

LECTURES

「ラット大脳皮質体性感覚野からのin vivoパッチクランプ記録法」

九州大学大学院医学研究院 統合生理学分野

土井 篤 水野 雅晴
古江 秀昌 吉村 恵

I はじめに

大脳皮質の単一細胞レベルにおける電気生理学的研究は、主に細胞外から細胞の興奮性を記録する細胞外記録法と微細なガラス電極を直接細胞に刺入し、その細胞のシナプス応答を記録する細胞内記録法によって多くのことが明らかにされてきた。しかし細胞外記録法は比較的容易に細胞の興奮性を記録することが可能であるが、興奮度は発火頻度として記録され、シナプス応答に関する詳細な解析は困難である。一方、細胞内記録法はシナプス応答の詳細な分析が可能であるが、ガラス電極を細胞内に刺入して記録を行うため、in vivoにおいては、小型の細胞からの安定した記録は殆ど不可能である。また、比較的高抵抗の電極を用いるため膜電位固定下でのシナプス電流解析は困難である。しかし、大脳皮質錐体細胞は比較的大きな細胞体を有する点で細胞内記録法の適用があり、近年でもその記録法を用いた研究がなされている [1]。

1981年Hamillら [2] によって単離細胞に対するパッチクランプ法が初めて報告され、その後ラットの脳皮質 slice 標本においてもパッチクランプ法を用いた報告がなされるようになってきた [3]。slice パッチクランプ法は細胞内記録法と比較し、小型の細胞から膜電位固定下での記録が出来るため、シナプス応答をイオンチャネルレベルでより詳細に解析できるという利点があり、生理学者・神経科学者の間で急速にその導入が進んだ。しかしながら slice 標本では外からの多くのシナプス入力切断されるため、シナプス応答の機能的な解析には限界があった。その欠点を補う

ため1991年Peiら [4] はネコ in vivo 標本からのパッチクランプ法を用いた研究を初めて報告した。その後、ネコの視覚野での in vivo パッチクランプ法を用いた研究報告が相次いだ [5-7]。1998年になるとラット [8]、マウス [9] でも in vivo パッチクランプ法による報告がなされ、特にラットについては第1次体性感覚野 [10, 11]、視覚野 [12] からの記録も行われた。しかしラット大脳皮質での in vivo パッチクランプ法による記録は、髭からの入力を受けるバレル皮質や視覚野での研究が主であり、その他の部位での解析は少ない。我々の教室では1999年に脊髄膠様質（第II層）細胞からの in vivo パッチクランプ法の開発に成功し、感覚情報、特に痛覚の情報処理に関する知見を発表してきた [13, 14]。末梢から直接入力を受ける脊髄後角ニューロンは、その痛覚情報を統合修飾し、上位中枢に伝達する役割を担っているが、その痛覚情報が第1次体性感覚野で最終的にどのように処理されているかを知るとは、幻肢痛などを含む慢性疼痛の発生機序を知る上で重要である。そこで我々は、脊髄での in vivo パッチクランプ法の経験を生かし、第1次体性感覚野ニューロンに本方法を適用し、自発的な興奮性及び抑制性のシナプス応答、また末梢刺激による第1次体性感覚野ニューロンのシナプス応答の解析を行っている。本稿では第1次体性感覚野ニューロンからの in vivo パッチクランプ法の実際を詳細に述べ、今までに得られた結果について簡単に紹介したい。

II 第1次体性感覚野からのin vivoパッチクランプ法の実際

1. in vivo 標本の作成法

3～6週令のSDラットを用い、ウレタンの腹腔内投与（1.5g/kg）によって麻酔を行う。気管切開を行った後、気管にYチューブを挿入固定し、人工呼吸器（ハーバード社製 Model683）で呼吸をコントロールする（130～140回/分）。その際、挿入するチューブは出来るだけ太いもの、即ち気管の内径よりわずかに細い程度のものを用いる。その理由は細いチューブではチューブ自体が気管から外れやすくなり、また長時間の気管内留置により気管内粘液や血液がチューブ内腔を狭め、呼吸不全に陥る可能性があるからである。呼吸による胸郭の動きを抑制するため、気管切開に引き続き両側の気胸を行う。気胸部位にはミネラルオイルを添加し、乾燥と呼吸による肺の損傷を極力抑える。実験初期においては、気胸下での人工呼吸は安定した記録を行うためには必須と考えていた。しかしながら最近人工呼吸を行わない状況下、即ち自発呼吸の状態でも長期に渡ってラットを良好な状態に維持することができ、また安定した記録を得ることが可能であることが分かった。そこで現在は多くの場合人工呼吸を行わず、自発呼吸下で実験を行っている。人工呼吸を用いず安定した記録を得る上でのポイントは、ラットへの侵襲を出来る限り少なくし、頭部の固定を確実に行う事である。そのため麻酔深度や体温、および末梢循環状態のチェックを頻回に行う事である。体液の滲出や出血、および麻酔深度が深すぎると全身状態の悪化に伴い細胞の状態が変化し、安定した記録が困難になる。麻酔にはラット重量100gあたり0.62mlのウレタン水溶液（ウレタン濃度250mg/ml）を腹腔内に投与して行う。麻酔深度は耳および後肢へのピンチ刺激による反応、髭の自発運動の有無と角膜反射を指標に行っている。また全身状態は直腸温や後肢足底部皮膚の循環状態を常時チェックして実験を進めている。次にラットを脳固定装置にセットするが、最近では更に固定を確実にするためクランプ器具を用いて頭蓋後部の固定も併せて行っている。ラットを脳固

