での実験で、第4層の興奮性細胞において、樹状突起の側枝が多いものと少ないものがあり、それぞれでニコチンの制御が異なることが示唆されている。まだその制御機序は分かっていないが、このアイデアに基づくとすると、ニコチンによる興奮回路と抑制回路が存在する可能性が示唆され、知覚情報処理におけるニコチン性制御の新たな知見となると考える。

以上のことから、結論として、マウスAIにおけるニコチン性フィルタリング機構は、第3/4層における細胞もしくは回路依存的な制御の結果である可能性があり、フラビン蛍光イメージングではとらえられないほど緻密な機構であることが示唆される。また、*in vitro*と*in vivo*のデータをつなぎ合わせるためにも、またその制御の仕方が違う可能性に加え、細胞種もしくは回路依存的な活性の違いがある可能性も考慮しながら、ニコチン性フィルタリング機構の解明に向けて、今後は*in vivo*パッチクランプなどを用いた実験が必要となってくると考えられる。

## H. あとがき

私が研究者を目指したのは、幼少期の生き方によるところが大きい。私は、高知県高知市の市内で生まれたが、母が海育ち、父が山育ちで、祖父母の家に行く際は、両親や親戚から自然の楽しみ方を教えてもらい海と山それぞれの大自然を堪能できた。また、私にはあまり感じさせなかったが、常に家計は貧しく共働きであり、一人っ子ということもあったため、私が寂しくないようにと、常に生き物を傍に置いてくれた。犬や鳥、ハムスター、金魚や熱帯魚、イモリ、カメ、カブトムシ…とにかく私が興味を持ったものは、母が苦手なものでも基本的に飼わせてくれた。特に魚の飼育にはまってしまい、気づけば 10 本の水槽にグッピーなど小さいものから、古代魚であるアロワナまで手を出し、また父と共に庭に池を掘り、金魚や近くの川で獲ってきたアブラハヤ、小さなナマズなどを飼っていた。水槽や池という閉ざされた空間は、生き物がいる限り汚れていってしまう。観察は好きだが世話をするのがめんどろな私は、いかに汚れないようにするか、ろ過器に何を投入するかといった研究をしていたが、そういった中で、生き物のことを知ることが好きになっていった。半面、生き物の死にいつも間近で接してきたこともあり、「生かしていく（生きていく）ことの大変さ」を、子供ながらに感じていた。小学校の卒業文集では「生き物の研究者になりたい」と書いていたようだが、大学に入り、身の程を知った私は就職活動をし出した。どれもしっくりこず、教員の道を考え、指導教員の川井先生に相談したところ、「現在の子供たちの理科離れは、教員が科学の本質を教えられていないことにあるのではないか、科学の本質とはすなわち『探究』である」と教えて頂き、大学院で「探究」して教員になろうと、大学院修士課程へ進んだ。研究テーマは今と変わらず、ニコチンによる聴覚情報処理メカニズムについてであったが、川井先生に師事したいと思っていた私は、川井先生から一番指導が受けられ、議論ができると思ったこのテーマにした。当初、卒業研究時はウエスタンブロットと免疫蛍光染色によって、ニコチンによる ERK

や CREB といった神経活性因子を観察していたが、川井先生、根本先生、そして故・木暮先生に *in vivo* の神経活動を測定する装置を設置して頂き、川井先生が UCI (カリフォルニア大学アーバイン校) で行っていた局所電場電位 (LFP) の測定を開始した。当初はうまく神経活動を観測できなかつた上、波形が何を表すのかも理解できなかつたが、リアルタイムで神経活動を測定するということに興奮して研究室に籠っていたことを覚えている。LFP の観測確度が上がり出した頃、母校である高知学芸中学高等学校で教育実習を行った。楽しい実習ではあったが、実習から戻ってきた後、川井先生から「博士はどうするの」と聞かれ、博士課程にいける可能性があるのだと感じ、博士課程進学を決意した。その頃から、ホールセルパッチクランプにも取り組み、一次聴覚皮質の抑制性細胞へのニコチン性制御について探求しだした。抑制性細胞は脳皮質に約 20% 存在すると言われていた細胞で、多様な細胞種を有し、実に豊かな機能を有するが、機能解析には神経回路的な研究が必要であるため実験が難しかった。この研究に期待をして頂き、ダブルホールセルパッチクランプ装置の立ち上げと、抑制性細胞マーカーでもある GAD への GFP ノックインマウスの飼育を開始して頂き、現在に至っている。研究を進めていくにあたり、ニコチンの制御は、かなり大規模かつ細胞特異的で緻密な制御を行っていることがわかり、その大胆さと緻密さに感動していった。脳を「探究」していくと、脳という臓器の底知れぬ美しさに感動の連続だった。またこの数年間、社会的にも「トランスジェンダー」という言葉が広がり理解をされていく中、脳は生物学的な雌雄を超えていける、すなわち、生物学的に運命付けられた生き方をも脳は変えていける可能性をも秘めていることに気づき、感動を覚えた。創価大学の「創価」とは「価値の創造」という意味があるが、まさに脳は「生命の価値」を創造する臓器であると感じ、「生きるとはどういうことか」を探求する生命科学の分野において、「最後のフロンティア」と呼べるにふさわしいと感じる。もちろん、脳以外の器官もそれぞれ美しい働きをしているが、私は私の探究で得た感動を伝えていき、

幼い頃感じた「生きていくことの大変さ」ではなく「生きていくことの美しさ」を伝えていく研究者になりたいと思っている。

この場をお借りして、本研究において、川井研究室でこれまで共に実験をしてきた同志の皆さんへ尽くせぬ感謝を申し上げます。昼夜問わず、共に志を持ちながら研究に励んできた労苦にどれだけ励まされてきたか計り知れません。とりわけ、一番楽しかった日々を過ごした同期である鈴木俊雄さん、野村正明さん、山崎賢一さん、Shin Hyeryun さん、Chang Minzi さんに心からの感謝と敬意を申し上げます。

第2章においては、フラビン蛍光イメージングの立ち上げと画像解析方法の確立、また必要な機材の提供等、根本正史先生に多大なご尽力を頂きました。本論文においても温かい励ましを賜り、心より感謝申し上げます。また、新潟大学脳研究所生命科学リソース研究センターの菱田竜一先生からは、技術的なアドバイスを賜り、大変にありがとうございました。菱田先生には、博士論文の副査にもついて頂きました。重ねて厚く御礼申し上げます。本研究室のフラビン蛍光イメージングは、2015年に立ち上げ、多くの卒研生・修士生と共に、現在のイメージングの質に到達しました。特に、卒研生であった高橋伸彦さんとはフラビンイメージングと局所電場電位（LFP）との同時測定に挑戦したり、修士生の国井賢一さんとは、マウスの覚醒状態でのイメージングに挑戦したりと、多くの試行錯誤を共にできました。この場をお借りして、感謝申し上げます。また、本学の元助教であった山崎大志先生に MATLAB のプログラミングの技術指導を賜りました。加えて、山崎先生の所属先であった渡辺研究室に3Dプリンターをお借りすることで、マウスを固定するプレートやステージなどを自作でき、適切なイメージング装置を作成することができました。重ねて感謝申し上げます。

第3章では、ホールセルパッチクランプ技術を教えて頂いた、鈴木俊雄さん、永山貴大さんに感謝申

し上げます。特に永山さんとは、ダブルホールセルパッチクランプ装置の立ち上げ時から共に過ごし、非常に高度な技術を前に、切磋琢磨しながら技術を高め合うことができました。解析技術や、鋭い洞察力、忍耐強い実験力、永山さんから学ぶことは多く、彼なしにここまで来ることはあり得ませんでした。この場をお借りして、心から感謝申し上げます。また、*in vivo* の LFP 記録の実験においては、2013 年の立ち上げ時から、平良正和さんと共に試行錯誤しながら記録の確度を上げ、現在の質にすることができました。本当にありがとうございました。

本研究室の川井秀樹教授には、各実験装置の立ち上げから実験・解析指導、論文作成など、数えきれないほどの激励とご指導を賜りました。生化学、および電気生理学に造詣の深い川井先生とのディスカッションから、イメージングで視えてくる一つ一つの事象を深く洞察することができました。本論第 2 章における主論文となった投稿論文 (Nakanishi et al., 2022) においても、英語の添削も含めて、根気強く指導して下さったおかげで、大脳皮質聴覚野におけるニコチン性制御に一石を投じる論文となりました。また、電気生理学の基礎から実践に渡り、広くご教授頂きました。高い技術が要請されるパッチクランプを手取り足取り学ぶ中で、実験の在り方、研究の在り方を教えて頂きました。川井先生との議論の中で、電気生理学者ならではの理論や考察、とりわけ一つの波形から、私には見えない多くのことを見ることができる洞察力に触れることができました。2011 年に川井ゼミに入ってから 12 年間、意志の弱い私を忍耐強く励まし、支えてくださいました。本論文においても、最後の最後まで応援してくださいました。川井先生に師事できたことが、私の人生の宝になることと確信しております。本当にありがとうございました。

また、2021 年に亡くなられた故・木暮信一先生には、研究室が異なる私に対してもいつも応援を頂き、私の性格や成績を見抜いた上で大きな期待をしてくださいました。木暮先生の最期の著作「自然死への

歩み」(東京図書出版)では、脳科学者として生き切った結論として「感謝・感動の生き方」を提唱されておりました。人生に深い洞察を頂く贈り物でありました。ご冥福をお祈りすると共に、これまでの激励に深く御礼申し上げます。

最後に、心配しながらもずっと支えてくれた両親、義両親、そして妻・香菜へ感謝申し上げます。また、陰に陽に励ましてくれた創価学会の地域の皆様方、男子部の亀岡文彦さん、太田隼人さん、そして人生の師である創立者・池田先生に感謝申し上げると共に、人類に貢献し得る研究者となることを誓い、あとがきとさせていただきます。

2023年8月17日

## I. 補足資料

### MATLAB code

```
1 function Flavin_imaging_ver19_3(varargin)
2
3 if nargin < 1
4     prompt = ['Folder name:', 'Image number:', 'Trial number:',
5 'Average from:', 'Average to:', 'Set colormap range from:', 'Set
6 colormap range to:', 'Imaging side:'];
7     dlg_title = 'Input data';
8     answer = inputdlg(prompt, dlg_title, [1 50; 1 30; 1 30; 1
9 30; 1 30; 1 30; 1 30; 1 10]);
10    All_read_images = char(answer{1});
11    num_images = str2double(answer{2});
12    num_trials = str2double(answer{3});
13    first_avg_num = str2double(answer{4});
14    last_avg_num = str2double(answer{5});
15    set_range1 = str2double(answer{6});
16    set_range2 = str2double(answer{7});
17    mouse_side = char(answer{8});
18 else
19    All_read_images = char(varargin{1});
20    num_images = str2double(varargin{2});
21    num_trials = str2double(varargin{3});
22    first_avg_num = str2double(varargin{4});
23    last_avg_num = str2double(varargin{5});
24    set_range1 = str2double(varargin{6});
25    set_range2 = str2double(varargin{7});
26    mouse_side = char(varargin{8});
27 end
28
29 global gAvg_trial;
30 global gAll_trial;
31 global gGauss_avg_trial;
32 global gstd_cal;
33 global gThreshold_trial;
34 global gavg_peak_cal;
35 global gavg_evoked_peak_cal;
36 global gLR_avg_trial;
37 global gCal_box;
38 global gshow_contour;
39 global gdiff_trial;
40 global gmovie_on;
41 global gthr_p_val;
42 global gsection_val;
43 global gdesign_peak;
44 global gROI_peak;
45 global gROI;
46 global r_rad_ii_r_x_r_y_r_centers r_roi_num r_i_r_num b_x_ax_y_ax
47 b_l4 Im_num_1 Avg_box_cal Avg_box_cal_org Xpix Ypix Im_num_tx_2
48 Im_num_tx_3 Im_num_tx_4 Im_num_tx_5 Im_num_2 Im_num_3 Im_num_4
49 Im_num_5 back_1 back_2 back_3 back_4 r_f_r_pos1 r_pos2 r_pos3
50 r_pos4 r_pos5 r_pos6 cli_ms rsize_val r_tex;
51 global gCF_low
52
53 fig = figure('Position', [350 150 650 550]);
54
55 txt = uicontrol(fig, 'Style', 'Text',...
56 'String', 'Show options:',...
57 'fontsize', 13, 'FontWeight', 'bold',...
58 'Position', [20 490 150 30]);
59 txt = uicontrol(fig, 'Style', 'Text',...
60 'String', 'Filter options:',...
61 'fontsize', 13, 'FontWeight', 'bold',...
62 'Position', [20 330 150 30]);
63 txt = uicontrol(fig, 'Style', 'Text',...
64 'String', 'Calculation options:',...
65 'fontsize', 13, 'FontWeight', 'bold',...
66 'Position', [280 490 200 30]);
67 txt = uicontrol(fig, 'Style', 'Text',...
68 'String', '※ Please check filter option',...
69 'fontsize', 10, 'FontWeight', 'bold',...
70 'Position', [330 460 250 30]);
71 cbx1 = uicontrol(fig, 'Style', 'checkbox',...
72 'String', 'Show all trials',...
73 'fontsize', 10, 'FontWeight', 'bold',...
74 'Position', [50 410 150 40],...
75 'Value', 0,...
76 'Callback', @cbx1_trial);
77 cbx2 = uicontrol(fig, 'Style', 'checkbox',...
78 'String', 'Gaussian',...
79 'fontsize', 10, 'FontWeight', 'bold',...
80 'Position', [50 290 150 40],...
81 'Value', 0,...
82 'Callback', @cbx2_trial);
83 cbx3 = uicontrol(fig, 'Style', 'checkbox',...
84 'String', 'SDV value',...
85 'fontsize', 10, 'FontWeight', 'bold',...
86 'Position', [370 140 250 40],...
87 'Value', 0,...
88 'Callback', @cbx3_trial);
89 cbx4 = uicontrol(fig, 'Style', 'checkbox',...
90 'String', 'Threshold trial',...
91 'fontsize', 10, 'FontWeight', 'bold',...
92 'Position', [330 180 150 40],...
93 'Value', 0,...
94 'Callback', @cbx4_trial);
95 cbx5 = uicontrol(fig, 'Style', 'checkbox',...
96 'String', 'Max & Min intensity (each
97 image)',...
98 'fontsize', 10, 'FontWeight', 'bold',...
99 'Position', [330 420 250 40],...
100 'Value', 0,...
101 'Callback', @cbx5_trial);
102 cbx6 = uicontrol(fig, 'Style', 'checkbox',...
103 'String', 'Max & Min intensity (fixed
104 position)',...
105 'fontsize', 10, 'FontWeight', 'bold',...
106 'Position', [330 380 300 40],...
107 'Value', 0,...
108 'Callback', @cbx6_trial);
109 cbx7 = uicontrol(fig, 'Style', 'checkbox',...
110 'String', 'Show average trials',...
111 'fontsize', 10, 'FontWeight', 'bold',...
112 'Position', [50 450 250 40],...
113 'Value', 0,...
114 'Callback', @cbx7_trial);
115 cbx8 = uicontrol(fig, 'Style', 'checkbox',...
116 'String', 'Lucy-Richardson deconvolution',...
117 'fontsize', 10, 'FontWeight', 'bold',...
118 'Position', [50 210 250 40],...
119 'Value', 0,...
120 'Callback', @cbx8_trial);
121 cbx9 = uicontrol(fig, 'Style', 'checkbox',...
122 'String', 'Average processing (box
123 analysis)',...
124 'fontsize', 10, 'FontWeight', 'bold',...
125 'Position', [50 250 250 40],...
126 'Value', 0,...
127 'Callback', @cbx9_trial);
128 cbx10 = uicontrol(fig, 'Style', 'checkbox',...
129 'String', 'Show contour',...
130 'fontsize', 10, 'FontWeight', 'bold',...
131 'Position', [80 170 250 40],...
132 'Value', 0,...
133 'Callback', @cbx10_trial);
134 cbx11 = uicontrol(fig, 'Style', 'checkbox',...
135 'String', 'Difference images',...
136 'fontsize', 10, 'FontWeight', 'bold',...
137 'Position', [370 340 150 40],...
138 'Value', 0,...
139 'Callback', @cbx11_trial);
140 cbx12 = uicontrol(fig, 'Style', 'checkbox',...
141 'String', 'Movie',...
142 'fontsize', 10, 'FontWeight', 'bold',...
143 'Position', [330 20 150 40],...
144 'Value', 0,...
145 'Callback', @cbx12_trial);
146 cbx13 = uicontrol(fig, 'Style', 'checkbox',...
147 'String', 'p value',...
148 'fontsize', 10, 'FontWeight', 'bold',...
149 'Position', [370 100 150 40],...
150 'Value', 0,...
```

```

151         'Callback', @cbx13_trial);
152 cbx14 = uicontrol(fig, 'Style', 'checkbox',...
153         'String', 'Section value',...
154         'fontSize', 10, 'FontWeight', 'bold',...
155         'Position', [330 60 150 40],...
156         'Value', 0,...
157         'Callback', @cbx14_trial);
158 cbx15 = uicontrol(fig, 'Style', 'checkbox',...
159         'String', 'Designate position',...
160         'fontSize', 10, 'FontWeight', 'bold',...
161         'Position', [370 300 150 40],...
162         'Value', 0,...
163         'Callback', @cbx15_trial);
164 cbx16 = uicontrol(fig, 'Style', 'checkbox',...
165         'String', 'ROI around peak',...
166         'fontSize', 10, 'FontWeight', 'bold',...
167         'Position', [370 260 150 40],...
168         'Value', 0,...
169         'Callback', @cbx16_trial);
170 cbx17 = uicontrol(fig, 'Style', 'checkbox',...
171         'String', 'ROI detection',...
172         'fontSize', 10, 'FontWeight', 'bold',...
173         'Position', [370 220 150 40],...
174         'Value', 0,...
175         'Callback', @cbx17_trial);
176 cbx18 = uicontrol(fig, 'Style', 'checkbox',...
177         'String', 'non-CF',...
178         'fontSize', 10, 'FontWeight', 'bold',...
179         'Position', [510 300 150 40],...
180         'Value', 0,...
181         'Callback', @cbx18_trial);
182 cbx19 = uicontrol(fig, 'Style', 'checkbox',...
183         'String', 'CF:low freq.',...
184         'fontSize', 10, 'FontWeight', 'bold',...
185         'Position', [450 60 150 40],...
186         'Value', 0,...
187         'Callback', @cbx19_trial);
188
189 cbx3.Enable = 'off';
190 cbx4.Enable = 'off';
191 cbx5.Enable = 'off';
192 cbx6.Enable = 'off';
193 cbx10.Enable = 'off';
194 cbx11.Enable = 'off';
195 cbx12.Enable = 'off';
196 cbx13.Enable = 'off';
197 cbx14.Enable = 'off';
198 cbx15.Enable = 'off';
199 cbx16.Enable = 'off';
200 cbx17.Enable = 'off';
201 cbx18.Enable = 'off';
202 cbx19.Enable = 'off';
203
204 function cbx1_trial(~, ~)
205     gAll_trial = cbx1.Value;
206 end
207 function cbx2_trial(~, ~)
208     if cbx2.Value == 0
209         cbx3.Enable = 'off';
210         cbx4.Enable = 'off';
211         cbx5.Enable = 'off';
212         cbx6.Enable = 'off';
213         cbx10.Enable = 'off';
214         cbx11.Enable = 'off';
215         cbx12.Enable = 'off';
216         cbx13.Enable = 'off';
217         cbx14.Enable = 'off';
218         cbx15.Enable = 'off';
219         cbx16.Enable = 'off';
220         cbx17.Enable = 'off';
221         cbx18.Enable = 'off';
222         cbx19.Enable = 'off';
223         cbx3.Value = 0;
224         cbx4.Value = 0;
225         cbx5.Value = 0;
226         cbx6.Value = 0;
227         cbx10.Value = 0;
228         cbx11.Value = 0;
229         cbx12.Value = 0;
230         cbx13.Value = 0;
231         cbx14.Value = 0;
232         cbx15.Value = 0;
233         cbx16.Value = 0;
234         cbx17.Value = 0;
235         cbx18.Value = 0;
236         cbx19.Value = 0;
237         gGauss_avg_trial = cbx2.Value;
238     elseif cbx6.Value > 0
239         cbx11.Enable = 'on';
240         gGauss_avg_trial = cbx2.Value;
241     elseif (cbx4.Value > 0) && (cbx6.Value > 0)
242         cbx3.Enable = 'on';
243         cbx13.Enable = 'on';
244         cbx17.Enable = 'on';
245         gGauss_avg_trial = cbx2.Value;
246     else
247         cbx4.Enable = 'on';
248         cbx5.Enable = 'on';
249         cbx6.Enable = 'on';
250         cbx10.Enable = 'on';
251         cbx12.Enable = 'on';
252         cbx14.Enable = 'on';
253         cbx19.Enable = 'on';
254         gGauss_avg_trial = cbx2.Value;
255     end
256 end
257 function cbx3_trial(~, ~)
258     gstd_cal = cbx3.Value;
259 end
260 function cbx4_trial(~, ~)
261     if cbx4.Value == 0
262         cbx3.Enable = 'off';
263         cbx3.Value = 0;
264         cbx13.Enable = 'off';
265         cbx13.Value = 0;
266         gThreshold_trial = cbx4.Value;
267     else
268         cbx3.Enable = 'on';
269         cbx13.Enable = 'on';
270         gThreshold_trial = cbx4.Value;
271     end
272 end
273 function cbx5_trial(~, ~)
274     gavg_peak_cal = cbx5.Value;
275 end
276 function cbx6_trial(~, ~)
277     if cbx6.Value == 0
278         cbx11.Enable = 'off';
279         cbx11.Value = 0;
280         cbx15.Enable = 'off';
281         cbx15.Value = 0;
282         cbx16.Enable = 'off';
283         cbx16.Value = 0;
284         cbx17.Enable = 'off';
285         cbx17.Value = 0;
286         cbx18.Enable = 'off';
287         cbx18.Value = 0;
288         gavg_evoked_peak_cal = cbx6.Value;
289     elseif cbx4.Value == 0
290         cbx11.Enable = 'on';
291         cbx15.Enable = 'on';
292         cbx16.Enable = 'on';
293         cbx17.Enable = 'on';
294         cbx18.Enable = 'on';
295         gavg_evoked_peak_cal = cbx6.Value;
296     else
297         cbx11.Enable = 'on';
298         cbx15.Enable = 'on';
299         cbx16.Enable = 'on';
300         cbx17.Enable = 'on';
301         cbx18.Enable = 'on';
302         gavg_evoked_peak_cal = cbx6.Value;
303     end
304 end
305 function cbx7_trial(~, ~)
306     gAvg_trial = cbx7.Value;
307 end
308 function cbx8_trial(~, ~)

```

```

309     if cbx8.Value == 0
310         cbx3.Enable = 'off';
311         cbx4.Enable = 'off';
312         cbx5.Enable = 'off';
313         cbx6.Enable = 'off';
314         cbx10.Enable = 'off';
315         cbx11.Enable = 'off';
316         cbx12.Enable = 'off';
317         cbx13.Enable = 'off';
318         cbx14.Enable = 'off';
319         cbx15.Enable = 'off';
320         cbx16.Enable = 'off';
321         cbx17.Enable = 'off';
322         cbx18.Enable = 'off';
323         cbx19.Enable = 'off';
324         cbx3.Value = 0;
325         cbx4.Value = 0;
326         cbx5.Value = 0;
327         cbx6.Value = 0;
328         cbx10.Value = 0;
329         cbx11.Value = 0;
330         cbx12.Value = 0;
331         cbx13.Value = 0;
332         cbx14.Value = 0;
333         cbx15.Value = 0;
334         cbx16.Value = 0;
335         cbx17.Value = 0;
336         cbx18.Value = 0;
337         cbx19.Value = 0;
338         gLR_avg_trial = cbx8.Value;
339     elseif cbx6.Value > 0
340         cbx11.Enable = 'on';
341         gLR_avg_trial = cbx8.Value;
342     elseif (cbx4.Value > 0) && (cbx6.Value > 0)
343         cbx3.Enable = 'on';
344         cbx13.Enable = 'on';
345         cbx17.Enable = 'on';
346         gLR_avg_trial = cbx8.Value;
347     else
348         cbx4.Enable = 'on';
349         cbx5.Enable = 'on';
350         cbx6.Enable = 'on';
351         cbx10.Enable = 'on';
352         cbx12.Enable = 'on';
353         cbx14.Enable = 'on';
354         cbx19.Enable = 'on';
355         gLR_avg_trial = cbx8.Value;
356     end
357 end
358 function cbx9_trial(~, ~)
359     if cbx9.Value == 0
360         cbx3.Enable = 'off';
361         cbx4.Enable = 'off';
362         cbx5.Enable = 'off';
363         cbx6.Enable = 'off';
364         cbx10.Enable = 'off';
365         cbx11.Enable = 'off';
366         cbx12.Enable = 'off';
367         cbx13.Enable = 'off';
368         cbx14.Enable = 'off';
369         cbx15.Enable = 'off';
370         cbx16.Enable = 'off';
371         cbx17.Enable = 'off';
372         cbx18.Enable = 'off';
373         cbx19.Enable = 'off';
374         cbx3.Value = 0;
375         cbx4.Value = 0;
376         cbx5.Value = 0;
377         cbx6.Value = 0;
378         cbx10.Value = 0;
379         cbx11.Value = 0;
380         cbx12.Value = 0;
381         cbx13.Value = 0;
382         cbx14.Value = 0;
383         cbx15.Value = 0;
384         cbx16.Value = 0;
385         cbx17.Value = 0;
386         cbx18.Value = 0;
387         cbx19.Value = 0;
388         gCal_box = cbx9.Value;
389     elseif cbx6.Value > 0
390         cbx11.Enable = 'on';
391         gCal_box = cbx9.Value;
392     elseif (cbx4.Value > 0) && (cbx6.Value > 0)
393         cbx3.Enable = 'on';
394         cbx13.Enable = 'on';
395         cbx17.Enable = 'on';
396         gCal_box = cbx9.Value;
397     else
398         cbx4.Enable = 'on';
399         cbx5.Enable = 'on';
400         cbx6.Enable = 'on';
401         cbx10.Enable = 'on';
402         cbx12.Enable = 'on';
403         cbx14.Enable = 'on';
404         cbx19.Enable = 'on';
405         gCal_box = cbx9.Value;
406     end
407 end
408 function cbx10_trial(~, ~)
409     gshow_contour = cbx10.Value;
410 end
411 function cbx11_trial(~, ~)
412     gdiff_trial = cbx11.Value;
413 end
414 function cbx12_trial(~, ~)
415     gmovie_on = cbx12.Value;
416 end
417 function cbx13_trial(~, ~)
418     gthr_p_val = cbx13.Value;
419 end
420 function cbx14_trial(~, ~)
421     gsection_val = cbx14.Value;
422 end
423 function cbx15_trial(~, ~)
424     gdesign_peak = cbx15.Value;
425 end
426 function cbx16_trial(~, ~)
427     gROI_peak = cbx16.Value;
428 end
429 function cbx17_trial(~, ~)
430     gROI = cbx17.Value;
431 end
432 function cbx18_trial(~, ~)
433     gnonCF = cbx18.Value;
434 end
435 function cbx19_trial(~, ~)
436     gCF_low = cbx19.Value;
437 end
438
439 uicontrol(fig, 'Style', 'pushbutton', ...
440           'String', 'OK', 'FontWeight', 'bold', ...
441           'Position', [50 30 100 40], ...
442           'Callback', @Image_Cal);
443
444 gAvg_trial = cbx7.Value;
445 gAll_trial = cbx1.Value;
446 gGauss_avg_trial = cbx2.Value;
447 gstd_cal = cbx3.Value;
448 gThreshold_trial = cbx4.Value;
449 gavg_peak_cal = cbx5.Value;
450 gavg_evoked_peak_cal = cbx6.Value;
451 gLR_avg_trial = cbx8.Value;
452 gCal_box = cbx9.Value;
453 gshow_contour = cbx10.Value;
454 gdiff_trial = cbx11.Value;
455 gmovie_on = cbx12.Value;
456 gthr_p_val = cbx13.Value;
457 gsection_val = cbx14.Value;
458 gdesign_peak = cbx15.Value;
459 gROI_peak = cbx16.Value;
460 gROI = cbx17.Value;
461 gnonCF = cbx18.Value;
462 gCF_low = cbx19.Value;
463
464 %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
465 %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
466 function Image_Cal(~, ~)

```

```

467
468     close all
469
470 %currentfolder_path = pwd;
471
472 Avg_trial = gAvg_trial;
473 All_trial = gAll_trial;
474 Gauss_avg_trial = gGauss_avg_trial;
475 std_cal = gstd_cal;
476 Threshold_trial = gThreshold_trial;
477 avg_peak_cal = gavg_peak_cal;
478 avg_evoked_peak_cal = gavg_evoked_peak_cal;
479 LR_avg_trial = gLR_avg_trial;
480 Cal_box = gCal_box;
481 show_contour = gshow_contour;
482 diff_trial = gdiff_trial;
483 movie_on = gmovie_on;
484 thr_t_test = gthr_p_val;
485 section_val = gsection_val;
486 design_peak = gdesign_peak;
487 ROI_peak = gROI_peak;
488 ROI_detection = gROI;
489 nonCF = gnonCF;
490 CF_low = gCF_low;
491
492
493 folder_name = 'previous_data.mat';
494 if exist(folder_name) > 0
495     prev_data = importdata('previous_data.mat');
496     data_cell = prev_data;
497 else
498     prev_data = cell(4, 6);
499     data_cell = cell(4, 6);
500 end
501
502 cd (All_read_images)
503
504
505 if Gauss_avg_trial > 0
506     prompt = ['Box pixel (odd number):', 'Gaussian sigma value:',
507 'Averaging pixels (odd number):', 'Min calculate range from:',
508 'Min calculate range to:'];
509     dlg_title = 'Input data';
510     if isnan(str2double([prev_data{1, 1}])) == 0
511         default_data(1, 1) = {char(prev_data{1, 1})};
512         default_data(1, 2) = {char(prev_data{1, 2})};
513         default_data(1, 3) = {char(prev_data{1, 3})};
514         default_data(1, 4) = {char(prev_data{1, 4})};
515         default_data(1, 5) = {char(prev_data{1, 5})};
516         answer = inputdlg(prompt, dlg_title, [1 20; 1 20; 1 20;
517 1 30; 1 30], default_data(1, 1:5));
518     else
519         answer = inputdlg(prompt, dlg_title, [1 20; 1 20; 1 20;
520 1 30; 1 30]);
521     end
522     cal_box_pix = str2double(answer{1});
523     sigma = str2double(answer{2});
524     phys_avg_size = str2double(answer{3});
525     first_min_cal_num = str2double(answer{4});
526     last_min_cal_num = str2double(answer{5});
527     text_cal_box_size = ['box size = ', num2str(cal_box_pix),
528 ' x ', num2str(cal_box_pix)];
529     data_cell(1, 1:5) = answer;
530 elseif LR_avg_trial > 0
531     prompt = ['Box pixel (odd number):', 'Gaussian sigma value:',
532 'Repeat number:', 'Averaging pixels (odd number):', 'Min
533 calculate range from:', 'Min calculate range to:'];
534     dlg_title = 'Input data';
535     if isnan(str2double([prev_data{1, 1}])) == 0
536         default_data(1, 1) = {char(prev_data{1, 1})};
537         default_data(1, 2) = {char(prev_data{1, 2})};
538         default_data(1, 3) = {char(prev_data{1, 3})};
539         default_data(1, 4) = {char(prev_data{1, 4})};
540         default_data(1, 5) = {char(prev_data{1, 5})};
541         default_data(1, 6) = {char(prev_data{1, 6})};
542         answer = inputdlg(prompt, dlg_title, [1 20; 1 20; 1 20;
543 1 20; 1 30; 1 30], default_data(1, 1:6));
544     else
545         answer = inputdlg(prompt, dlg_title, [1 20; 1 20; 1 20;
546 1 20; 1 30; 1 30]);
547     end
548     cal_box_pix = str2double(answer{1});
549     sigma = str2double(answer{2});
550     phys_avg_size = str2double(answer{4});
551     first_min_cal_num = str2double(answer{5});
552     last_min_cal_num = str2double(answer{6});
553     text_cal_box_size = ['box size = ', num2str(cal_box_pix),
554 ' x ', num2str(cal_box_pix)];
555     data_cell(1, 1:6) = answer;
556
557     hsize = cal_box_pix;
558     LR_sigma = sigma;
559     repeat_num = str2double(answer{3});
560 elseif Cal_box > 0
561     prompt = ['Box pixel (odd number):', 'Averaging pixels (odd
562 number):', 'Min calculate range from:', 'Min calculate range
563 to:'];
564     dlg_title = 'Input data';
565     if isnan(str2double([prev_data{1, 1}])) == 0
566         default_data(1, 1) = {char(prev_data{1, 1})};
567         default_data(1, 2) = {char(prev_data{1, 2})};
568         default_data(1, 3) = {char(prev_data{1, 3})};
569         default_data(1, 4) = {char(prev_data{1, 4})};
570         answer = inputdlg(prompt, dlg_title, [1 20; 1 20; 1 30;
571 1 30], default_data(1, 1:4));
572     else
573         answer = inputdlg(prompt, dlg_title, [1 20; 1 20; 1 30;
574 1 30]);
575     end
576     cal_box_pix = str2double(answer{1});
577     phys_avg_size = str2double(answer{2});
578     first_min_cal_num = str2double(answer{3});
579     last_min_cal_num = str2double(answer{4});
580     text_cal_box_size = ['box size = ', num2str(cal_box_pix),
581 ' x ', num2str(cal_box_pix)];
582     data_cell(1, 1:4) = answer;
583 end
584
585 if Threshold_trial > 0
586     if std_cal > 0
587         prompt = ['STD value:'];
588         dlg_title = 'Input data';
589         if isnan(str2double([prev_data{4, 1}])) == 0
590             default_data(4, 1) = {char(prev_data{4, 1})};
591             answer = inputdlg(prompt, dlg_title, [1 20],
592 default_data(4, 1));
593         else
594             answer = inputdlg(prompt, dlg_title, [1 20]);
595         end
596         std_sigma = str2double(answer{1});
597         data_cell(4, 1) = answer;
598     elseif thr_t_test > 0
599         prompt = ['p value:'];
600         dlg_title = 'Input data';
601         if isnan(str2double([prev_data{4, 1}])) == 0
602             default_data(4, 1) = {char(prev_data{4, 1})};
603             answer = inputdlg(prompt, dlg_title, [1 20],
604 default_data(4, 1));
605         else
606             answer = inputdlg(prompt, dlg_title, [1 20]);
607         end
608         p_val = str2double(answer{1});
609         data_cell(4, 1) = answer;
610     else
611         prompt = ['Baseline peak data:', 'Threshold value
612 (%)'];
613         dlg_title = 'Input data';
614         if isnan(str2double([prev_data{4, 1}])) == 0
615             default_data(4, 1) = {char(prev_data{4, 1})};
616             default_data(4, 2) = {char(prev_data{4, 2})};
617             answer = inputdlg(prompt, dlg_title, [1 20; 1 20],
618 default_data(4, 1:2));
619         else
620             answer = inputdlg(prompt, dlg_title, [1 20; 1 20]);
621         end
622         thr_peak_val = str2double(answer{1});
623         thr_val_1 = str2double(answer{2});
624         data_cell(4, 1:2) = answer;

```

```

625     end
626 end
627
628 if (avg_evoked_peak_cal > 0) && (design_peak == 0)
629     prompt = ['Max calculate range from:', 'Max calculate range
630 to:'];
631     dlg_title = 'Input data';
632     if isnan(str2double([prev_data{2, 1}])) == 0
633         default_data(2, 1) = {char(prev_data{2, 1})};
634         default_data(2, 2) = {char(prev_data{2, 2})};
635         answer = inputdlg(prompt, dlg_title, [1 30; 1 30],
636 default_data(2, 1:2));
637     else
638         answer = inputdlg(prompt, dlg_title, [1 30; 1 30]);
639     end
640     first_max_cal_num = str2double(answer{1});
641     last_max_cal_num = str2double(answer{2});
642     data_cell(2, 1:2) = answer;
643 end
644
645 if diff_trial > 0
646     prompt = ['SDV sigma value:'];
647     dlg_title = 'Input data';
648     answer = inputdlg(prompt, dlg_title, [1 20]);
649     diff_std = str2double(answer{1});
650 end
651
652 if design_peak > 0
653     [file, path] = uigetfile('*.*', 'Select max axis file');
654     file_path = fullfile(path, file);
655     max_design_posi = load(file_path); %struct構造体になる
656 end
657
658 if ROI_peak > 0
659     prompt = ['ROI radius ( $\mu\text{m}$ ):'];
660     dlg_title = 'Input data';
661     if isnan(str2double([prev_data{3, 1}])) == 0
662         default_data(3, 1) = {char(prev_data{3, 1})};
663         answer = inputdlg(prompt, dlg_title, [1 30],
664 default_data(3, 1));
665     else
666         answer = inputdlg(prompt, dlg_title, [1 30]);
667     end
668     r_val_rad = str2double(answer{1});
669     r_val = (r_val_rad / 1000) * 145;
670     r_val = round(r_val);
671     data_cell(3, 1) = answer;
672 end
673
674 clear file_type
675 first_file = sprintf('%s_000.tif', All_read_images);
676 if exist(first_file, 'file')
677     file_type = 1;
678 else
679     first_file = sprintf('%s_1.tif', All_read_images);
680     file_type = 2;
681 end
682
683 A = imread(first_file);
684 [Ypix, Xpix] = size(A);
685
686 each_images = num_images / num_trials;
687
688 %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
689 %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
690 %ファイルの読み込み、各TrialでのBaseline値の計算、Baseline
691 subtractした値の計算を同時に行う
692
693 ALL_Image_Matrix_original = zeros(Xpix, Ypix, each_images,
694 num_trials);
695 ALL_Image_Matrix = zeros(Xpix, Ypix, each_images, num_trials);
696 Baseline_AVG = zeros(Xpix, Ypix, num_trials);
697
698 Analyzed_trial = 0;
699 for j = 1 : num_trials
700
701     first_image = 1 + (each_images * (j - 1));
702     last_image = each_images * j;
703     t = 1;

```

```

704
705     for k = first_image : last_image
706         if file_type == 1
707             if k < 11
708                 curr_file = sprintf('%s_00%d.tif',
709 All_read_images, k-1);
710             elseif (k > 10) && (k < 101)
711                 curr_file = sprintf('%s_0%d.tif',
712 All_read_images, k-1);
713             elseif k > 100
714                 curr_file = sprintf('%s_%d.tif',
715 All_read_images, k-1);
716             end
717         else
718             curr_file = sprintf('%s_%d.tif', All_read_images,
719 k);
720         end
721         XY_imgs = imread(curr_file);
722         XY_imgs = double(XY_imgs);
723         if (size(A) == size(XY_imgs))
724             else
725                 fprintf('ERROR: Data size mismatch\n');
726                 return;
727             end
728         ALL_Image_Matrix_original(:, :, t, j) = XY_imgs ;
729
730         if Gauss_avg_trial > 0
731             ALL_Image_Matrix(:, :, t, j) =
732 imgaussfilt(ALL_Image_Matrix_original(:, :, t, j), sigma,
733 'FilterSize', cal_box_pix, ...
734 'Padding', 'symmetric', 'FilterDomain', 'spatial');
735         elseif LR_avg_trial > 0
736
737             PSF = fspecial('gaussian', cal_box_pix, sigma);
738             Burred_Matrix =
739 imfilter(ALL_Image_Matrix_original(:, :, t, j), PSF,
740 'symmetric', 'conv');
741             ALL_Image_Matrix(:, :, t, j) =
742 deconvlucy(Burred_Matrix, PSF, repeat_num);
743
744         elseif Cal_box > 0
745             AVGF_1 = fspecial('average', cal_box_pix);
746             ALL_Image_Matrix(:, :, t, j) =
747 imfilter(ALL_Image_Matrix_original(:, :, t, j), AVGF_1,
748 'symmetric');
749         end
750
751         t = t + 1;
752     end
753     Analyzed_trial = Analyzed_trial + 1;
754 end
755
756 show_img = imread(curr_file);
757 rot_side = 0;
758
759 if mouse_side == 'L'
760     ALL_Image_Matrix = rot90(ALL_Image_Matrix, -2);
761     ALL_Image_Matrix_2 = rot90(ALL_Image_Matrix, -2);
762     rot_side = 1;
763 elseif mouse_side == 'R'
764     ALL_Image_Matrix = flip(ALL_Image_Matrix, 1);
765     ALL_Image_Matrix_2 = flip(ALL_Image_Matrix, 1);
766     rot_side = 2;
767 elseif mouse_side == 'o'
768     ALL_Image_Matrix = rot90(ALL_Image_Matrix, 2);
769     ALL_Image_Matrix_2 = rot90(ALL_Image_Matrix, 2);
770     rot_side = 3;
771 end
772
773 for i = 1 : num_trials
774     Baseline_AVG(:, :, i) = mean(ALL_Image_Matrix(:, :,
775 first_avg_num : last_avg_num, i), 3);
776 end
777 Baseline_raw_int = mean(mean(mean(Baseline_AVG)));
778 Baseline_raw_intensity = round(Baseline_raw_int)
779
780 for i = 1 : num_trials