定装置にセットした後、手術用メスで頭部皮膚を切開する。出血を極力抑えるためにアドレナリン添加キシロカイン液を筋膜に覆われた頭蓋表面にかける。しばらく時間を置いた後、筋膜を切開し頭蓋骨を露出させる。その間頭蓋縫合線からの出血が観察されるが、綿等を用いて止血を行う。縫合線に油性マジックを用いてマーキングを行った後、一側の頭頂部に2.5mlのシリンジを用いて作製した円筒をボンドで頭蓋骨に固定し（図1）、シリンジ内の体性感覚野に相当する頭蓋骨を切り取り、脳表面を露出させ酸素負荷した38℃のKrebs液で灌流を行う。試薬を投与する場合にはこの灌流チャンバー内に流し、脳表面へと浸透させる。頭蓋骨の切除にはリユーター（Model C-106 Kantokiki）を用いる。頭蓋骨をKrebs液で冷やしながらゆっくりと削って薄くした後、ピンセットを用いて薄くなった頭蓋部を切除するとその下に硬膜を観察することができる。硬膜をピンセットを用いて開いた後、クモ膜と軟膜には手を加えることなくパッチ電極を第1次体性感覚野に刺入させていく。

2. パッチクランプ記録法

パッチ電極は外径1.5 mm、内径1.12 mmのborosilicate（WPI MTW150F-4）を使用する。電極はP-97（Sutter instrument社）を用い、slice標本からのパッチクランプ記録に比べて長いテーパーを持つ電極を使用する。その理由として、深部に存在する細胞から記録を行うため、テーパーの短い電極では刺入の際に皮質表層細胞への機械的ダメージが大きいためである。電極の先端抵抗は5～8MΩのものを使用する。電極内液はEPSCの記録時にはK gluconate 135, KCl5, CaCl₂ 0.5, MgCl₂ 2, EGTA 5, HEPES 5, Mg-ATP 5（mM）を用い、IPSC記録時にはK gluconateの代わりにCs₂SO₄ 110を用い、これにTEA 5, CaCl₂ 0.5, MgCl₂ 2, EGTA 5, HEPES 5, Mg-ATP 5を加えて使用する。Cs⁺とTEAを用いる理由はK⁺チャネルのブロックによって膜電位0mVにおける電位固定を容易にし、ノイズを減少させてIPSCの解析を行うためである。また電気生理学的実験後に記録細胞の同定を行う目