```

```

783     for j = 1 : each_images
784         ALL_Image_Matrix(:, :, j, i) = (ALL_Image_Matrix(:, :,
785 j, i) - Baseline_AVG(:, :, i)) ./ Baseline_AVG(:, :, i);
786     end
787 end
788 %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
789 %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
790
791 %Averageの値の計算
792 avg_Image_Matrix = mean(ALL_Image_Matrix, 4);
793 avg_Image_Matrix_org = avg_Image_Matrix;
794 show_img_2 = mean(ALL_Image_Matrix_original, 4);
795
796 %box analysis
797 if (Cal_box > 0) || (Gauss_avg_trial > 0) || (LR_avg_trial > 0)
798
799     each_evoked_min_intensity = zeros(each_images, 1);
800     Avg_box_cal = avg_Image_Matrix;
801     Avg_box_cal_org = avg_Image_Matrix;
802
803     for k = 1 : each_images
804         AVGF_2 = fspecial('average', phys_avg_size);
805         Avg_box_cal(:, :, k) = imfilter(avg_Image_Matrix(:, :,
806 k), AVGF_2, 'symmetric');
807     end
808
809     %Min calculation
810     t_1 = first_min_cal_num;
811     t_2 = last_min_cal_num;
812     avg_min_intensity = zeros(t, 1);
813     min_evoked_position = zeros(t, 2);
814     for k = t_1 : t_2
815         avg_min_intensity(k) = min(min(Avg_box_cal(:, :, k)));
816         [min_evoked_position(1), min_evoked_position(2)] =
817 find(Avg_box_cal(:, :, k) == avg_min_intensity(k));
818     end
819
820     Yax_min = min_evoked_position(2);
821     Xax_min = min_evoked_position(1);
822
823     for k = 1 : each_images
824         each_evoked_min_intensity(k, 1) = Avg_box_cal(Xax_min,
825 Yax_min, k);
826         Avg_box_cal(:, :, k) = Avg_box_cal_org(:, :, k) -
827 each_evoked_min_intensity(k, 1);
828         Avg_box_cal(:, :, k) = imfilter(Avg_box_cal(:, :, k),
829 AVGF_2, 'symmetric');
830     end
831
832     if (Threshold_trial > 0) && (std_cal == 0) && (thr_t_test
833 == 0)
834
835         thr_val = thr_peak_val * (thr_val_1 / 100);
836
837     end
838 end
839
840 %画像の出力と出力条件
841 clim = [set_range1 set_range2];
842
843 num_figures = each_images / 10;
844
845 %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
846 %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
847 %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
848 %Average peakの計算
849 if (show_contour > 0) || (avg_peak_cal > 0)
850
851     exist Peak_analysis dir;
852     A = ans;
853     if A < 1
854         mkdir Peak_analysis
855     end
856     cd Peak_analysis
857
858     %Max calculation
859     avg_max_intensity = zeros(t, 1);
860     avg_each_max_intensity = zeros(each_images, 1);
861     max_position = zeros(each_images, 2);
862
863     max_min_intensity = zeros(each_images, 2);
864
865     for k = 1 : each_images
866         avg_max_intensity(k) = max(max(Avg_box_cal(:, :, k)));
867         [max_evoked_position(1), max_evoked_position(2)] =
868 find(Avg_box_cal(:, :, k) == avg_max_intensity(k));
869     end
870
871     max_min_intensity(:, 1) = avg_each_max_intensity;
872     max_intensity = max(avg_each_max_intensity);
873
874     csvwrite('avg_MAX_intensity.csv',
875 avg_each_max_intensity);
876     csvwrite('avg_MAX_axis.csv', max_position);
877
878     %Min calculation
879     avg_each_min_intensity = zeros(each_images, 1);
880     min_position = zeros(each_images, 2);
881
882     for k = 1 : each_images
883         avg_min_intensity(k) = min(min(Avg_box_cal(:, :, k)));
884         [min_evoked_position(1), min_evoked_position(2)] =
885 find(Avg_box_cal(:, :, k) == avg_min_intensity(k));
886     end
887
888     min_position_resize(:, 1) = min_position(:, 1);
889     min_position_resize(:, 2) = min_position(:, 2);
890
891     min_intensity = min(avg_each_min_intensity);
892
893     max_min_intensity(:, 2) = avg_each_min_intensity;
894     temp_int = min(min(max_min_intensity));
895
896     csvwrite('avg_MIN_intensity.csv',
897 avg_each_min_intensity);
898     csvwrite('avg_MIN_axis.csv', min_position);
899
900     Q10 = avg_each_max_intensity * 0.9;
901     Q30 = avg_each_max_intensity * 0.7;
902     Q50 = avg_each_max_intensity * 0.5;
903     Q80 = avg_each_max_intensity * 0.2;
904
905     if avg_peak_cal > 0
906         figure
907         plot(avg_each_max_intensity, 'r', 'Linewidth', 1)
908         hold on
909         plot(avg_each_min_intensity, 'b', 'Linewidth', 1)
910         plot([last_avg_num last_avg_num], [min_intensity
911 max_intensity], 'k', 'Linewidth', 1)
912         hold off
913         ylim([temp_int max_intensity])
914         legend('Max intensity', 'Min intensity', 'Location',
915 'southwest')
916         text(each_images - 20, max_intensity - (max_intensity
917 / 8), text_cal_box_size)
918         xticks(0:5:12*5)
919
920         xticklabels({'0', '0.75', '1.5', '2.25', '3.0', '3.75', '4.5', '5.2
921 5', '6.0', '6.75', '7.5', '8.25', '9.0'})
922         xlabel('Time (s)'), ylabel('Intensity (normalized to
923 baseline)')
924         figure_name = 'Avg_each_peak_intensity';
925         eval(['print -dtiff -r300 ./' figure_name '.tif']);
926     end
927
928     cd ..
929     close all
930 end
931 %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
932 %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
933 %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
934 %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
935 %Evoked peakの計算
936 if (avg_evoked_peak_cal > 0) && (ROI_detection == 0)
937
938     if Gauss_avg_trial > 0
939         exist Average_gauss dir;
940         A = ans;

```

```

941     if A < 1
942         mkdir Average_gauss
943     end
944     cd Average_gauss
945
946 elseif LR_avg_trial > 0
947     exist Average_LR dir;
948     A = ans;
949     if A < 1
950         mkdir Average_LR
951     end
952     cd Average_LR
953 else
954     exist Average_processing dir;
955     A = ans;
956     if A < 1
957         mkdir Average_processing
958     end
959     cd Average_processing
960 end
961
962 exist Peak_analysis dir;
963 A = ans;
964 if A < 1
965     mkdir Peak_analysis
966 end
967 cd Peak_analysis
968
969 if design_peak > 0
970     if nonCF > 0
971         exist Designated_peak_nonCF dir;
972         A = ans;
973         if A < 1
974             mkdir Designated_peak_nonCF
975         end
976         cd Designated_peak_nonCF
977     else
978         exist Designated_peak dir;
979         A = ans;
980         if A < 1
981             mkdir Designated_peak
982         end
983         cd Designated_peak
984     end
985 end
986
987 if ROI_peak > 0
988     pix_size = 'ROI_peak_%d';
989     ROI_name = sprintf(pix_size, r_val_rad);
990     exist(ROI_name, 'dir');
991     A = ans;
992     if A < 1
993         mkdir(ROI_name)
994     end
995     cd(ROI_name)
996 end
997 max_min_intensity = zeros(each_images, 2);
998
999 if design_peak > 0
1000     max_evoked_position = max_design_posi;
1001     Yax_max = max_evoked_position(2);
1002     Xax_max = max_evoked_position(1);
1003 else
1004     %Max calculation
1005     avg_evoked_max_intensity = zeros(last_max_cal_num -
1006 first_max_cal_num + 1, 1);
1007     max_evoked_position = zeros(2, 1);
1008     for k = first_max_cal_num : last_max_cal_num
1009         avg_evoked_max_intensity(k) =
1010 max(max(Avg_box_cal(:, :, k)));
1011         [max_evoked_position(1), max_evoked_position(2)]
1012 = find(Avg_box_cal(:, :, k) == avg_evoked_max_intensity(k));
1013     end
1014     Yax_max = max_evoked_position(2);
1015     Xax_max = max_evoked_position(1);
1016 end
1017
1018 each_evoked_max_intensity(:, 1) = Avg_box_cal(Xax_max :
1019 Xax_max, Yax_max : Yax_max, :);
1020
1021 max_min_intensity(:, 1) = each_evoked_max_intensity;
1022 max_evoked_intensity = max(each_evoked_max_intensity);
1023
1024 csvwrite('avg_evoked_MAX_intensity.csv',
1025 each_evoked_max_intensity);
1026 csvwrite('avg_evoked_MAX_axis.csv', max_evoked_position);
1027
1028 if design_peak > 0
1029     Yax_min = min_evoked_position(2);
1030     Xax_min = min_evoked_position(1);
1031 else
1032     %Min calculation
1033     avg_evoked_min_intensity = zeros(last_min_cal_num -
1034 first_min_cal_num + 1, 1);
1035     min_evoked_position = zeros(2, 1);
1036     for k = first_min_cal_num : last_min_cal_num
1037         avg_evoked_min_intensity(k) =
1038 min(min(Avg_box_cal(:, :, k)));
1039     [min_evoked_position(1), min_evoked_position(2)]
1040 = find(Avg_box_cal(:, :, k) == avg_evoked_min_intensity(k));
1041     end
1042     Yax_min = min_evoked_position(2);
1043     Xax_min = min_evoked_position(1);
1044 end
1045
1046 each_evoked_min_intensity(:, 1) = Avg_box_cal(Xax_min :
1047 Xax_min, Yax_min : Yax_min, :);
1048 max_min_intensity(:, 2) = each_evoked_min_intensity;
1049 min_evoked_intensity = min(each_evoked_min_intensity);
1050 temp_int = min(min(max_min_intensity));
1051
1052 csvwrite('avg_evoked_MIN_intensity.csv',
1053 each_evoked_min_intensity);
1054 csvwrite('avg_evoked_MIN_axis.csv', min_evoked_position);
1055
1056 figure
1057 plot(each_evoked_max_intensity, 'r', 'Linewidth', 1)
1058 hold on
1059 plot(each_evoked_min_intensity, 'b', 'Linewidth', 1)
1060 plot([last_avg_num last_avg_num], [min_evoked_intensity
1061 max_evoked_intensity], 'k', 'Linewidth', 1)
1062 hold off
1063 ylim([temp_int max_evoked_intensity])
1064 legend('Evoked Max intensity', 'Min intensity', 'Location',
1065 'west')
1066 text(each_images - 20, max_evoked_intensity -
1067 (max_evoked_intensity / 8), text_cal_box_size)
1068 xticks(0:5:12*5)
1069
1070 xticklabels(['0', '0.75', '1.5', '2.25', '3.0', '3.75', '4.5', '5.2
1071 5', '6.0', '6.75', '7.5', '8.25', '9.0'])
1072 xlabel('Time (s)'), ylabel('Intensity (normalized to
1073 baseline)')
1074 figure_name = 'Avg_evoked_peak_intensity';
1075 eval(['print -dtiff -r300 ./' figure_name '.tif']);
1076
1077 cd ..
1078 cd ..
1079 if (design_peak > 0) || (ROI_peak > 0)
1080     cd ..
1081 end
1082 close all
1083 end
1084
1085 %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
1086 %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
1087 %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
1088 %Average画像の出力
1089 if (Avg_trial > 0) && (Cal_box == 0) && (Gauss_avg_trial == 0)
1090 && (LR_avg_trial == 0)
1091
1092     k = 1;
1093
1094     exist Average dir;
1095     A = ans;
1096     if A < 1
1097         mkdir Average

```

```

1099     end
1100     cd Average
1101
1102     if (avg_evoked_peak_cal > 0) || (avg_peak_cal > 0)
1103         cd ..
1104         cd Peak_analysis
1105     end
1106
1107     while k <= each_images
1108
1109         for l = 1 : num_figures
1110             figure(l)
1111
1112             for m = 1 : 10
1113
1114                 if k > each_images
1115                     k = 1;
1116                 else
1117                     subplot_tight(2, 5, m, .01)
1118                     imagesc(avg_Image_Matrix(:, :, k), clim)
1119                     set(gca, 'XTick', [], 'YTick', [])
1120
1121                     if (Cal_box > 0) && (avg_evoked_peak_cal > 0)
1122                         plot([Yax_max Yax_max], [Xax_max Xax_max],
1123                             'o', ...
1124                             'MarkerEdgeColor', 'white',
1125                             'MarkerFaceColor', 'red', 'MarkerSize', 5);
1126                         plot([Yax_min Yax_min], [Xax_min Xax_min],
1127                             'o', ...
1128                             'MarkerEdgeColor', 'white',
1129                             'MarkerFaceColor', 'blue', 'MarkerSize', 5);
1130                     end
1131                     if (Cal_box > 0) && (avg_peak_cal > 0)
1132                         plot([max_position(k, 2) max_position(k,
1133 2)], [max_position(k, 1) max_position(k, 1)], 's', ...
1134                             'MarkerEdgeColor', 'white',
1135                             'MarkerFaceColor', 'red', 'MarkerSize', 5);
1136                         plot([min_position(k, 2) min_position(k,
1137 2)], [min_position(k, 1) min_position(k, 1)], 's', ...
1138                             'MarkerEdgeColor', 'white',
1139                             'MarkerFaceColor', 'blue', 'MarkerSize', 5);
1140                     end
1141
1142                     k = k + 1;
1143                 end
1144             end
1145
1146             c = colorbar('horiz');
1147             c.Ticks = [set_range1 0 set_range2];
1148             c.TickLabels = [set_range1, '0', set_range2];
1149             c.Position = [0.85 0.1 0.1 0.03];
1150             c.TickDirection = 'out';
1151
1152             if (avg_evoked_peak_cal > 0) || (avg_peak_cal > 0)
1153                 cd ..
1154                 cd Peak_analysis
1155                 if (avg_evoked_peak_cal > 0) && (avg_peak_cal == 0)
1156                     figure_name = ['AVG_evoked_peak_', num2str(l),
1157 '(', num2str(num_trials), '_trials)'];
1158                 elseif (avg_evoked_peak_cal == 0) && (avg_peak_cal
1159 > 0)
1160                     figure_name = ['AVG_each_peak_', num2str(l),
1161 '(', num2str(num_trials), '_trials)'];
1162                 elseif (avg_evoked_peak_cal > 0) && (avg_peak_cal
1163 > 0)
1164                     figure_name = ['AVG_each&evoked_peak_',
1165 num2str(l), '(', num2str(num_trials), '_trials)'];
1166                 else
1167                     figure_name = ['AVG_', num2str(l), '(',
1168 num2str(num_trials), '_trials)'];
1169                 end
1170
1171                 eval(['print -dtiff -r300 ./' figure_name '.tif']);
1172                 cd ..
1173             end
1174         end
1175     end
1176
1177     k = 1;

```

```

1178
1179     figure
1180     while k <= each_images
1181
1182         if k > each_images
1183             k = 1;
1184         else
1185             subplot_tight(6, 10, k, .01);
1186             imagesc(avg_Image_Matrix(:, :, k), clim)
1187             daspect([1 1 1])
1188             set(gca, 'XTick', [], 'YTick', [])
1189
1190             if (Cal_box > 0) && (avg_evoked_peak_cal > 0)
1191                 plot([Yax_max Yax_max], [Xax_max Xax_max], 'o', ...
1192                     'MarkerEdgeColor', 'white', 'MarkerFaceColor',
1193 'red', 'MarkerSize', 5);
1194                 plot([Yax_min Yax_min], [Xax_min Xax_min], 'o', ...
1195                     'MarkerEdgeColor', 'white', 'MarkerFaceColor',
1196 'blue', 'MarkerSize', 5);
1197             end
1198             if (Cal_box > 0) && (avg_peak_cal > 0)
1199                 plot([max_position(k, 2) max_position(k, 2)],
1200 [max_position(k, 1) max_position(k, 1)], 's', ...
1201                     'MarkerEdgeColor', 'white', 'MarkerFaceColor',
1202 'red', 'MarkerSize', 5);
1203                 plot([min_position(k, 2) min_position(k, 2)],
1204 [min_position(k, 1) min_position(k, 1)], 's', ...
1205                     'MarkerEdgeColor', 'white', 'MarkerFaceColor',
1206 'blue', 'MarkerSize', 5);
1207             end
1208
1209             colormap(jet), axis square
1210             title([' %fontsize[5] Image No ', num2str(k)])
1211             k = k + 1;
1212         end
1213     end
1214
1215     if (avg_evoked_peak_cal > 0) && (avg_peak_cal == 0)
1216         figure_name = ['All_AVG_evoked_peak_figures(',
1217 num2str(num_trials), '_trials)'];
1218     elseif (avg_evoked_peak_cal == 0) && (avg_peak_cal > 0)
1219         figure_name = ['All_AVG_each_peak_figures(',
1220 num2str(num_trials), '_trials)'];
1221     elseif (avg_evoked_peak_cal > 0) && (avg_peak_cal > 0)
1222         figure_name = ['All_AVG_each&evoked_peak_figures(',
1223 num2str(num_trials), '_trials)'];
1224     else
1225         figure_name = ['All_AVG_figures(', num2str(num_trials),
1226 '_trials)'];
1227     end
1228
1229     eval(['print -dtiff -r300 ./' figure_name '.tif']);
1230
1231     cd ..
1232     close all
1233 end
1234 %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
1235 %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
1236 %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
1237 %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
1238 %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
1239 %Average processing (box analysis)画像の出力
1240 if (Cal_box > 0) && (All_trial == 0) && (thr_t_test == 0) ||
1241 (Gauss_avg_trial > 0) || (LR_avg_trial > 0)
1242
1243     if Gauss_avg_trial > 0
1244         exist Average_gauss dir;
1245         A = ans;
1246         if A < 1
1247             mkdir Average_gauss
1248         end
1249         cd Average_gauss
1250
1251         text_box = {'Kernel =', cal_box_pix, 'x', cal_box_pix,
1252 ', Gaussian sigma =', sigma, ', Spatial average =',
1253 phys_avg_size, 'x', phys_avg_size};
1254         text_str = string(text_box); %Cell配列になっているの
1255         でstring配列に変更
1256         text_str = strjoin(text_str); %string配列にただで

```

```

1257 は、改行されるので、一行に変更
1258 elseif LR_avg_trial > 0
1259     exist Average_LR dir;
1260     A = ans;
1261     if A < 1
1262         mkdir Average_LR
1263     end
1264     cd Average_LR
1265
1266     text_box = {'Kernel = ', cal_box_pix, 'x', cal_box_pix,
1267 ', Gaussian sigma = ', sigma, ', Repeat = ', repeat_num, ',
1268 Spatial average = ', phys_avg_size, 'x', phys_avg_size];
1269     text_str = string(text_box);
1270     text_str = strjoin(text_str);
1271 elseif Cal_box > 0
1272     exist Average_processing dir;
1273     A = ans;
1274     if A < 1
1275         mkdir Average_processing
1276     end
1277     cd Average_processing
1278
1279     text_box = {'Kernel = ', cal_box_pix, 'x', cal_box_pix,
1280 ', Spatial average = ', phys_avg_size, 'x', phys_avg_size];
1281     text_str = string(text_box);
1282     text_str = strjoin(text_str);
1283 end
1284
1285 if (avg_evoked_peak_cal > 0) || (avg_peak_cal > 0)
1286     if (design_peak > 0) && (ROI_peak > 0)
1287         cd ..
1288     end
1289     exist Peak_analysis dir;
1290     A = ans;
1291     if A < 1
1292         mkdir Peak_analysis
1293     end
1294     cd Peak_analysis
1295 end
1296
1297 if design_peak > 0
1298     if nonCF > 0
1299         cd Designated_peak_nonCF
1300     else
1301         cd Designated_peak
1302     end
1303 end
1304
1305 if ROI_peak > 0
1306     cd (ROI_name)
1307 end
1308
1309 if diff_trial > 0
1310     exist Difference_images dir;
1311     A = ans;
1312     if A < 1
1313         mkdir Difference_images
1314     end
1315     cd Difference_images
1316
1317     for i = 1 : each_images
1318
1319         Avg_box_cal(:, :, i) = Avg_box_cal(:, :, i) -
1320 repmat(each_evoked_min_intensity(i, 1), [Xpix Ypix 1]);
1321
1322     end
1323
1324     diff_base_avg =
1325 mean(avg_evoked_peak_diff(first_avg_num : last_avg_num));
1326     diff_base_std =
1327 std(avg_evoked_peak_diff(first_avg_num : last_avg_num), 0) *
1328 diff_std;
1329     diff_base_std = diff_base_avg + diff_base_std;
1330
1331 end
1332
1333 if section_val > 0
1334
1335     image_num_1 = 'Image_';
1336
1337     [file, path] = uigetfile('*.csv', 'Select low frequency
1338 peak axis file');
1339     file_path=fullfile(path, file);
1340     peak_position_1 = load (file_path); %struct構造体にな
1341     る
1342
1343     [file, path] = uigetfile('*.csv', 'Select high frequency
1344 peak axis file');
1345     file_path=fullfile(path, file);
1346     peak_position_2 = load (file_path); %struct構造体にな
1347     る
1348
1349     X_posi(1, 1) = peak_position_1(1);
1350     X_posi(1, 2) = peak_position_2(1);
1351     Y_posi(1, 1) = peak_position_1(2);
1352     Y_posi(1, 2) = peak_position_2(2);
1353
1354     each_evoked_max_intensity(:, 1) = Avg_box_cal(X_posi :
1355 X_posi, Y_posi : Y_posi, :);
1356
1357     section_slope = (X_posi(1,2) - X_posi(1,1)) /
1358 (Y_posi(1,2) - Y_posi(1,1));
1359     intercept_val = X_posi(1,1) - (section_slope *
1360 Y_posi(1,1));
1361     x = (Ypix - intercept_val) / section_slope;
1362     y = section_slope * Xpix + intercept_val;
1363     y = round(y, 0);
1364
1365     if intercept_val >= 1 && intercept_val <= Ypix
1366         y_b = intercept_val;
1367         y_b = round(y_b, 0);
1368         intercept_axis_1 = [y_b 1];
1369     elseif intercept_val > Ypix
1370         x_b = (Ypix - intercept_val) / section_slope;
1371         x_b = round(x_b, 0);
1372         intercept_axis_1 = [Ypix x_b];
1373     else
1374         x_b = (1 - intercept_val) / section_slope;
1375         x_b = round(x_b, 0);
1376         intercept_axis_1 = [1 x_b];
1377     end
1378
1379     if y >= 1 && y <= Ypix
1380         intercept_axis_2 = [y Xpix];
1381     elseif y > Ypix
1382         x_b = (Ypix - intercept_val) / section_slope;
1383         x_b = round(x_b, 0);
1384         intercept_axis_2 = [Ypix x_b];
1385     else
1386         x_b = (1 - intercept_val) / section_slope;
1387         x_b = round(x_b, 0);
1388         intercept_axis_2 = [1 x_b];
1389     end
1390
1391     X_long_posi(1, 1) = intercept_axis_1(2);
1392     X_long_posi(1, 2) = intercept_axis_2(2);
1393     Y_long_posi(1, 1) = intercept_axis_1(1);
1394     Y_long_posi(1, 2) = intercept_axis_2(1);
1395
1396     exist Section_calculation dir;
1397     A = ans;
1398     if A < 1
1399         mkdir Section_calculation
1400     end
1401     cd Section_calculation
1402
1403 end
1404
1405 if show_contour > 0
1406     Avg_box_cal_sum_pix = zeros(each_images, 4);
1407     Avg_box_cal_ratio = zeros(each_images, 4);
1408     Avg_box_cal_sum = zeros(each_images, 4);
1409 end
1410
1411 if ROI_peak > 0
1412     centers = [Yax_max Xax_max];
1413     radii = r_val;
1414     h = viscircles(centers, radii);
1415     [X, Y] = meshgrid(1: Xpix);

```

```

1415     ax = get(h,'Children');
1416     xd = get(ax(1),'XData');
1417     yd = get(ax(1),'YData');
1418     [in, ~] = inpolygon(X,Y,yd,xd);
1419     in = flip(in);
1420     in = flip(in, 2);
1421
1422     if rot_side == 1
1423         in = rot90(in, -2);
1424     elseif rot_side == 2
1425         in = flip(in, 1);
1426     elseif rot_side == 3
1427         in = rot90(in, 2);
1428     end
1429
1430     cir_pix = sum(sum(in, 2), 1);
1431     cir_ax = zeros(cir_pix, 2);
1432     cir_int = zeros(cir_pix, each_images);
1433     Sum_cir_int = zeros(each_images, 1);
1434     cir_cent_int = zeros(each_images, 1);
1435
1436     n = 1;
1437     for x_a = 1 : Xpix
1438         for y_a = 1 : Ypix
1439             if in(x_a, y_a) > 0
1440                 cir_ax(n, 1) = x_a;
1441                 cir_ax(n, 2) = y_a;
1442                 n = n + 1;
1443             end
1444         end
1445     end
1446
1447     for k = 1 : each_images
1448         for n = 1 : cir_pix
1449             cir_int(n, k) = Avg_box_cal(cir_ax(n, 2),
1450 cir_ax(n, 1), k);
1451         end
1452
1453         Sum_cir_int(k, 1) = sum(cir_int(:, k), 1);
1454         cir_cent_int(k, 1) = Avg_box_cal(Yax_max, Xax_max,
1455 k);
1456     end
1457
1458     max_cir_int = max(Sum_cir_int);
1459     min_cir_int = min(Sum_cir_int);
1460
1461 end
1462 close all
1463
1464 if ROI_detection > 0
1465     r_x = 0;
1466     r_y = 0;
1467     r_radii = 0;
1468     r_centers = [r_x r_y];
1469     r_roi_num = 1;
1470
1471     k = 1;
1472     r_num = 1;
1473     r_i = 1;
1474
1475     r_f = figure;
1476     r_pos1 = [0.13 0.2 0.77 0.54];
1477     r_pos2 = [0.42 0.75 0.18 0.18];
1478     r_pos3 = [0.6 0.75 0.18 0.18];
1479     r_pos4 = [0.78 0.75 0.18 0.18];
1480     r_pos5 = [0.24 0.75 0.18 0.18];
1481     r_pos6 = [0.06 0.75 0.18 0.18];
1482
1483     subplot('Position', r_pos1);
1484     imagesc(Avg_box_cal(:, :, k), clim);
1485     xticks([])
1486     yticks([])
1487     xlim([0 Xpix])
1488     ylim([0 Ypix])
1489     colormap(jet), axis square
1490     cb = colorbar('eastoutside');
1491     set(cb,'position',[0.75 0.2 0.04 0.2])
1492
1493     subplot('Position', r_pos2);
1494     imagesc(Avg_box_cal(:, :, k), clim);
1495     xticks([])
1496     yticks([])
1497     xlim([0 Xpix])
1498     ylim([0 Ypix])
1499     axis square
1500
1501     subplot('Position', r_pos3);
1502     imagesc(Avg_box_cal(:, :, k+1), clim);
1503     xticks([])
1504     yticks([])
1505     xlim([0 Xpix])
1506     ylim([0 Ypix])
1507     axis square
1508
1509     subplot('Position', r_pos4);
1510     imagesc(Avg_box_cal(:, :, k+2), clim);
1511     xticks([])
1512     yticks([])
1513     xlim([0 Xpix])
1514     ylim([0 Ypix])
1515     axis square
1516
1517     b =
1518     uicontrol('Parent',r_f,'Style','slider','Position',[81,40,41
1519 9,23],...
1520             'value',k,'min',1,'max',60,...
1521             'SliderStep',[0.0167 0.083],...
1522             'Callback',@callbackfn);
1523
1524     bgcolor = r_f.Color;
1525     b11 =
1526     uicontrol('Parent',r_f,'Style','text','Position',[50,40,23,2
1527 3],...
1528             'String','1','BackgroundColor',bgcolor);
1529     b12 =
1530     uicontrol('Parent',r_f,'Style','text','Position',[500,40,23,
1531 23],...
1532             'String','60','BackgroundColor',bgcolor);
1533     b13 =
1534     uicontrol('Parent',r_f,'Style','text','Position',[240,15,40,
1535 23],...
1536             'String','Image#
1537             ','BackgroundColor',bgcolor,'FontWeight','bold');
1538     b14 = uicontrol('Parent',r_f,'Style','text',
1539 'Position',[280,15,23,23],...
1540                 'BackgroundColor',bgcolor,'string',
1541 num2str(k),'FontWeight','bold');
1542
1543     Im_num_tx_1 =
1544     uicontrol('Parent',r_f,'Style','text','Position',[264,394,35
1545 ,15],...
1546             'String','Image#
1547             ','BackgroundColor',bgcolor);
1548     Im_num_1 = uicontrol('Parent',r_f,'Style','text',
1549 'Position',[299,394,15,15],...
1550                 'BackgroundColor',bgcolor,'string',
1551 num2str(k));
1552     Im_num_tx_2 =
1553     uicontrol('Parent',r_f,'Style','text','Position',[368,394,35
1554 ,15],...
1555             'String','Image#
1556             ','BackgroundColor',bgcolor,'Visible','on');
1557     Im_num_2 = uicontrol('Parent',r_f,'Style','text',
1558 'Position',[402,394,15,15],...
1559                 'BackgroundColor',bgcolor,
1560 'string', num2str(k+1),'Visible','on');
1561     Im_num_tx_3 =
1562     uicontrol('Parent',r_f,'Style','text','Position',[469,394,35
1563 ,15],...
1564             'String','Image#
1565             ','BackgroundColor',bgcolor,'Visible','on');
1566     Im_num_3 = uicontrol('Parent',r_f,'Style','text',
1567 'Position',[504,394,15,15],...
1568                 'BackgroundColor',bgcolor,'string',
1569 num2str(k+2),'Visible','on');

```

```

1573         Im_num_tx_4 =
1574 uicontrol('Parent',r_f,'Style','text','Position',[163,394,35
1575 ,15],...
1576             'String','Image#
1577 ','BackgroundColor',bgcolor,'Visible','off');
1578         Im_num_4 = uicontrol('Parent',r_f,'Style','text',
1579 'Position',[198,394,15,15],...
1580 'BackgroundColor',bgcolor,
1581 'string',num2str(k-1),'Visible','off');
1582         Im_num_tx_5 =
1583 uicontrol('Parent',r_f,'Style','text','Position',[63,394,35,
1584 15],...
1585             'String','Image#
1586 ','BackgroundColor',bgcolor,'Visible','off');
1587         Im_num_5 = uicontrol('Parent',r_f,'Style','text',
1588 'Position',[98,394,15,15],...
1589 'BackgroundColor',bgcolor,
1590 'string',num2str(k-2),'Visible','off');
1591
1592
1593         back_1 =
1594 uicontrol('Parent',r_f,'Style','text','Position',[350,315,10
1595 0,300],...
1596             'String','
1597 ','BackgroundColor',bgcolor,'Visible','off');
1598         back_2 =
1599 uicontrol('Parent',r_f,'Style','text','Position',[450,315,10
1600 0,150],...
1601             'String','
1602 ','BackgroundColor',bgcolor,'Visible','off');
1603         back_3 =
1604 uicontrol('Parent',r_f,'Style','text','Position',[130,315,10
1605 0,150],...
1606             'String','
1607 ','BackgroundColor',bgcolor,'Visible','off');
1608         back_4 =
1609 uicontrol('Parent',r_f,'Style','text','Position',[40,315,100
1610 ,150],...
1611             'String','
1612 ','BackgroundColor',bgcolor,'Visible','off');
1613
1614
1615         uipanel('Title','ROI property','FontSize',12,...
1616             'BackgroundColor',bgcolor,...
1617             'Position',[.05 .25 .23 .45]);
1618         x_ax_tx =
1619 uicontrol('Parent',r_f,'Style','text','Position',[45,245,40,
1620 30],...
1621             'string','Center X
1622 axis','BackgroundColor',bgcolor);
1623         y_ax_tx =
1624 uicontrol('Parent',r_f,'Style','text','Position',[45,195,40,
1625 30],...
1626             'string','Center Y
1627 axis','BackgroundColor',bgcolor);
1628         x_ax =
1629 uicontrol('Parent',r_f,'Style','text','Position',[65,225,40,
1630 20],...
1631             'string',num2str(k-1),'BackgroundColor','white',...
1632             'FontSize',12,'FontWeight','bold');
1633         y_ax =
1634 uicontrol('Parent',r_f,'Style','text','Position',[65,175,40,
1635 20],...
1636             'string',num2str(k-1),'BackgroundColor','white',...
1637             'FontSize',12,'FontWeight','bold');
1638         rsize_tx =
1639 uicontrol('Parent',r_f,'Style','text','Position',[40,145,80,
1640 20],...
1641             'string','ROI size
1642 (μm)','BackgroundColor',bgcolor);
1643         rsize_val =
1644 uicontrol('Parent',r_f,'Style','popupmenu','Position',[60,12
1645 0,50,25],...
1646             'string',{'25',
1647 '50','75','100','125','150','200','250','300','350','400','4
1648 50','500'},...
1649

```

```

1652 'FontWeight','bold','FontSize',11,'Callback',@selection);
1653         r_num =
1654 uicontrol('Parent',r_f,'Style','popupmenu','Position',[120,1
1655 20,30,25],...
1656             'string',{'1','2','3'},...
1657 'FontWeight','bold','FontSize',11,'Callback',@roi_number);
1658
1659         bt =
1660 uicontrol('Parent',r_f,'Style','pushbutton','Position',[440,
1661 220,60,30],...
1662             'string','Output','FontWeight','bold','Callback',
1663 @close_figure);
1664
1665         dcm = datacursormode(r_f);
1666         dcm.Enable = 'on';
1667         dcm.UpdateFcn = @displayCoordinates;
1668
1669         radii_0 = 0;
1670         centers_0 = [1 1];
1671
1672         viscircles(centers_0, radii_0, 'Color', 'k',
1673 'LineWidth', 0.5, 'LineStyle', ':',...
1674 'EnhanceVisibility', false);
1675
1676     end
1677
1678     waitfor(r_f);
1679
1680     if ROI_detection > 0
1681
1682         r_tex = round(r_tex);
1683         pix_size = 'ROI_local_detect_%d';
1684         ROI_name = sprintf(pix_size, r_tex);
1685         exist(ROI_name, 'dir');
1686         A = ans;
1687         if A < 1
1688             mkdir(ROI_name)
1689         end
1690         cd(ROI_name)
1691
1692         h = viscircles(r_centers, r_radii);
1693
1694         [X, Y] = meshgrid(1: Xpix);
1695         ax = get(h, 'Children');
1696         xd = get(ax(1), 'XData');
1697         yd = get(ax(1), 'YData');
1698         [in, ~] = inpolygon(X, Y, yd, xd);
1699         in = flip(in);
1700         in = flip(in, 2);
1701
1702         if rot_side == 1
1703             in = rot90(in, -2);
1704         elseif rot_side == 2
1705             in = flip(in, 1);
1706         elseif rot_side == 3
1707             in = rot90(in, 2);
1708         end
1709
1710         close all
1711
1712         cir_pix = sum(sum(in, 2), 1);
1713         cir_ax = zeros(cir_pix, 2);
1714         cir_int = zeros(cir_pix, each_images);
1715         Sum_cir_int = zeros(each_images, 1);
1716         cir_peak_int = zeros(each_images, 1);
1717         local_max_detec = zeros(last_max_cal_num -
1718 first_max_cal_num + 1, 3);
1719
1720         n = 1;
1721         for x_a = 1 : Xpix
1722             for y_a = 1 : Ypix
1723                 if in(x_a, y_a) > 0
1724                     cir_ax(n, 1) = x_a;
1725                     cir_ax(n, 2) = y_a;
1726                     n = n + 1;
1727                 end
1728             end
1729         end
1730     end

```

```

1731     p = 1;
1732     for k = 1 : each_images
1733         for n = 1 : cir_pix
1734             cir_int(n, k) = Avg_box_cal(cir_ax(n, 2),
1735 cir_ax(n, 1), k);
1736         end
1737     end
1738     if (k >= first_max_cal_num) && (k <=
1739 last_max_cal_num)
1740         [n, ~] = find(cir_int(:, k) == max(cir_int(:,
1741 k)));
1742         local_max_detec(p, 1) = cir_int(n, k);
1743         local_max_detec(p, 2) = cir_ax(n, 2);
1744         local_max_detec(p, 3) = cir_ax(n, 1);
1745         p = p + 1;
1746     end
1747     Sum_cir_int(k, 1) = sum(cir_int(:, k), 1);
1748 end
1749 [~, local_max_posi] = max(local_max_detec(:, 1));
1750 Xax_max = local_max_detec(local_max_posi, 2);
1751 Yax_max = local_max_detec(local_max_posi, 3);
1752 for k = 1 : each_images
1753     cir_peak_int(k, 1) = Avg_box_cal(Yax_max, Xax_max,
1754 k);
1755 end
1756 max_cir_int = max(Sum_cir_int);
1757 min_cir_int = min(Sum_cir_int);
1758 max_peak_int = max(cir_peak_int);
1759 min_peak_int = min(cir_peak_int);
1760
1761 %Min calculation
1762 avg_evoked_min_intensity = zeros(last_min_cal_num -
1763 first_min_cal_num + 1, 1);
1764 min_evoked_position = zeros(2, 1);
1765 for k = first_min_cal_num : last_min_cal_num
1766     [avg_evoked_min_intensity(k), J] =
1767 min(reshape(Avg_box_cal(1 : Xpix-cal_box_pix+1, 1 :
1768 Ypix-cal_box_pix+1, k),
1769 [(Xpix-cal_box_pix+1)*(Ypix-cal_box_pix+1), 1]));
1770     [min_evoked_position(1), min_evoked_position(2)]
1771 = ind2sub(size(Avg_box_cal(1 : Xpix-cal_box_pix+1, 1 :
1772 Ypix-cal_box_pix+1, k)), J);
1773 end
1774 Yax_min = min_evoked_position(2);
1775 Xax_min = min_evoked_position(1);
1776 end
1777 k = 1;
1778 while k <= each_images
1779     for l = 1 : num_figures
1780         figure(l)
1781         for m = 1 : 10
1782             if k > each_images
1783                 k = 1;
1784             else
1785                 subplot_tight(2, 5, m, .01)
1786                 imagesc(Avg_box_cal(:, :, k), clim)
1787                 xticks([])
1788                 yticks([])
1789                 Avg_box_cal_k = Avg_box_cal(:, :, k);
1790                 xlim manual
1791                 ylim manual
1792                 xlim([0 Xpix])
1793                 ylim([0 Ypix])
1794                 if show_contour > 0
1795                     cRange = caxis;
1796                     Q10_bor = [Q10(k), Q10(k)];
1797                     Q30_bor = [Q30(k), Q30(k)];
1798                     Q50_bor = [Q50(k), Q50(k)];
1799                     Q80_bor = [Q80(k), Q80(k)];
1800                 end
1801                 if section_val > 0
1802                     if k == 1
1803                         pix_sec_num =
1804 improfile(Avg_box_cal_k, X_long_posi, Y_long_posi);
1805                         pix_sec_num_2 =
1806 numel(pix_sec_num);
1807                         pix_sec_num_3 =
1808 numel(pix_sec_num);
1809                         pix_sec_val = cell(each_images,
1810 pix_sec_num_2 + 1);
1811                         pix_sec_val_2 = zeros(each_images,
1812 image_num_2 = num2str(k);
1813 image_name = [image_num_1,
1814 pix_sec_val(k+4, 1) =
1815 cellstr(image_name);
1816                         pix_sec_val(k+4, 2 : pix_sec_num_2
1817 + 1) = num2cell(improfile(Avg_box_cal_k, X_long_posi,
1818 Y_long_posi));
1819                         pix_sec_val_2(k+4, :) =
1820 improfile(Avg_box_cal_k, X_long_posi, Y_long_posi);
1821                     if Y_posi(1, 1) > Y_posi(1, 2)
1822                         X_low = [X_long_posi(1, 2)
1823 Y_posi(1, 1)];
1824                         Y_low = [Y_long_posi(1, 2)
1825 X_posi(1, 1)];
1826                         X_high = [X_long_posi(1, 1)
1827 Y_posi(1, 2)];
1828                         Y_high = [Y_long_posi(1, 1)
1829 X_posi(1, 2)];
1830                     else
1831                         X_low = [X_long_posi(1, 2)
1832 Y_posi(1, 2)];
1833                         Y_low = [Y_long_posi(1, 2)
1834 X_posi(1, 2)];
1835                         X_high = [X_long_posi(1, 1)
1836 Y_posi(1, 1)];
1837                         Y_high = [Y_long_posi(1, 1)
1838 X_posi(1, 1)];
1839                     end
1840                     pix_sec_high_num =
1841 improfile(Avg_box_cal_k, X_high, Y_high);
1842                     pix_sec_high_num_2 =
1843 numel(pix_sec_high_num);
1844                     high_posi = pix_sec_high_num_2;
1845                     pix_sec_low_num =
1846 improfile(Avg_box_cal_k, X_low, Y_low);
1847                     pix_sec_low_num_2 =
1848 numel(pix_sec_low_num);
1849                     low_posi = pix_sec_low_num_2 -
1850 pix_sec_low_num_2;
1851                     max_each_evoked_max_intensity_temp =
1852 max(each_evoked_max_intensity(25 : 42, 1)) * 1.5;
1853                     min_each_evoked_min_intensity_temp =
1854 min(each_evoked_min_intensity(25 : 42, 1)) * 1.5;
1855                     if CF_low > 0
1856                         pix_sec_first = 0 - low_posi;
1857                         pix_sec_num_2 = pix_sec_num_2
1858 - low_posi;
1859                         high_posi = high_posi -
1860 low_posi;
1861                         low_posi = 0;
1862                     else
1863                         pix_sec_first = 0 - high_posi;
1864                         pix_sec_num_2 = pix_sec_num_2
1865 - high_posi;

```

```

1889         low_posi = low_posi -
1890 high_posi;
1891         high_posi = 0;
1892     end
1893
1894     x_ax_sec = pix_sec_first :
1895 pix_sec_num_2 - 1;
1896     posi_name = 'Psition (pixel)';
1897     pix_sec_val(4, 1) =
1898 cellstr(posi_name);
1899     pix_sec_val(4, 2 : pix_sec_num_3 +
1900 1) = num2cell(x_ax_sec);
1901
1902     posi_name_1 = 'High frequency
1903 position';
1904     posi_name_2 = 'Low frequency
1905 position';
1906     pix_sec_val(1, 1) =
1907 cellstr(posi_name_1);
1908     pix_sec_val(1, 2) =
1909 num2cell(high_posi);
1910     pix_sec_val(2, 1) =
1911 cellstr(posi_name_2);
1912     pix_sec_val(2, 2) =
1913 num2cell(low_posi);
1914
1915     else
1916         image_num_2 = num2str(k);
1917         image_name = [image_num_1,
1918 image_num_2];
1919         pix_sec_val(k+4, 1) =
1920 cellstr(image_name);
1921         pix_sec_val(k+4, 2 : pix_sec_num_3
1922 + 1) = num2cell(improfile(Avg_box_cal_k, X_long_posi,
1923 Y_long_posi));
1924         pix_sec_val_2(k+4, :) =
1925 improfile(Avg_box_cal_k, X_long_posi, Y_long_posi);
1926     end
1927
1928     end
1929
1930     hold on
1931
1932     if section_val > 0
1933         plot([Y_posi(1,2) Y_posi(1,2)],
1934 [X_posi(1,2) X_posi(1,2)], 'o',...
1935 'MarkerEdgeColor','white',
1936 'MarkerFaceColor','red', 'MarkerSize',5);
1937         plot([Y_posi(1,1) Y_posi(1,1)],
1938 [X_posi(1,1) X_posi(1,1)], 'o',...
1939 'MarkerEdgeColor','white',
1940 'MarkerFaceColor','blue', 'MarkerSize',5);
1941
1942         plot(X_long_posi, Y_long_posi, 'k:');
1943     end
1944
1945     if show_contour > 0
1946         contour(Avg_box_cal_k, Q10_bor,
1947 'LineColor','r')
1948         contour(Avg_box_cal_k, Q30_bor,
1949 'LineColor','y')
1950         contour(Avg_box_cal_k, Q50_bor,
1951 'LineColor','g')
1952         contour(Avg_box_cal_k, Q80_bor,
1953 'LineColor','c')
1954         caxis(cRange);
1955     end
1956
1957     if ROI_peak > 0
1958
1959         centers = [Yax_max Xax_max];
1960         radii = r_val;
1961         viscircles(centers, radii, 'Color',
1962 'k', 'LineWidth', 0.5, 'LineStyle', ':',...
1963 'EnhanceVisibility',
1964 false);
1965
1966     end
1967
1968     if ROI_detection > 0
1969         viscircles(r_centers, r_radii,
1970 'Color', 'k', 'LineWidth', 0.5, 'LineStyle', ':',...
1971 'EnhanceVisibility',
1972 false);
1973     end
1974
1975     if (avg_evoked_peak_cal > 0) &&
1976 (section_val == 0)
1977         plot([Yax_max Yax_max], [Xax_max
1978 Xax_max], 'o',...
1979 'MarkerEdgeColor','white',
1980 'MarkerFaceColor','red', 'MarkerSize',5);
1981         plot([Yax_min Yax_min], [Xax_min
1982 Xax_min], 'o',...
1983 'MarkerEdgeColor','white',
1984 'MarkerFaceColor','blue', 'MarkerSize',5);
1985     end
1986     if (avg_peak_cal > 0) && (section_val == 0)
1987         plot([max_position(k, 2)
1988 max_position(k, 2)], [max_position(k, 1) max_position(k, 1)],
1989 's',...
1990 'MarkerEdgeColor','white',
1991 'MarkerFaceColor','red', 'MarkerSize',5);
1992         plot([min_position(k, 2)
1993 min_position(k, 2)], [min_position(k, 1) min_position(k, 1)],
1994 's',...
1995 'MarkerEdgeColor','white',
1996 'MarkerFaceColor','blue', 'MarkerSize',5);
1997     end
1998
1999     hold off
2000
2001     colormap(jet), axis square
2002
2003     title([' Image No ', num2str(k)])
2004
2005     if show_contour > 0
2006         %Threshold以上の値を1とする計算
2007         Avg_box_cal_sum_pix(k, 1) =
2008 sum(sum(imbinarize(Avg_box_cal_k, Q10(k))));
2009         Avg_box_cal_sum_pix(k, 2) =
2010 sum(sum(imbinarize(Avg_box_cal_k, Q30(k))));
2011         Avg_box_cal_sum_pix(k, 3) =
2012 sum(sum(imbinarize(Avg_box_cal_k, Q50(k))));
2013         Avg_box_cal_sum_pix(k, 4) =
2014 sum(sum(imbinarize(Avg_box_cal_k, Q80(k))));
2015
2016         %Threshold以上の値を抽出し加算する
2017         Q10_thr = Avg_box_cal_k >= Q10(k);
2018         Q30_thr = Avg_box_cal_k >= Q30(k);
2019         Q50_thr = Avg_box_cal_k >= Q50(k);
2020         Q80_thr = Avg_box_cal_k >= Q80(k);
2021         Avg_box_cal_sum(k, 1) =
2022 sum(Avg_box_cal_k(Q10_thr));
2023         Avg_box_cal_sum(k, 2) =
2024 sum(Avg_box_cal_k(Q30_thr));
2025         Avg_box_cal_sum(k, 3) =
2026 sum(Avg_box_cal_k(Q50_thr));
2027         Avg_box_cal_sum(k, 4) =
2028 sum(Avg_box_cal_k(Q80_thr));
2029
2030         %Threshold以上の値を抽出し、areaを割る
2031         Avg_box_cal_ratio(k, 1) =
2032 Avg_box_cal_sum(k, 1) ./ Avg_box_cal_sum_pix(k, 1);
2033         Avg_box_cal_ratio(k, 2) =
2034 Avg_box_cal_sum(k, 2) ./ Avg_box_cal_sum_pix(k, 2);
2035         Avg_box_cal_ratio(k, 3) =
2036 Avg_box_cal_sum(k, 3) ./ Avg_box_cal_sum_pix(k, 3);
2037         Avg_box_cal_ratio(k, 4) =
2038 Avg_box_cal_sum(k, 4) ./ Avg_box_cal_sum_pix(k, 4);
2039     end
2040
2041     k = k + 1;
2042     end
2043     end
2044
2045     c = colorbar('horiz');
2046     c.Ticks = [set_range1 0 set_range2];

```

```

2047     c.TickLabels = [set_range1, '0', set_range2];
2048     c.Position = [0.85 0.55 0.1 0.03];
2049     c.TickDirection = 'out';
2050     c.AxisLocation = 'in';
2051
2052     dim = [.01 .92 .5 .05] ;
2053     a =
2054     annotation('textbox', dim, 'String', text_str, 'FitBoxToText', 'o
2055     n');
2056     a.FontSize = 6;
2057
2058     if (avg_evoked_peak_cal > 0) && (avg_peak_cal == 0)
2059         figure_name = ['AVG_boved_+evoked_peak_',
2060 num2str(l), '(', num2str(num_trials), '_trials)'];
2061     elseif (avg_evoked_peak_cal == 0) && (avg_peak_cal > 0)
2062         figure_name = ['AVG_boxed_+each_peak_', num2str(l),
2063 '(', num2str(num_trials), '_trials)'];
2064     elseif (avg_evoked_peak_cal > 0) && (avg_peak_cal > 0)
2065         figure_name = ['AVG_boxed_+each&evoked_peak_',
2066 num2str(l), '(', num2str(num_trials), '_trials)'];
2067     else
2068         figure_name = ['AVG_boxed_' num2str(l) '(',
2069 num2str(num_trials), '_trials)'];
2070     end
2071
2072     eval(['print -dtiff -r300 ./' figure_name '.tif']);
2073
2074     end
2075
2076     if show_contour > 0
2077         all_pix = Xpix * Ypix;
2078         Ymax_sum = max(Avg_box_cal_sum(:,4));
2079         Ymax_ratio = max(Avg_box_cal_ratio(:,4));
2080
2081         Avg_box_cal_sum_pix(isnan(Avg_box_cal_sum_pix)) =
2082 0;
2083         Avg_box_cal_sum(isnan(Avg_box_cal_sum)) = 0;
2084         Avg_box_cal_ratio(isnan(Avg_box_cal_ratio)) = 0;
2085
2086         figure
2087         dim = [.01 .92 .5 .05] ;
2088         bc =
2089         annotation('textbox', dim, 'String', text_str, 'FitBoxToText', 'o
2090         n');
2091         bc.FontSize = 5;
2092
2093         subplot(2,2,1)
2094         plot(Avg_box_cal_sum_pix(:,1), 'r', 'Linewidth',
2095 1)
2096         hold on
2097         plot(Avg_box_cal_sum_pix(:,2), 'y', 'Linewidth',
2098 1)
2099         plot(Avg_box_cal_sum_pix(:,3), 'g', 'Linewidth',
2100 1)
2101         plot(Avg_box_cal_sum_pix(:,4), 'c', 'Linewidth',
2102 1)
2103         plot([last_avg_num last_avg_num], [0 all_pix],
2104 'k:', 'Linewidth', 1)
2105         hold off
2106         ylim([0 all_pix])
2107         xlabel('Time (s)'), ylabel('Area (number of
2108 pixels)')
2109         xticks(0:5:12*5)
2110         set(gca, 'FontSize', 6)
2111
2112         xticklabels({'0', '0.75', '1.5', '2.25', '3.0', '3.75', '4.5', '5.2
2113 5', '6.0', '6.75', '7.5', '8.25', '9.0'})
2114
2115         subplot(2,2,2)
2116         plot(Avg_box_cal_sum(:,1), 'r', 'Linewidth', 1)
2117         hold on
2118         plot(Avg_box_cal_sum(:,2), 'y', 'Linewidth', 1)
2119         plot(Avg_box_cal_sum(:,3), 'g', 'Linewidth', 1)
2120         plot(Avg_box_cal_sum(:,4), 'c', 'Linewidth', 1)
2121         plot([last_avg_num last_avg_num], [0 Ymax_sum],
2122 'k:', 'Linewidth', 1)
2123         hold off
2124         ylim([0 Ymax_sum])
2125         legend('Q10 area', 'Q30 area', 'Q50 area', 'Q80
2126 area', 'Location', 'northeast')
2127         xticks(0:5:12*5)
2128         xlabel('Time (s)'), ylabel('Area intensity')
2129         set(gca, 'FontSize', 6)
2130
2131         xticklabels({'0', '0.75', '1.5', '2.25', '3.0', '3.75', '4.5', '5.2
2132 5', '6.0', '6.75', '7.5', '8.25', '9.0'});
2133         subplot(2,2,3)
2134         plot(Avg_box_cal_ratio(:,1), 'r', 'Linewidth', 1)
2135         hold on
2136         plot(Avg_box_cal_ratio(:,2), 'y', 'Linewidth', 1)
2137         plot(Avg_box_cal_ratio(:,3), 'g', 'Linewidth', 1)
2138         plot(Avg_box_cal_ratio(:,4), 'c', 'Linewidth', 1)
2139         plot([last_avg_num last_avg_num], [0 Ymax_ratio],
2140 'k:', 'Linewidth', 1)
2141         hold off
2142         ylim([0 Ymax_ratio])
2143         xlim([0 each_images])
2144         %legend('Q10 area', 'Q30 area', 'Q50 area', 'Q80
2145 area', 'Location', 'southwest')
2146         %text(each_images - 20, Ymax_ratio - (Ymax_ratio /
2147 8), text_cal_box_size)
2148         xticks(0:5:12*5)
2149         xlabel('Time (s)'), ylabel('Area ratio (Intensity
2150 / pixels)')
2151         set(gca, 'FontSize', 6)
2152
2153         xticklabels({'0', '0.75', '1.5', '2.25', '3.0', '3.75', '4.5', '5.2
2154 5', '6.0', '6.75', '7.5', '8.25', '9.0'})
2155
2156         subplot(2,2,4)
2157         plot(avg_each_max_intensity, 'r', 'Linewidth', 1)
2158         hold on
2159         plot(avg_each_min_intensity, 'b', 'Linewidth', 1)
2160         plot(avg_peak_diff, 'k', 'Linewidth', 1)
2161         plot([last_avg_num last_avg_num], [min_intensity
2162 max_intensity], 'k:', 'Linewidth', 1)
2163         hold off
2164         ylim([min_intensity max_intensity])
2165         legend('Max intensity', 'Min intensity',
2166 'Difference', 'Location', 'northeast')
2167         xticks(0:5:12*5)
2168         xlabel('Time (s)'), ylabel('Intensity (normalized
2169 to baseline)')
2170         set(gca, 'FontSize', 6)
2171
2172         xticklabels({'0', '0.75', '1.5', '2.25', '3.0', '3.75', '4.5', '5.2
2173 5', '6.0', '6.75', '7.5', '8.25', '9.0'})
2174
2175         figure_name = 'AVG_boxed_area_&_peak2';
2176         eval(['print -dtiff -r300 ./' figure_name '.tif']);
2177
2178         csvwrite('AVG_boxed_Area(number of pixels).csv',
2179 Avg_box_cal_sum_pix);
2180         csvwrite('AVG_boxed_Area_intensity.csv',
2181 Avg_box_cal_sum);
2182         csvwrite('AVG_boxed_Area_ratio.csv',
2183 Avg_box_cal_ratio);
2184
2185         end
2186     end
2187
2188     if ROI_peak > 0
2189         csvwrite('Circle_intensity.csv', Sum_cir_int);
2190         csvwrite('Center_intensity.csv', cir_cent_int);
2191         text_cal_rad_size = ['radius = ', num2str(r_val), '
2192 pixels'];
2193
2194         figure
2195         plot(Sum_cir_int, 'k', 'Linewidth', 1)
2196         hold on
2197         plot([last_avg_num last_avg_num], [min_cir_int
2198 max_cir_int], 'k:', 'Linewidth', 1)
2199         hold off
2200         ylim([min_cir_int max_cir_int])
2201         legend('ROI intensity', 'Location', 'southwest')
2202         text(each_images - 25, max_cir_int - (max_cir_int / 8),
2203 text_cal_rad_size)
2204         xticks(0:5:12*5)

```

```

2205
2206 xticklabels({'0','0.75','1.5','2.25','3.0','3.75','4.5','5.2
2207 5','6.0','6.75','7.5','8.25','9.0'})
2208 xlabel('Time (s)'), ylabel('Intensity (normalized to
2209 baseline)')
2210 figure_name = 'Circle_intensity';
2211 eval(['print -dtiff -r300 ./' figure_name '.tif']);
2212 end
2213
2214 if ROI_detection > 0
2215     ROI_max_position = zeros(2, 1);
2216     ROI_max_position(1, 1) =
2217 local_max_detec(local_max_posi, 2);
2218     ROI_max_position(2, 1) =
2219 local_max_detec(local_max_posi, 3);
2220
2221     csvwrite('Circle_intensity.csv', Sum_cir_int);
2222     csvwrite('Peak_intensity.csv', cir_peak_int);
2223     csvwrite('ROI_peak_position.csv', ROI_max_position);
2224     text_cal_rad_size = ['radius = ', num2str(r_radii), '
2225 pixels'];
2226
2227     figure
2228     plot(cir_peak_int, 'k', 'Linewidth', 1)
2229     hold on
2230     plot([last_avg_num last_avg_num], [min_peak_int
2231 max_peak_int], 'k:', 'Linewidth', 1)
2232     hold off
2233     ylim([min_peak_int max_peak_int])
2234     legend('Peak intensity', 'Location', 'southwest')
2235     xticks(0:5:12*5)
2236
2237     xticklabels({'0','0.75','1.5','2.25','3.0','3.75','4.5','5.2
2238 5','6.0','6.75','7.5','8.25','9.0'})
2239     xlabel('Time (s)'), ylabel('Intensity (normalized to
2240 baseline)')
2241     figure_name = 'Peak_intensity';
2242     eval(['print -dtiff -r300 ./' figure_name '.tif']);
2243
2244     plot(Sum_cir_int, 'k', 'Linewidth', 1)
2245     hold on
2246     plot([last_avg_num last_avg_num], [min_cir_int
2247 max_cir_int], 'k:', 'Linewidth', 1)
2248     hold off
2249     ylim([min_cir_int max_cir_int])
2250     legend('ROI intensity', 'Location', 'southwest')
2251     text(each_images - 25, max_cir_int - (max_cir_int / 8),
2252 text_cal_rad_size)
2253     xticks(0:5:12*5)
2254
2255     xticklabels({'0','0.75','1.5','2.25','3.0','3.75','4.5','5.2
2256 5','6.0','6.75','7.5','8.25','9.0'})
2257     xlabel('Time (s)'), ylabel('Intensity (normalized to
2258 baseline)')
2259     figure_name = 'Circle_intensity';
2260     eval(['print -dtiff -r300 ./' figure_name '.tif']);
2261 end
2262
2263 close all
2264
2265 if section_val > 0
2266     xlswrite('Section_pixel_intensity.xlsx', pix_sec_val)
2267     k = 25;
2268     l = 1;
2269     num_figures = 3;
2270     last_num_figures = k + (6 * num_figures);
2271
2272     for l = 1 : num_figures
2273         figure(l)
2274
2275         for m = 1 : 6
2276
2277             if k > last_num_figures
2278                 k = 1;
2279             else
2280                 subplot(2,3,m)
2281                 plot(x_ax_sec, pix_sec_val_2(k+4, :))
2282                 title(['Image No ', num2str(k)])
2283                 ylabel('change rate (a.u. baseline)')

```

```

2284         set(gca, 'FontSize', 6)
2285         xlim([pix_sec_first pix_sec_num_2])
2286         ylim([min_each_evoked_min_intensity_temp
2287 max_each_evoked_max_intensity_temp])
2288
2289         hold on
2290
2291         plot([high_posi high_posi],
2292 [min_each_evoked_min_intensity_temp
2293 max_each_evoked_max_intensity_temp], 'r:', 'Linewidth', 0.5)
2294         plot([low_posi low_posi],
2295 [min_each_evoked_min_intensity_temp
2296 max_each_evoked_max_intensity_temp], 'b:', 'Linewidth', 0.5)
2297         plot([pix_sec_first pix_sec_num_2], [0 0],
2298 'k:', 'Linewidth', 0.5)
2299
2300         hold off
2301
2302         k = k + 1;
2303     end
2304 end
2305 figure_name = ['Section_pixel_intensity_'
2306 num2str(l)];
2307 eval(['print -dtiff -r300 ./' figure_name '.tif']);
2308 end
2309
2310 cd ..
2311 end
2312 close all
2313
2314 if movie_on > 0
2315     writeObj =
2316 VideoWriter('Flavin_activity_movie.avi','MPEG-4'); % MPEG-4
2317 は圧縮したければ
2318     writeObj.FrameRate = 6;
2319     open(writeObj);
2320
2321     % Animation Loop
2322     i = 1;
2323     while i <= each_images
2324         imagesc(Avg_box_cal(:, :, i), clims)
2325         xticks([])
2326         yticks([])
2327         colormap(jet)
2328
2329         %時間入力
2330         xt = Xpix - 90;
2331         yt = 30;
2332         time_text = (i - last_avg_num) * 0.15;
2333         str = [sprintf('%2f', time_text), ' s'];
2334         text(xt, yt, str, 'FontSize', 30)
2335
2336         if i > last_avg_num && i < last_avg_num + 5
2337             xt = 25;
2338             yt = 40;
2339             str = sprintf('●Tone');
2340             text(xt, yt, str, 'FontSize', 30)
2341         end
2342
2343         drawnow;
2344         i = i + 1;
2345         F = getframe(gca); %1は gcf の値
2346         writeVideo(writeObj, F);
2347     end
2348
2349     close(writeObj);
2350 end
2351
2352 cd ..
2353 if (avg_evoked_peak_cal > 0) || (avg_peak_cal > 0)
2354     cd ..
2355 end
2356 if design_peak > 0
2357     if ROI_peak > 0
2358         cd ..
2359     end
2360
2361     cd ..
2362 end

```

```

2363
2364 close all
2365 end
2366 %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
2367 %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
2368
2369 %Threshold以上のみ抽出
2370 if (Threshold_trial > 0) && (thr_t_test == 0) && (std_cal == 0)
2371
2372     if Gauss_avg_trial > 0
2373         exist Average_gauss dir;
2374         A = ans;
2375         if A < 1
2376             mkdir Average_gauss
2377         end
2378         cd Average_gauss
2379
2380         text_box = {'Kernel = ', cal_box_pix, 'x', cal_box_pix,
2381 ', Gaussian sigma = ', sigma, ', Spatial average = ',
2382 phys_avg_size, 'x', phys_avg_size};
2383         text_str = string(text_box); %Cell配列になっているの
2384 でstring配列に変更
2385         text_str = strjoin(text_str); %string配列にしただけで
2386 は、改行されるので、一行に変更
2387     elseif LR_avg_trial > 0
2388         exist Average_LR dir;
2389         A = ans;
2390         if A < 1
2391             mkdir Average_LR
2392         end
2393         cd Average_LR
2394
2395         text_box = {'Kernel = ', cal_box_pix, 'x', cal_box_pix,
2396 ', Gaussian sigma = ', sigma, ', Repeat = ', repeat_num, ',
2397 Spatial average = ', phys_avg_size, 'x', phys_avg_size};
2398         text_str = string(text_box);
2399         text_str = strjoin(text_str);
2400     elseif Cal_box > 0
2401         exist Average_processing dir;
2402         A = ans;
2403         if A < 1
2404             mkdir Average_processing
2405         end
2406         cd Average_processing
2407
2408         text_box = {'Kernel = ', cal_box_pix, 'x', cal_box_pix,
2409 ', Spatial average = ', phys_avg_size, 'x', phys_avg_size};
2410         text_str = string(text_box);
2411         text_str = strjoin(text_str);
2412     end
2413
2414     sd_size = 'Threshold%d';
2415     thr = sprintf(sd_size, thr_val/1);
2416     exist(thr, 'dir');
2417     A = ans;
2418     if A < 1
2419         mkdir(thr)
2420     end
2421     cd(thr)
2422
2423     if mouse_side == 'L'
2424         rot_img = rot90(show_img, -2);
2425     elseif mouse_side == 'R'
2426         rot_img = flip(show_img, 1);
2427     elseif mouse_side == 'o'
2428         rot_img = rot90(show_img, 2);
2429     end
2430
2431     mod_img = imresize(rot_img, [Xpix Ypix]);
2432     mod_img = mod_img * 4;
2433
2434     k = 1 ;
2435
2436     while k <= each_images
2437
2438         for l = 1 : num_figures
2439             figure(l)
2440
2441             for m = 1 : 10

```

```

2442
2443         if k > each_images
2444             break ;
2445         else
2446
2447             subplot_tight(2, 5, m, .01)
2448             imshow(mod_img_gray)
2449             imshow(mod_img)
2450             daspect([1 1 1])
2451             xticks([])
2452             yticks([])
2453
2454             Avg_box_cal_k = Avg_box_cal(:, :, k);
2455             Thr_bor = [thr_val, thr_val];
2456             Thr_im = imbinarize(Avg_box_cal_k,
2457 thr_val);
2458
2459             Thr_im_2 = bwareaopen(Thr_im, 25);
2460             Thr_im_2 = imfill(Thr_im_2, 'holes');
2461
2462             [~, L] = bwboundaries(Thr_im_2);
2463
2464             %Threshold以上の値を1とする計算
2465             Avg_box_cal_sum_pix(k, 1) =
2466 sum(sum(Thr_im_2));
2467             %Threshold以上の値を抽出し加算する
2468             Avg_box_cal_sum(k, 1) =
2469 sum(Avg_box_cal_k(Thr_im_2));
2470             %Threshold以上の値を抽出し、areaを割る
2471             Avg_box_cal_ratio(k, 1) =
2472 Avg_box_cal_sum(k, 1) ./ Avg_box_cal_sum_pix(k, 1);
2473
2474             cRange = caxis;
2475
2476             hold on
2477             Merge_img_1 =
2478 imshow(imoverlay(mod_img_gray, L, [1 0 0]));
2479
2480             set(Merge_img_1, 'AlphaData', 0.7);
2481
2482             %contour(Avg_box_cal_k, Thr_bor,
2483 'LineColor', [0.8 0 0])
2484             caxis(cRange);
2485             hold off
2486
2487             title(['Image No ', num2str(k)])
2488             k = k + 1;
2489         end
2490     end
2491     end
2492     if (Cal_box > 0) && (LR_avg_trial == 0)
2493         figure_name = ['AVG_box_thr_', num2str(l), '( ',
2494 num2str(num_trials), '_trials)'];
2495     elseif (Cal_box > 0) && (LR_avg_trial > 0)
2496         figure_name = ['AVG_LR_thr_', num2str(l), '( ',
2497 num2str(num_trials), '_trials)'];
2498     else
2499         figure_name = ['AVG_thr_', num2str(l), '( ',
2500 num2str(num_trials), '_trials)'];
2501     end
2502     eval(['print -dtiff -r300 ./' figure_name '.tif']);
2503     end
2504
2505     csvwrite('AVG_Area_pixels.csv', Avg_box_cal_sum_pix);
2506     csvwrite('AVG_Area_intensity.csv', Avg_box_cal_sum);
2507     csvwrite('AVG_Area_ratio.csv', Avg_box_cal_ratio);
2508 end
2509 cd ..
2510 cd ..
2511 close all
2512 end
2513 %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
2514 %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
2515
2516 %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
2517 %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
2518 %Threshold以上のみ抽出
2519 if (Threshold_trial > 0) && (std_cal > 0)

```

```

2521     if Gauss_avg_trial > 0
2522         exist Average_gauss dir;
2523         A = ans;
2524         if A < 1
2525             mkdir Average_gauss
2526         end
2527         cd Average_gauss
2528
2529         text_box = {'Kernel = ', cal_box_pix, 'x', cal_box_pix,
2530 ', Gaussian sigma = ', sigma, ', Spatial average = ',
2531 phys_avg_size, 'x', phys_avg_size};
2532         text_str = string(text_box); %Cell配列になっているの
2533 でstring配列に変更
2534         text_str = strjoin(text_str); %string配列にただけで
2535 は、改行されるので、一行に変更
2536         elseif LR_avg_trial > 0
2537             exist Average_LR dir;
2538             A = ans;
2539             if A < 1
2540                 mkdir Average_LR
2541             end
2542             cd Average_LR
2543
2544             text_box = {'Kernel = ', cal_box_pix, 'x', cal_box_pix,
2545 ', Gaussian sigma = ', sigma, ', Repeat = ', repeat_num, ',
2546 Spatial average = ', phys_avg_size, 'x', phys_avg_size};
2547             text_str = string(text_box);
2548             text_str = strjoin(text_str);
2549         elseif Cal_box > 0
2550             exist Average_processing dir;
2551             A = ans;
2552             if A < 1
2553                 mkdir Average_processing
2554             end
2555             cd Average_processing
2556
2557             text_box = {'Kernel = ', cal_box_pix, 'x', cal_box_pix,
2558 ', Spatial average = ', phys_avg_size, 'x', phys_avg_size};
2559             text_str = string(text_box);
2560             text_str = strjoin(text_str);
2561         end
2562
2563         sd_size = 'Threshold_%0.1fxSD';
2564         SD_thr = sprintf(sd_size, std_sigma);
2565         exist(SD_thr, 'dir');
2566         A = ans;
2567         if A < 1
2568             mkdir(SD_thr)
2569         end
2570         cd(SD_thr)
2571
2572         thr_val_temp = zeros(1, last_avg_num - first_avg_num);
2573
2574         i = 1;
2575         for k = first_avg_num : last_avg_num
2576             thr_val_temp(1, i) = std(reshape(Avg_box_cal(:, :, k),
2577 [1, Xpix * Ypix]));
2578             i = i + 1;
2579         end
2580
2581         thr_val = mean(thr_val_temp) * std_sigma;
2582
2583         if mouse_side == 'L'
2584             rot_img = rot90(show_img, -2);
2585         elseif mouse_side == 'R'
2586             rot_img = flip(show_img, 1);
2587         elseif mouse_side == 'o'
2588             rot_img = rot90(show_img, 2);
2589         end
2590
2591         mod_img = imresize(rot_img, [Xpix Ypix]);
2592         mod_img = mod_img * 4;
2593
2594         k = 1;
2595         while k <= each_images
2596             for l = 1 : num_figures
2597                 figure(l)

```

```

2600
2601         for m = 1 : 10
2602
2603             if k > each_images
2604                 break;
2605             else
2606                 subplot_tight(2, 5, m, .01)
2607                 imshow(mod_img)
2608                 %imshow(mod_img_gray)
2609                 daspect([1 1 1])
2610                 xticks([])
2611                 yticks([])
2612
2613                 Avg_box_cal_k = Avg_box_cal(:, :, k);
2614                 Thr_im = imbinarize(Avg_box_cal_k,
2615 thr_val);
2616
2617                 %あるpixel数以下のthreshold areaを削除
2618                 Thr_im_2 = bwareaopen(Thr_im, 25);
2619                 Thr_im_2 = imfill(Thr_im_2, 'holes');
2620
2621                 [~, L] = bwboundaries(Thr_im_2);
2622
2623                 %Threshold以上の値を1とする計算
2624                 Avg_box_cal_sum_pix(k, 1) =
2625 sum(sum(Thr_im_2));
2626                 %Threshold以上の値を抽出し加算する
2627                 Avg_box_cal_sum(k, 1) =
2628 sum(Avg_box_cal_k(Thr_im_2));
2629                 %Threshold以上の値を抽出し、areaを割る
2630                 Avg_box_cal_ratio(k, 1) =
2631 Avg_box_cal_sum(k, 1) ./ Avg_box_cal_sum_pix(k, 1);
2632
2633                 cRange = caxis;
2634
2635                 hold on
2636                 Merge_img_1 =
2637 imshow(imoverlay(mod_img, L, [1 0 0]));
2638
2639                 set(Merge_img_1, 'AlphaData', 0.7);
2640
2641                 warning('off','all')
2642
2643                 caxis(cRange);
2644                 hold off
2645
2646                 title(['Image No ', num2str(k)])
2647                 k = k + 1;
2648             end
2649         end
2650
2651         dim = [.01 .92 .5 .05];
2652
2653         a =
2654 annotation('textbox', dim, 'String', text_str, 'FitBoxToText', 'o
2655 n');
2656         a.FontSize = 6;
2657
2658         if (Cal_box > 0) && (LR_avg_trial == 0)
2659             figure_name = ['AVG_box_thr_', num2str(l), '(',
2660 num2str(num_trials), '_trials)'];
2661         elseif (Cal_box > 0) && (LR_avg_trial > 0)
2662             figure_name = ['AVG_LR_thr_', num2str(l), '(',
2663 num2str(num_trials), '_trials)'];
2664         else
2665             figure_name = ['AVG_thr_', num2str(l), '(',
2666 num2str(num_trials), '_trials)'];
2667         end
2668         eval(['print -dtiff -r300 ./' figure_name '.tif']);
2669         end
2670
2671         csvwrite('AVG_Area_pixels.csv', Avg_box_cal_sum_pix);
2672         csvwrite('AVG_Area_intensity.csv', Avg_box_cal_sum);
2673         csvwrite('AVG_Area_ratio.csv', Avg_box_cal_ratio);
2674     end
2675     cd ..
2676     cd ..
2677
2678     close all
2679 end

```

```

2679 %%%%%%%%%%%
2680 %%%%%%%%%%%
2681 %%%%%%%%%%%
2682 %%%%%%%%%%%
2683 %%%%%%%%%%%
2684 %t-testによる評価
2685 if thr_t_test > 0
2686
2687     exist t_test dir;
2688     A = ans;
2689     if A < 1
2690         mkdir t_test
2691     end
2692     cd t_test
2693
2694     t_box_cal = zeros(Xpix, Ypix, each_images);
2695     for m = 1 : each_images
2696         k = 0;
2697         for i = 1 : Xpix
2698             Xpix2 = i + cal_box_pix - 1;
2699             if Xpix2 >= Xpix
2700                 Xpix2 = Xpix2 - k;
2701                 k = k + 1;
2702             end
2703             l = 0;
2704             for j = 1 : Ypix
2705                 Ypix2 = j + cal_box_pix - 1;
2706                 if Ypix2 >= Ypix
2707                     Ypix2 = Ypix2 - l;
2708                     l = l + 1;
2709                 end
2710                 cal_box_size = (Xpix2 - i + 1) * (Ypix2 - j +
2711 1);
2712
2713                 samp_cal = reshape(avg_Image_Matrix(i : Xpix2,
2714 j : Ypix2, m), [1, cal_box_size]);
2715
2716                 if m == 1
2717                     base_cal = reshape(avg_Image_Matrix(i :
2718 Xpix2, j : Ypix2, first_avg_num : last_avg_num), [1, cal_box_size
2719 * (last_avg_num - first_avg_num + 1)]);
2720                 end
2721                 t_box_cal(i, j, m) = tttest2(samp_cal,
2722 base_cal);
2723             end
2724         end
2725     end
2726     count = m
2727 end
2728
2729
2730
2731 if mouse_side == 'L'
2732     rot_img = rot90(show_img, -2);
2733 elseif mouse_side == 'R'
2734     rot_img = flip(show_img, 1);
2735 elseif mouse_side == 'o'
2736     rot_img = rot90(show_img, 2);
2737 end
2738
2739 mod_img = imresize(rot_img, [Xpix Ypix]);
2740 mod_img = mod_img * 4;
2741
2742 c_lims = [0 0.2];
2743
2744 k = 1;
2745
2746 if show_contour > 0
2747     Avg_box_cal_sum_pix = zeros(each_images, 4);
2748     Avg_box_cal_ratio = zeros(each_images, 4);
2749     Avg_box_cal_sum = zeros(each_images, 4);
2750 end
2751
2752 while k <= each_images
2753     for l = 1 : num_figures
2754         figure(l)
2755     end
2756 end
2757

```

```

2758
2759 for m = 1 : 10
2760
2761     if k > each_images
2762         k = 1;
2763     else
2764         subplot_tight(2, 5, m, .01)
2765         imagesc(t_box_cal(:, :, k), c_lims)
2766         xticks([])
2767         yticks([])
2768         Avg_box_cal_k = t_box_cal(:, :, k);
2769
2770         if show_contour > 0
2771             cRange = caxis;
2772             Q10_bor = [Q10(k), Q10(k)];
2773             Q30_bor = [Q30(k), Q30(k)];
2774             Q50_bor = [Q50(k), Q50(k)];
2775             Q80_bor = [Q80(k), Q80(k)];
2776         end
2777
2778         hold on
2779         if show_contour > 0
2780             contour(Avg_box_cal_k, Q10_bor,
2781 'LineColor', 'r')
2782             contour(Avg_box_cal_k, Q30_bor,
2783 'LineColor', 'y')
2784             contour(Avg_box_cal_k, Q50_bor,
2785 'LineColor', 'g')
2786             contour(Avg_box_cal_k, Q80_bor,
2787 'LineColor', 'c')
2788             caxis(cRange);
2789         end
2790         if avg_evoked_peak_cal > 0
2791             plot([Yax_max Yax_max], [Xax_max
2792 Xax_max], 'o',...
2793 'MarkerEdgeColor','white',
2794 'MarkerFaceColor','red', 'MarkerSize',5);
2795             plot([Yax_min Yax_min], [Xax_min
2796 Xax_min], 'o',...
2797 'MarkerEdgeColor','white',
2798 'MarkerFaceColor','blue', 'MarkerSize',5);
2799         end
2800         if avg_peak_cal > 0
2801             plot([max_position(k, 2)
2802 max_position(k, 2)], [max_position(k, 1) max_position(k, 1)],
2803 's',...
2804 'MarkerEdgeColor','white',
2805 'MarkerFaceColor','red', 'MarkerSize',5);
2806             plot([min_position(k, 2)
2807 min_position(k, 2)], [min_position(k, 1) min_position(k, 1)],
2808 's',...
2809 'MarkerEdgeColor','white',
2810 'MarkerFaceColor','blue', 'MarkerSize',5);
2811         end
2812         hold off
2813
2814         xlim([0 Xpix])
2815         ylim([0 Ypix])
2816         colormap(jet), axis square
2817         title([' Image No ', num2str(k)])
2818
2819         if show_contour > 0
2820             %Threshold以上の値を1とする計算
2821             Avg_box_cal_sum_pix(k, 1) =
2822 sum(sum(imbinarize(Avg_box_cal_k, Q10(k))));
2823             Avg_box_cal_sum_pix(k, 2) =
2824 sum(sum(imbinarize(Avg_box_cal_k, Q30(k))));
2825             Avg_box_cal_sum_pix(k, 3) =
2826 sum(sum(imbinarize(Avg_box_cal_k, Q50(k))));
2827             Avg_box_cal_sum_pix(k, 4) =
2828 sum(sum(imbinarize(Avg_box_cal_k, Q80(k))));
2829
2830             %Threshold以上の値を抽出し加算する
2831             Q10_thr = Avg_box_cal_k >= Q10(k);
2832             Q30_thr = Avg_box_cal_k >= Q30(k);
2833             Q50_thr = Avg_box_cal_k >= Q50(k);
2834             Q80_thr = Avg_box_cal_k >= Q80(k);
2835             Avg_box_cal_sum(k, 1) =
2836 sum(Avg_box_cal_k(Q10_thr));
2837             Avg_box_cal_sum(k, 2) =

```

```

2837 sum(Avg_box_cal_k(Q30_thr));
2838     Avg_box_cal_sum(k, 3) =
2839 sum(Avg_box_cal_k(Q50_thr));
2840     Avg_box_cal_sum(k, 4) =
2841 sum(Avg_box_cal_k(Q80_thr));
2842
2843     %Threshold以上の値を抽出し、areaを割る
2844     Avg_box_cal_ratio(k, 1) =
2845 Avg_box_cal_sum(k, 1) ./ Avg_box_cal_sum_pix(k, 1);
2846     Avg_box_cal_ratio(k, 2) =
2847 Avg_box_cal_sum(k, 2) ./ Avg_box_cal_sum_pix(k, 2);
2848     Avg_box_cal_ratio(k, 3) =
2849 Avg_box_cal_sum(k, 3) ./ Avg_box_cal_sum_pix(k, 3);
2850     Avg_box_cal_ratio(k, 4) =
2851 Avg_box_cal_sum(k, 4) ./ Avg_box_cal_sum_pix(k, 4);
2852     end
2853
2854     k = k + 1;
2855     end
2856     end
2857
2858     c = colorbar('horiz');
2859     c.Ticks = [set_range1 0 set_range2];
2860     c.TickLabels = {set_range1, '0', set_range2};
2861     c.Position = [0.85 0.55 0.1 0.03];
2862     c.TickDirection = 'out';
2863     c.AxisLocation = 'in';
2864
2865     dim = [.01 .92 .5 .05];
2866     a =
2867 annotation('textbox', dim, 'String', text_str, 'FitBoxToText', 'o
2868 n');
2869     a.FontSize = 6;
2870
2871     if (avg_evoked_peak_cal > 0) && (avg_peak_cal == 0)
2872         figure_name = ['AVG_boved_evoked_peak_',
2873 num2str(l), '(', num2str(num_trials), '_trials)'];
2874     elseif (avg_evoked_peak_cal == 0) && (avg_peak_cal > 0)
2875         figure_name = ['AVG_boxed_each_peak_', num2str(l),
2876 '(', num2str(num_trials), '_trials)'];
2877     elseif (avg_evoked_peak_cal > 0) && (avg_peak_cal > 0)
2878         figure_name = ['AVG_boxed_each&evoked_peak_',
2879 num2str(l), '(', num2str(num_trials), '_trials)'];
2880     else
2881         figure_name = ['AVG_boxed_', num2str(l) '(',
2882 num2str(num_trials), '_trials)'];
2883     end
2884
2885     eval(['print -dtiff -r300 ./' figure_name '.tif']);
2886
2887     end
2888
2889     if show_contour > 0
2890         all_pix = Xpix * Ypix;
2891         Ymax_sum = max(Avg_box_cal_sum(:, 4));
2892         Ymax_ratio = max(Avg_box_cal_ratio(:, 4));
2893
2894         Avg_box_cal_sum_pix(isnan(Avg_box_cal_sum_pix)) =
2895 0;
2896         Avg_box_cal_sum(isnan(Avg_box_cal_sum)) = 0;
2897         Avg_box_cal_ratio(isnan(Avg_box_cal_ratio)) = 0;
2898
2899         figure
2900         dim = [.01 .92 .5 .05];
2901         a =
2902 annotation('textbox', dim, 'String', text_str, 'FitBoxToText', 'o
2903 n');
2904         a.FontSize = 6;
2905
2906         subplot(2, 2, 1)
2907         plot(Avg_box_cal_sum_pix(:, 1), 'r', 'Linewidth',
2908 1)
2909         hold on
2910         plot(Avg_box_cal_sum_pix(:, 2), 'y', 'Linewidth',
2911 1)
2912         plot(Avg_box_cal_sum_pix(:, 3), 'g', 'Linewidth',
2913 1)
2914         plot(Avg_box_cal_sum_pix(:, 4), 'c', 'Linewidth',
2915 1)
2916         plot([last_avg_num last_avg_num], [0 all_pix],
2917 'k:', 'Linewidth', 1)
2918         hold off
2919         ylim([0 all_pix])
2920
2921         xlabel('Time (s)'), ylabel('Area (number of
2922 pixels)')
2923         xticks(0:5:12*5)
2924         set(gca, 'FontSize', 6)
2925
2926         xticklabels({'0', '0.75', '1.5', '2.25', '3.0', '3.75', '4.5', '5.2
2927 5', '6.0', '6.75', '7.5', '8.25', '9.0'})
2928
2929         subplot(2, 2, 2)
2930         plot(Avg_box_cal_sum(:, 1), 'r', 'Linewidth', 1)
2931         hold on
2932         plot(Avg_box_cal_sum(:, 2), 'y', 'Linewidth', 1)
2933         plot(Avg_box_cal_sum(:, 3), 'g', 'Linewidth', 1)
2934         plot(Avg_box_cal_sum(:, 4), 'c', 'Linewidth', 1)
2935         plot([last_avg_num last_avg_num], [0 Ymax_sum],
2936 'k:', 'Linewidth', 1)
2937         hold off
2938         ylim([0 Ymax_sum])
2939         legend('Q10 area', 'Q30 area', 'Q50 area', 'Q80
2940 area', 'Location', 'northeast')
2941
2942         xticks(0:5:12*5)
2943         xlabel('Time (s)'), ylabel('Area intensity')
2944         set(gca, 'FontSize', 6)
2945
2946         xticklabels({'0', '0.75', '1.5', '2.25', '3.0', '3.75', '4.5', '5.2
2947 5', '6.0', '6.75', '7.5', '8.25', '9.0'})
2948
2949         subplot(2, 2, 3)
2950         plot(Avg_box_cal_ratio(:, 1), 'r', 'Linewidth', 1)
2951         hold on
2952         plot(Avg_box_cal_ratio(:, 2), 'y', 'Linewidth', 1)
2953         plot(Avg_box_cal_ratio(:, 3), 'g', 'Linewidth', 1)
2954         plot(Avg_box_cal_ratio(:, 4), 'c', 'Linewidth', 1)
2955         plot([last_avg_num last_avg_num], [0 Ymax_ratio],
2956 'k:', 'Linewidth', 1)
2957         hold off
2958         ylim([0 Ymax_ratio])
2959         xlim([0 each_images])
2960         xticks(0:5:12*5)
2961         xlabel('Time (s)'), ylabel('Area ratio (Intensity
2962 / pixels)')
2963         set(gca, 'FontSize', 6)
2964
2965         xticklabels({'0', '0.75', '1.5', '2.25', '3.0', '3.75', '4.5', '5.2
2966 5', '6.0', '6.75', '7.5', '8.25', '9.0'})
2967
2968         subplot(2, 2, 4)
2969         plot(avg_each_max_intensity, 'r', 'Linewidth', 1)
2970         hold on
2971         plot(avg_each_min_intensity, 'b', 'Linewidth', 1)
2972         plot(avg_peak_diff, 'k', 'Linewidth', 1)
2973         plot([last_avg_num last_avg_num], [min_intensity
2974 max_intensity], 'k:', 'Linewidth', 1)
2975         hold off
2976         ylim([min_intensity max_intensity])
2977         legend('Max intensity', 'Min intensity',
2978 'Difference', 'Location', 'northeast')
2979         xticks(0:5:12*5)
2980         xlabel('Time (s)'), ylabel('Intensity (normalized
2981 to baseline)')
2982         set(gca, 'FontSize', 6)
2983
2984         xticklabels({'0', '0.75', '1.5', '2.25', '3.0', '3.75', '4.5', '5.2
2985 5', '6.0', '6.75', '7.5', '8.25', '9.0'})
2986
2987         figure_name = 'AVG_boxed_area_&_peak2';
2988         eval(['print -dtiff -r300 ./' figure_name '.tif']);
2989
2990         csvwrite('AVG_boxed_Area(number of pixels).csv',
2991 Avg_box_cal_sum_pix);
2992         csvwrite('AVG_boxed_Area_intensity.csv',
2993 Avg_box_cal_sum);
2994         csvwrite('AVG_boxed_Area_ratio.csv',

```

```

2995 Avg_box_cal_ratio);
2996
2997     end
2998 end
2999 close all
3000 end
3001
3002 %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
3003 %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
3004 %Difference threshold以上のみ抽出
3005 if diff_trial > 0
3006
3007     exist Difference_images dir;
3008     A = ans;
3009     if A < 1
3010         mkdir Difference_images
3011     end
3012 cd Difference_images
3013
3014 thr_val = diff_base_std;
3015
3016 if mouse_side == 'L'
3017     rot_img = rot90(show_img, -2);
3018 elseif mouse_side == 'R'
3019     rot_img = flip(show_img, 1);
3020 elseif mouse_side == 'o'
3021     rot_img = rot90(show_img, 2);
3022 end
3023
3024 mod_img = imresize(rot_img, [Xpix Ypix]);
3025 mod_img = mod_img * 4;
3026
3027 k = 1 ;
3028
3029 while k <= each_images
3030
3031     for l = 1 : num_figures
3032         figure(l)
3033
3034         for m = 1 : 10
3035
3036             if k > each_images
3037                 break ;
3038             else
3039                 subplot_tight(2, 5, m, .01)
3040                 imshow(mod_img)
3041                 daspect([1 1 1])
3042                 xticks([])
3043                 yticks([])
3044
3045
3046                 Avg_box_cal_k = Avg_box_cal( :, :, k);
3047                 Thr_bor = [thr_val, thr_val];
3048                 Thr_im = imbinarize(Avg_box_cal_k,
3049 thr_val);
3050                 Thr_im_2 = bwareaopen(Thr_im, 10);
3051                 [boundary, L] = bwboundaries(Thr_im_2);
3052
3053                 %Threshold以上の値を1とする計算
3054                 Avg_box_cal_sum_pix(k, 1) =
3055 sum(sum(imbinarize(Avg_box_cal_k, thr_val)));
3056                 %Threshold以上の値を抽出し加算する
3057                 thr_1 = Avg_box_cal_k >= thr_val;
3058                 Avg_box_cal_sum(k, 1) =
3059 sum(Avg_box_cal_k(thr_1));
3060                 %Threshold以上の値を抽出し、areaを割る
3061                 Avg_box_cal_ratio(k, 1) =
3062 Avg_box_cal_sum(k, 1) ./ Avg_box_cal_sum_pix(k, 1);
3063
3064                 cRange = caxis;
3065
3066                 hold on
3067                 Merge_img_1 =
3068 imshow(imover lay(mod_img, L, [1 0 0]));
3069
3070                 set(Merge_img_1, 'AlphaData', 0.8);
3071
3072                 contour(Avg_box_cal_k, Thr_bor,
3073 'LineColor', [0.8 0 0])

```

```

3074                 caxis(cRange);
3075                 hold off
3076
3077
3078                 title([' Image No ', num2str(k)])
3079                 k = k + 1;
3080             end
3081         end
3082     if (Cal_box > 0) && (LR_avg_trial == 0)
3083         figure_name = ['AVG_diff_box_thr_', num2str(l),
3084 '(', num2str(num_trials), '_trials)'];
3085     elseif (Cal_box > 0) && (LR_avg_trial > 0)
3086         figure_name = ['AVG_diff_LR_thr_', num2str(l), '(',
3087 num2str(num_trials), '_trials)'];
3088     else
3089         figure_name = ['AVG_diff_thr_', num2str(l), '(',
3090 num2str(num_trials), '_trials)'];
3091     end
3092     eval(['print -dtiff -r300 ./' figure_name '.tif']);
3093 end
3094
3095     csvwrite('AVG_diff_Area_pixels.csv',
3096 Avg_box_cal_sum_pix);
3097     csvwrite('AVG_diff_Area_intensity.csv',
3098 Avg_box_cal_sum);
3099     csvwrite('AVG_diff_Area_ratio.csv',
3100 Avg_box_cal_ratio);
3101     end
3102     cd ..
3103     cd ..
3104     close all
3105 end
3106
3107 %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
3108 %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
3109 %各trial画像の出力
3110 if All_trial > 0
3111
3112     exist All_trial_images dir;
3113     A = ans;
3114     if A < 1
3115         mkdir All_trial_images
3116     end
3117     cd All_trial_images
3118
3119     ALL_cal = ALL_Image_Matrix;
3120     ALL_cal_2 = ALL_Image_Matrix_2;
3121
3122     if (Cal_box > 0) && (LR_avg_trial == 0)
3123         evoked_cal_max_intensity = zeros(each_images,
3124 num_trials);
3125         evoked_cal_min_intensity = zeros(each_images,
3126 num_trials);
3127
3128         for l = 1 : each_images
3129             k = 0;
3130             for i = 1 : Xpix
3131                 Xpix2 = i + cal_box_pix - 1;
3132                 if Xpix2 >= Xpix
3133                     Xpix2 = Xpix2 - k;
3134                     k = k + 1;
3135                 end
3136                 m = 0;
3137                 for j = 1 : Ypix
3138                     Ypix2 = j + cal_box_pix - 1;
3139                     if Ypix2 >= Ypix
3140                         Ypix2 = Ypix2 - m;
3141                         m = m + 1;
3142                     end
3143
3144                     cal_box_size = (Xpix2 - i + 1) * (Ypix2 -
3145 j + 1);
3146
3147                     ALL_cal(i, j, l, :) =
3148 mean(reshape(ALL_Image_Matrix(i : Xpix2, j : Ypix2, l, :),...
3149 [cal_box_size, num_trials]), 1);
3150                 end
3151             end
3152         end

```

```

3153     end
3154
3155     if avg_evoked_peak_cal > 0
3156
3157         cal_box_size_max = (Xax_max_re - Xax_max + 1) *
3158 (Yax_max_re - Yax_max + 1);
3159         cal_box_size_min = (Xax_min_re - Xax_min + 1) *
3160 (Yax_min_re - Yax_min + 1);
3161
3162         for l = 1 : num_trials
3163             evoked_cal_max_intensity(:, l) =
3164 mean(reshape(ALL_cal(Xax_max : Xax_max_re, Yax_max :
3165 Yax_max_re, :, l),...
3166 [cal_box_size_max, each_images]), 1);
3167             evoked_cal_min_intensity(:, l) =
3168 mean(reshape(ALL_cal(Xax_min : Xax_min_re, Yax_min :
3169 Yax_min_re, :, l),...
3170 [cal_box_size_min, each_images]), 1);
3171         end
3172
3173         evoked_cal_max_max =
3174 max(max(evoked_cal_max_intensity));
3175         evoked_cal_max_min =
3176 min(min(evoked_cal_max_intensity));
3177         evoked_cal_min_max =
3178 max(max(evoked_cal_min_intensity));
3179         evoked_cal_min_min =
3180 min(min(evoked_cal_min_intensity));
3181
3182         csvwrite('all_evoked_MAX_intensity.csv',
3183 evoked_cal_max_intensity);
3184         csvwrite('all_evoked_MAX_axis.csv',
3185 max_evoked_position);
3186
3187         csvwrite('all_evoked_MIN_intensity.csv',
3188 evoked_cal_min_intensity);
3189         csvwrite('all_evoked_MIN_axis.csv',
3190 min_evoked_position);
3191
3192         evoked_cal_diff_intensity =
3193 evoked_cal_max_intensity - evoked_cal_min_intensity;
3194         diff_max_evoked_intensity =
3195 max(max(evoked_cal_diff_intensity));
3196         diff_min_evoked_intensity =
3197 min(min(evoked_cal_diff_intensity));
3198         csvwrite('all_evoked_difference.csv',
3199 evoked_cal_diff_intensity);
3200
3201         figure
3202         subplot(2, 2, 1)
3203         plot(evoked_cal_max_intensity, 'Linewidth', 0.5)
3204         hold on
3205         p1 = plot(each_evoked_max_intensity, 'r',
3206 'Linewidth', 1);
3207         plot([last_avg_num last_avg_num],
3208 [evoked_cal_max_min evoked_cal_max_max], 'k:', 'Linewidth', 1)
3209         hold off
3210         ylim([evoked_cal_max_min evoked_cal_max_max])
3211         legend(p1, 'AVG', 'Location', 'northeast')
3212         xticks(0:5:12*5)
3213         xlabel('Time (s)'), ylabel('Intensity (normalized
3214 to baseline)')
3215         set(gca, 'FontSize', 6)
3216
3217         xticklabels({'0', '0.75', '1.5', '2.25', '3.0', '3.75', '4.5', '5.2
3218 5', '6.0', '6.75', '7.5', '8.25', '9.0'})
3219         title('Max variation in each trials')
3220
3221         subplot(2, 2, 2)
3222         plot(evoked_cal_min_intensity, 'Linewidth', 0.5)
3223         hold on
3224         p2 = plot(each_evoked_min_intensity, 'b',
3225 'Linewidth', 1);
3226         plot([last_avg_num last_avg_num],
3227 [evoked_cal_min_min evoked_cal_min_max], 'k:', 'Linewidth', 1)
3228         hold off
3229         ylim([evoked_cal_min_min evoked_cal_min_max])
3230
3231         legend(p2, 'AVG', 'Location', 'northeast')
3232         xticks(0:5:12*5)
3233         xlabel('Time (s)'), ylabel('Intensity (normalized
3234 to baseline)')
3235         set(gca, 'FontSize', 6)
3236
3237         xticklabels({'0', '0.75', '1.5', '2.25', '3.0', '3.75', '4.5', '5.2
3238 5', '6.0', '6.75', '7.5', '8.25', '9.0'})
3239         title('Min variation in each trials')
3240
3241         subplot(2, 2, [3 4])
3242         plot(evoked_cal_diff_intensity, 'Linewidth', 0.5)
3243         hold on
3244         plot(avg_evoked_peak_diff, 'k', 'Linewidth', 1)
3245         plot([last_avg_num last_avg_num],
3246 [diff_min_evoked_intensity diff_max_evoked_intensity], 'k:',
3247 'Linewidth', 1)
3248         hold off
3249         ylim([diff_min_evoked_intensity
3250 diff_max_evoked_intensity])
3251         legend('Trial1', 'Trial2', 'Trial3', 'Trial4',
3252 'Trial5', 'Trial6', 'Trial7', 'Trial8', 'AVG', 'Location',
3253 'eastoutside')
3254         xticks(0:5:12*5)
3255         xlabel('Time (s)'), ylabel('Intensity (normalized
3256 to baseline)')
3257         set(gca, 'FontSize', 6)
3258
3259         xticklabels({'0', '0.75', '1.5', '2.25', '3.0', '3.75', '4.5', '5.2
3260 5', '6.0', '6.75', '7.5', '8.25', '9.0'})
3261         title('Difference variation in each trials')
3262
3263         figure_name = 'All_evoked_peak_intensity';
3264         eval(['print -dtiff -r300 ./' figure_name '.tif']);
3265     end
3266
3267     clear evoked_cal_max_intensity
3268     evoked_cal_min_intensity avg_evoked_peak_diff
3269
3270     %For Row data
3271     for l = 1 : each_images
3272         k = 0;
3273         for i = 1 : Xpix
3274             Xpix2 = i + cal_box_pix - 1;
3275             if Xpix2 >= Xpix
3276                 Xpix2 = Xpix2 - k;
3277                 k = k + 1;
3278             end
3279             m = 0;
3280             for j = 1 : Ypix
3281                 Ypix2 = j + cal_box_pix - 1;
3282                 if Ypix2 >= Ypix
3283                     Ypix2 = Ypix2 - m;
3284                     m = m + 1;
3285                 end
3286                 cal_box_size = (Xpix2 - i + 1) * (Ypix2 -
3287 j + 1);
3288                 ALL_cal_2(i, j, l, :) =
3289 mean(reshape(ALL_Image_Matrix_2(i : Xpix2, j : Ypix2, l, :),...
3290 [cal_box_size, num_trials]), 1);
3291             end
3292         end
3293     end
3294     if avg_evoked_peak_cal > 0
3295
3296         cal_box_size_max = (Xax_max_re - Xax_max + 1) *
3297 (Yax_max_re - Yax_max + 1);
3298         cal_box_size_min = (Xax_min_re - Xax_min + 1) *
3299 (Yax_min_re - Yax_min + 1);
3300
3301         for l = 1 : num_trials
3302             evoked_cal_max_intensity(:, l) =
3303 mean(reshape(ALL_cal_2(Xax_max : Xax_max_re, Yax_max :
3304 Yax_max_re, :, l),...
3305 [cal_box_size_max, num_trials]), 1);
3306             evoked_cal_min_intensity(:, l) =
3307 min(min(evoked_cal_max_intensity));
3308             evoked_cal_min_min =
3309 min(min(evoked_cal_min_intensity));
3310
3311         end
3312     end

```

```

3311 [cal_box_size_max, each_images], 1);
3312     evoked_cal_min_intensity(:, l) =
3313 mean(reshape(ALL_cal_2(Xax_min : Xax_min_re, Yax_min :
3314 Yax_min_re, :, l),...
3315 [cal_box_size_min, each_images]), 1);
3316     end
3317
3318     avg_cal_max_intensity =
3319 mean(evoked_cal_max_intensity, 2);
3320 avg_cal_min_intensity =
3321 mean(evoked_cal_min_intensity, 2);
3322
3323
3324     evoked_cal_max_max =
3325 max(max(evoked_cal_max_intensity));
3326     evoked_cal_max_min =
3327 min(min(evoked_cal_max_intensity));
3328     evoked_cal_min_max =
3329 max(max(evoked_cal_min_intensity));
3330     evoked_cal_min_min =
3331 min(min(evoked_cal_min_intensity));
3332
3333     csvwrite('all_evoked_MAX_intensity_raw.csv',
3334 evoked_cal_max_intensity);
3335     csvwrite('all_evoked_MAX_axis_raw.csv',
3336 max_evoked_position);
3337
3338     csvwrite('all_evoked_MIN_intensity_raw.csv',
3339 evoked_cal_min_intensity);
3340     csvwrite('all_evoked_MIN_axis_raw.csv',
3341 min_evoked_position);
3342
3343     evoked_cal_diff_intensity =
3344 evoked_cal_max_intensity - evoked_cal_min_intensity;
3345     avg_cal_diff_intensity =
3346 mean(evoked_cal_diff_intensity, 2);
3347     diff_max_evoked_intensity =
3348 max(max(evoked_cal_diff_intensity));
3349     diff_min_evoked_intensity =
3350 min(min(evoked_cal_diff_intensity));
3351     csvwrite('all_evoked_difference_raw.csv',
3352 evoked_cal_diff_intensity);
3353
3354     figure
3355 subplot(2,2,1)
3356 plot(evoked_cal_max_intensity, 'Linewidth', 0.5)
3357 hold on
3358 p1 = plot(avg_cal_max_intensity, 'r', 'Linewidth',
3359 1);
3360 plot([last_avg_num last_avg_num],
3361 [evoked_cal_max_min evoked_cal_max_max], 'k:', 'Linewidth', 1)
3362 hold off
3363 ylim([evoked_cal_max_min evoked_cal_max_max])
3364 legend(p1, 'AVG', 'Location', 'northeast')
3365 xticks(0:5:12*5)
3366 xlabel('Time (s)'), ylabel('Intensity')
3367 set(gca, 'FontSize', 6)
3368
3369 xticklabels({'0', '0.75', '1.5', '2.25', '3.0', '3.75', '4.5', '5.2
3370 5', '6.0', '6.75', '7.5', '8.25', '9.0'})
3371 title('Max intensity in each trials')
3372
3373 subplot(2,2,2)
3374 plot(evoked_cal_min_intensity, 'Linewidth', 0.5)
3375 hold on
3376 p2 = plot(avg_cal_min_intensity, 'b', 'Linewidth',
3377 1);
3378 plot([last_avg_num last_avg_num],
3379 [evoked_cal_min_min evoked_cal_min_max], 'k:', 'Linewidth', 1)
3380 hold off
3381 ylim([evoked_cal_min_min evoked_cal_min_max])
3382 legend(p2, 'AVG', 'Location', 'northeast')
3383 xticks(0:5:12*5)
3384 xlabel('Time (s)'), ylabel('Intensity')
3385 set(gca, 'FontSize', 6)
3386
3387 xticklabels({'0', '0.75', '1.5', '2.25', '3.0', '3.75', '4.5', '5.2
3388 5', '6.0', '6.75', '7.5', '8.25', '9.0'})
3389 title('Min intensity in each trials')
3390
3391 subplot(2,2,[3 4])
3392 plot(evoked_cal_diff_intensity, 'Linewidth', 0.5)
3393 hold on
3394 plot(avg_cal_diff_intensity, 'k', 'Linewidth', 1)
3395 plot([last_avg_num last_avg_num],
3396 [diff_min_evoked_intensity diff_max_evoked_intensity], 'k:',
3397 'Linewidth', 1)
3398 hold off
3399 ylim([diff_min_evoked_intensity
3400 diff_max_evoked_intensity])
3401 legend('Trial1', 'Trial2', 'Trial3', 'Trial4',
3402 'Trial5', 'Trial6', 'Trial7', 'Trial8', 'AVG', 'Location',
3403 'eastoutside')
3404
3405     xticks(0:5:12*5)
3406     xlabel('Time (s)'), ylabel('Intensity')
3407     set(gca, 'FontSize', 6)
3408
3409     xticklabels({'0', '0.75', '1.5', '2.25', '3.0', '3.75', '4.5', '5.2
3410 5', '6.0', '6.75', '7.5', '8.25', '9.0'})
3411     title('Difference intensity in each trials')
3412
3413     figure_name = 'All_evoked_peak_intensity_raw';
3414     eval(['print -dtiff -r300 ./' figure_name '.tif']);
3415     end
3416 close all
3417 end
3418
3419 for j = 1 : num_trials
3420
3421     k = 1;
3422
3423     while k <= each_images
3424
3425         for l = 1 : num_figures
3426             figure(l)
3427
3428                 for m = 1 : 10
3429
3430                     if k > each_images
3431                         k = 1;
3432                     else
3433                         subplot_tight(2, 5, m, .05)
3434                         imagesc(ALL_cal(:, :, k, j), clim)
3435                         set(gca, 'XTick', [], 'YTick', [])
3436                         colormap(jet), axis square,
3437 colorbar('horiz')
3438
3439                             title(['Image No ', num2str(k)])
3440
3441                         k = k + 1;
3442                     end
3443                 end
3444             if (Cal_box > 0) && (LR_avg_trial == 0)
3445                 figure_name = ['Trial_box_', num2str(j), '_
3446 num2str(l)'];
3447             elseif (Cal_box > 0) && (LR_avg_trial > 0)
3448                 figure_name = ['Trial_LR_', num2str(j), '_
3449 num2str(l)'];
3450             else
3451                 figure_name = ['Trial_', num2str(j), '_
3452 num2str(l)'];
3453             end
3454             eval(['print -dtiff -r300 ./' figure_name '.tif']);
3455         end
3456     end
3457
3458     k = 1;
3459
3460     figure
3461     while k <= each_images
3462
3463         if k > each_images
3464             k = 1;
3465         else
3466             subplot_tight(6, 10, k, .01);
3467             imagesc(ALL_cal(:, :, k, j), clim)

```

```

3469         daspect([1 1 1])
3470         set(gca,'XTick',[],'YTick',[])
3471
3472         colormap(jet), axis square
3473         title(['¥fontsize[5] Image No ', num2str(k)])
3474         k = k + 1;
3475     end
3476 end
3477
3478 if (Cal_box > 0) && (LR_avg_trial == 0)
3479     figure_name = ['All_Trial_box_', num2str(j)];
3480 elseif (Cal_box > 0) && (LR_avg_trial > 0)
3481     figure_name = ['All_Trial_LR_', num2str(j)];
3482 else
3483     figure_name = ['All_Trial_', num2str(j)];
3484 end
3485
3486 eval(['print -dtiff -r300 ./' figure_name '.tif']);
3487 end
3488
3489 figure
3490 p = 1;
3491 for j = 1 : num_trials
3492
3493     for k = first_avg_num : first_avg_num + 14
3494
3495         subplot_tight(8, 15, p, .003);
3496         imagesc(ALL_cal(:, :, k, j), clims)
3497         daspect([1 1 1])
3498         set(gca,'XTick',[],'YTick',[])
3499
3500         colormap(jet), axis square
3501         title(['¥fontsize[4] Image No ', num2str(k)])
3502         p = p + 1;
3503     end
3504 end
3505
3506 if (Cal_box > 0) && (LR_avg_trial == 0)
3507     figure_name = 'Evokedpoints_All_Trial_box';
3508 elseif (Cal_box > 0) && (LR_avg_trial > 0)
3509     figure_name = 'Evokedpoints_All_Trial_LR';
3510 else
3511     figure_name = 'Evokedpoints_All_Trial';
3512 end
3513
3514 eval(['print -dtiff -r300 ./' figure_name '.tif']);
3515
3516 cd ..
3517 close all
3518 end
3519 cd ..
3520
3521 if ROI_detection > 0
3522     cd ..
3523 end
3524
3525 delete previous_data.mat
3526 save('previous_data', 'data_cell')
3527
3528 clear
3529 end
3530
3531 %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
3532 %ROIのコールバック関数
3533
3534 function selection(src, event)
3535     val_num = rsize_val.Value;
3536     str = rsize_val.String;
3537     str{val_num};
3538     val = str2double(str{val_num});
3539     r_radii = (val / 1000) * 145;
3540     r_tex = val;
3541 end
3542
3543 function roi_number(~, ~)
3544     r_roi_num = r_num;
3545 end
3546
3547

```

```

3548 function txt = displayCoordinates(~, info)
3549     r_x = info.Position(1);
3550     r_y = info.Position(2);
3551     txt = ['[X, Y]: [ ', num2str(r_x), ', ', num2str(r_y)
3552     ']' ];
3553     set(x_ax, 'string', num2str(r_x))
3554     set(y_ax, 'string', num2str(r_y))
3555
3556 if r_i <= r_roi_num
3557     r_centers = [r_x r_y];
3558     viscircles(r_centers, r_radii, 'Color', 'k',
3559     'LineWidth', 0.5, ...
3560     'EnhanceVisibility', false);
3561     r_i = r_i + 1;
3562 end
3563 end
3564
3565 function callbackfn(hObject, eventdata)
3566     r_num = get(b, 'Value');
3567     r_num = round(r_num);
3568     set(bl4, 'string', num2str(r_num))
3569     set(Im_num_1, 'string', num2str(r_num))
3570
3571     subplot('Position', r_pos1);
3572     imagesc(Avg_box_cal(:, :, r_num), clims);
3573     xticks([])
3574     yticks([])
3575     xlim([0 Xpix])
3576     ylim([0 Ypix])
3577     colormap(jet), axis square,
3578     cb = colorbar('eastoutside');
3579     set(cb, 'position', [0.75 0.2 0.04 0.2])
3580
3581     subplot('Position', r_pos2);
3582     imagesc(Avg_box_cal(:, :, r_num), clims);
3583     xticks([])
3584     yticks([])
3585     xlim([0 Xpix])
3586     ylim([0 Ypix])
3587     axis square
3588
3589 if r_num == 60
3590     set(Im_num_tx_2, 'Visible', 'off')
3591     set(Im_num_2, 'Visible', 'off')
3592     set(back_1, 'Visible', 'on')
3593 else
3594     set(Im_num_tx_2, 'Visible', 'on')
3595     set(Im_num_2, 'string', num2str(r_num+1),
3596     'Visible', 'on')
3597     subplot('Position', r_pos3);
3598     imagesc(Avg_box_cal(:, :, r_num+1), clims);
3599     xticks([])
3600     yticks([])
3601     xlim([0 Xpix])
3602     ylim([0 Ypix])
3603     axis square
3604     set(back_1, 'Visible', 'off')
3605 end
3606
3607
3608 if r_num >= 59
3609     set(Im_num_tx_3, 'Visible', 'off')
3610     set(Im_num_3, 'Visible', 'off')
3611     set(back_2, 'Visible', 'on')
3612 else
3613     set(Im_num_tx_3, 'Visible', 'on')
3614     set(Im_num_3, 'string', num2str(r_num+2),
3615     'Visible', 'on')
3616     subplot('Position', r_pos4);
3617     imagesc(Avg_box_cal(:, :, r_num+2), clims);
3618     xticks([])
3619     yticks([])
3620     xlim([0 Xpix])
3621     ylim([0 Ypix])
3622     axis square
3623     set(back_2, 'Visible', 'off')
3624 end
3625
3626

```

```

3627     if r_num >= 2
3628         set(Im_num_tx_4, 'Visible', 'on')
3629         set(Im_num_4, 'string', num2str(r_num-1),
3630 'Visible', 'on')
3631         set(back_3, 'Visible', 'off')
3632
3633         subplot('Position', r_pos5);
3634         imagesc(Avg_box_cal(:, :, r_num-1), clims);
3635         xticks([])
3636         yticks([])
3637         xlim([0 Xpix])
3638         ylim([0 Ypix])
3639         axis square
3640     else
3641         set(Im_num_tx_4, 'Visible', 'off')
3642         set(Im_num_4, 'Visible', 'off')
3643         set(back_3, 'Visible', 'on')
3644     end
3645
3646     if r_num >= 3
3647         set(Im_num_tx_5, 'Visible', 'on')
3648         set(Im_num_5, 'string', num2str(r_num-2),
3649 'Visible', 'on')
3650         set(back_4, 'Visible', 'off')
3651
3652         subplot('Position', r_pos6);
3653         imagesc(Avg_box_cal(:, :, r_num-2), clims);
3654         xticks([])
3655         yticks([])
3656         xlim([0 Xpix])
3657         ylim([0 Ypix])
3658         axis square
3659     else
3660         set(Im_num_tx_5, 'Visible', 'off')
3661         set(Im_num_5, 'Visible', 'off')
3662         set(back_4, 'Visible', 'on')
3663     end
3664
3665     r_i = 1;
3666     refresh(r_f)
3667 end
3668
3669 function close_figure(~, ~)
3670     close all
3671 end
3672
3673 end
3674
3675
3676 %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
3677 %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
3678 function varargout=subplot_tight(m, n, p, margins, varargin)
3679 % subplot_tight
3680 % A subplot function substitute with margins user tunable
3681 parameter.
3682 %
3683 %% Syntax
3684 % h=subplot_tight(m, n, p);
3685 % h=subplot_tight(m, n, p, margins);
3686 % h=subplot_tight(m, n, p, margins, subplotArgs...);
3687 %
3688 %% Description
3689 % Our goal is to grant the user the ability to define the margins
3690 between neighbouring
3691 % subplots. Unfortunately Matlab subplot function lacks this
3692 functionality, and the
3693 % margins between subplots can reach 40% of figure area, which
3694 is pretty lavish. While at
3695 % the beginning the function was implemented as wrapper function
3696 for Matlab function
3697 % subplot, it was modified due to axes deletion resulting from
3698 what Matlab subplot
3699 % detected as overlapping. Therefore, the current
3700 implementation makes no use of Matlab
3701 % subplot function, using axes instead. This can be problematic,
3702 as axis and subplot
3703 % parameters are quite different. Set isWrapper to "True" to
3704 return to wrapper mode, which
3705 % fully supports subplot format.
3706 %
3707 %% Input arguments (defaults exist):
3708 % margins- two elements vector [vertical, horizontal] defining
3709 the margins between
3710 % neighbouring axes. Default value is 0.04
3711 %
3712 %% Output arguments
3713 % same as subplot- none, or axes handle according to function
3714 call.
3715 %
3716 %% Issues & Comments
3717 % - Note that if additional elements are used in order to be
3718 passed to subplot, margins
3719 % parameter must be defined. For default margins value use
3720 empty element- [].
3721 % -
3722 %
3723 %% Example
3724 % close all;
3725 % img=imread('peppers.png');
3726 % figSubplotH=figure('Name', 'subplot');
3727 % figSubplotTightH=figure('Name', 'subplot_tight');
3728 % nElems=17;
3729 % subplotRows=ceil(sqrt(nElems)-1);
3730 % subplotRows=max(1, subplotRows);
3731 % subplotCols=ceil(nElems/subplotRows);
3732 % for iElem=1:nElems
3733 %     figure(figSubplotH);
3734 %     subplot(subplotRows, subplotCols, iElem);
3735 %     imshow(img);
3736 %     figure(figSubplotTightH);
3737 %     subplot_tight(subplotRows, subplotCols, iElem, [0.0001]);
3738 %     imshow(img);
3739 % end
3740 %
3741 %% See also
3742 % - subplot
3743 %
3744 %% Revision history
3745 % First version: Nikolay S. 2011-03-29.
3746 % Last update: Nikolay S. 2012-05-24.
3747 %
3748 % *List of Changes:*
3749 % 2012-05-24
3750 % Non wrapping mode (based on axes command) added, to deal with
3751 an issue of disappearing
3752 % subplots occurring with massive axes.
3753
3754 %% Default params
3755 isWrapper=false;
3756 if (nargin<4) || isempty(margins)
3757     margins=[0.04, 0.04]; % default margins value- 4% of figure
3758 end
3759 if length(margins)==1
3760     margins(2)=margins;
3761 end
3762
3763 %note n and m are switched as Matlab indexing is column-wise,
3764 while subplot indexing is row-wise :(
3765 [subplot_col, subplot_row]=ind2sub([n,m], p);
3766
3767
3768 height=(1-(m+1)*margins(1))/m; % single subplot height
3769 width=(1-(n+1)*margins(2))/n; % single subplot width
3770
3771 % note subplot supports vector p inputs- so a merged subplot of
3772 higher dimensions will be created
3773 subplot_cols=1+max(subplot_col)-min(subplot_col); % number of
3774 column elements in merged subplot
3775 subplot_rows=1+max(subplot_row)-min(subplot_row); % number of
3776 row elements in merged subplot
3777
3778 merged_height=subplot_rows*( height+margins(1) )-
3779 margins(1); % merged subplot height
3780 merged_width= subplot_cols*( width +margins(2) )-
3781 margins(2); % merged subplot width
3782
3783 merged_bottom=(m-max(subplot_row))*(height+margins(1))
3784 +margins(1); % merged subplot bottom position

```

```

3785 merged_left=min(subplot_col)*(width+margins(2))-width;
3786 % merged subplot left position
3787 pos=[merged_left, merged_bottom, merged_width, merged_height];
3788
3789
3790 if isWrapper
3791     h = subplot(m, n, p, varargin{:}, 'Units', 'Normalized',
3792 'Position', pos);
3793 else
3794     h=axes('Position', pos, varargin{:});
3795 end
3796
3797 if nargin==1
3798     varargout=h;
3799 end
3800
3801 end
3802 %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
3803 %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
3804
3805 %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
3806 %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
3807 function [ha, pos] = tight_subplot(Nh, Nw, gap, marg_h, marg_w)
3808
3809 % tight_subplot creates "subplot" axes with adjustable gaps and
3810 margins
3811 %
3812 % [ha, pos] = tight_subplot(Nh, Nw, gap, marg_h, marg_w)
3813 %
3814 %   in:  Nh      number of axes in height (vertical direction)
3815 %        Nw      number of axes in width (horizontal direction)
3816 %        gap     gaps between the axes in normalized units (0..1)
3817 %              or [gap_h gap_w] for different gaps in height
3818 %              and width
3819 %        marg_h  margins in height in normalized units (0..1)
3820 %              or [lower upper] for different lower and upper
3821 margins
3822 %        marg_w  margins in width in normalized units (0..1)
3823 %              or [left right] for different left and right
3824 margins
3825 %
3826 %   out: ha      array of handles of the axes objects
3827 %              starting from upper left corner, going row-wise
3828 as in
3829 %              subplot
3830 %        pos     positions of the axes objects
3831 %
3832 % Example: ha = tight_subplot(3,2,[.01 .03],[.1 .01],[.01 .01])
3833 %           for ii = 1:6; axes(ha(ii)); plot(randn(10,ii)); end
3834 %           set(ha(1:4),'XTickLabel',''); set(ha,'YTickLabel','')
3835
3836 % Pekka Kumpulainen 21.5.2012 @tut.fi
3837 % Tampere University of Technology / Automation Science and
3838 Engineering
3839
3840
3841 if nargin<3; gap = .02; end
3842 if nargin<4 || isempty(marg_h); marg_h = .05; end
3843 if nargin<5; marg_w = .05; end
3844
3845 if numel(gap)==1
3846     gap = [gap gap];
3847 end
3848 if numel(marg_w)==1
3849     marg_w = [marg_w marg_w];
3850 end
3851 if numel(marg_h)==1
3852     marg_h = [marg_h marg_h];
3853 end
3854
3855 axh = (1-sum(marg_h)-(Nh-1)*gap(1))/Nh;
3856 axw = (1-sum(marg_w)-(Nw-1)*gap(2))/Nw;
3857
3858 py = 1-marg_h(2)-axh;
3859
3860 % ha = zeros(Nh*Nw,1);
3861 ii = 0;
3862 for ih = 1:Nh
3863     px = marg_w(1);

```

```

3864
3865     for ix = 1:Nw
3866         ii = ii+1;
3867         ha(ii) = axes('Units','normalized', ...
3868 'Position',[px py axw axh], ...
3869 'XTickLabel','', ...
3870 'YTickLabel','');
3871         px = px+axw+gap(2);
3872     end
3873     py = py-axh-gap(1);
3874 end
3875 if nargin > 1
3876     pos = get(ha,'Position');
3877 end
3878 ha = ha(:);
3879 end
3880 %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
3881 %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

```