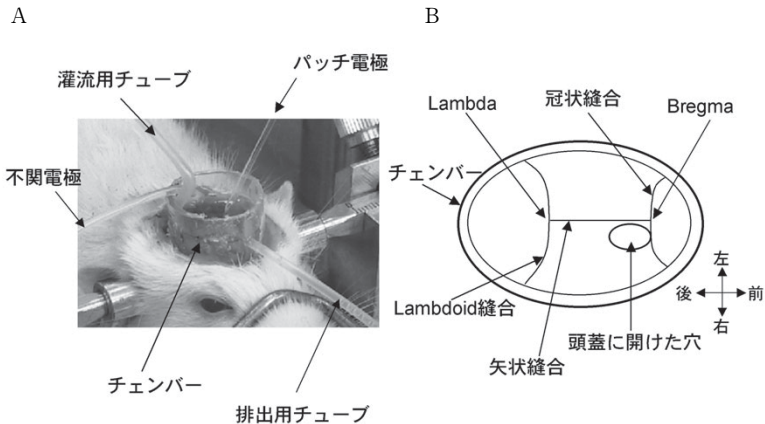


図1. ラット頭蓋に装着したチェンバーの写真と各縫合線、頭蓋に開けた穴との関係

A：2.5 ml用シリンジの一部を切ったものをラット頭蓋上部に取り付けたところ。本実験では頭蓋後部の固定は行っていない。

B：各縫合線と頭蓋に開けた穴との関係を模式的に示したもの。

的で、細胞内液には0.2%の neurobiotin を加えている。電極ホルダーは水圧式の1次元マニピュレーター (MHW-4, Narishige) に固定し、さらに機械式の粗動マニピュレーター (MP-2, Narishige) に固定している。電極を水平面から約60度の角度で表面の血管を避け、刺入させる。その際10mVの短い矩形波パルスを電極に与え、電極先端抵抗の変化をモニターする。電極には20mlシリンジを用いて強めに陽圧をかけ (300～400mmHg)、電極先端への膜破片などの付着を少なくしておく。クモ膜に電極が接触すると矩形波パルスの振幅が減少するのを観察することができる。そのまま先に進めると、矩形波パルスが膜に接触する前の状態に戻ることが確認できる。次に血管拍動由来と考えられる律動的な揺れが矩形波パルスに加わる。これが大脳皮質内に電極が入ったことの指標である。まず機械式の粗動マニピュレーターを用い電極を約750 μ m進め、その次に水圧式の1次元微動マニピュレーターで電極を刺入していく。目標とする深さまで機械式マニピュレーターで電極を進める理由は、水圧式微動マニピュレーターに比較し、機械式のそれはドリフトを最小限に抑えることができるからである。また電極を刺入する深さについては、以下のような

理由による。即ち視床から大脳皮質への直接入力には主に大脳皮質の第III層～V層に投射すると言われている [15]。実際に各層の脳表面からの深さを同週令のラット大脳皮質スライス標本を用いて計測すると、第III～IV層は約750 μ mの深さにあり、この値はBrechtら [10] の報告ともほぼ一致したものである。電極先端が細胞に接触すると、矩形波パルスの振幅が減少するのを確認することができる。元の矩形波パルスの振幅になるまで電極を戻し、再度約20～30%矩形波パルス振幅が減少するところまで電極を進め、シリンジに加えた陽圧を解除することによってギガオームシールを行う。ギガオームシールが完成した後、膜電位を約-70mVに固定する。Leak currentが少なくとも10pA以下になった時点でシリンジに陰圧を加え、whole-cell modeにする。ギガオームシールしてから whole-cell patch するには、経験的に約1～3分ほど時間をおいたほうが良い。

III 第一次感覚野細胞からの記録

1. 自発的なシナプス応答

人工呼吸下で、大脳皮質から約800 μ mの深さの細胞から-70mVの膜電位固定下で記録した

sEPSC (spontaneous EPSC : 自発性 EPSC) を示す (図2A)．ベースラインは非常に安定しており，呼吸や血管拍動による基線の揺れは殆ど観察されなかった．但し，記録の状態が悪化した時には血管拍動に同期した膜電流の揺れが観察されることがあった．今までのところいくつかの細胞からは長時間に渡る記録 (最長7時間) ができ，脳表面からの薬剤投与による作用の検討も可能であった．しかし脳表層の細胞 ($100 \sim 300 \mu\text{m}$) と比較すると，脳深層の細胞に対する薬剤の作用は時間を要し，且つより高濃度の薬剤を用いる必要があった．図2の下図は別の細胞から記録した sIPSC (spontaneous IPSC : 自発性 IPSC) である (図2B)．この細胞は脳表面から1mmの深さに存在し， Cs^+ 内液を用いて膜電位 0mV で記録したものである．深部の細胞においては比較的 oscillation の少ない安定した記録が得られるが，浅層に存在する細胞では多くの場合，膜電流の oscillation が見られ，膜電流固定下ではバースト状に活動電位が惹起される細胞が認められた．図3は -70mV の保持電位で表層から $100 \mu\text{m}$ の比較的浅い層の細胞から記録した sEPSC である．膜電流は oscillation を示し，その平均周波数は約 1.2Hz であった．内向き電流のピークでは EPSC 様の電流の振れが認められた．そこで記録された sEPSC に対して $100 \mu\text{M}$ の CNQX を大脳表面に投与すると，oscillation はほぼ完全に抑制された (図3B)．以上のことから，この oscillation は幾つもの sEPSC が同期して入力し，加重されて起こった現象ではないかと考えられた．

2. 末梢刺激によって誘起されたシナプス応答

末梢刺激に対する大脳皮質の応答を記録した．図4は末梢刺激に対するバレル皮質のシナプス応答を示している．膜電位 -70mV の条件下で，記録した細胞と反対側の髭に触刺激を加えると，EPSC の頻度の著明な増加が認められた．この増加は他の部位の触刺激では見られなかった．

ラットの体性感覚野は前肢，後肢及び体幹に比し，顔面感覚の占めている割合が極めて大きく，とりわけ髭の一本一本に対応する大脳皮質細胞がコラム状に密集して存在していることは良く知ら

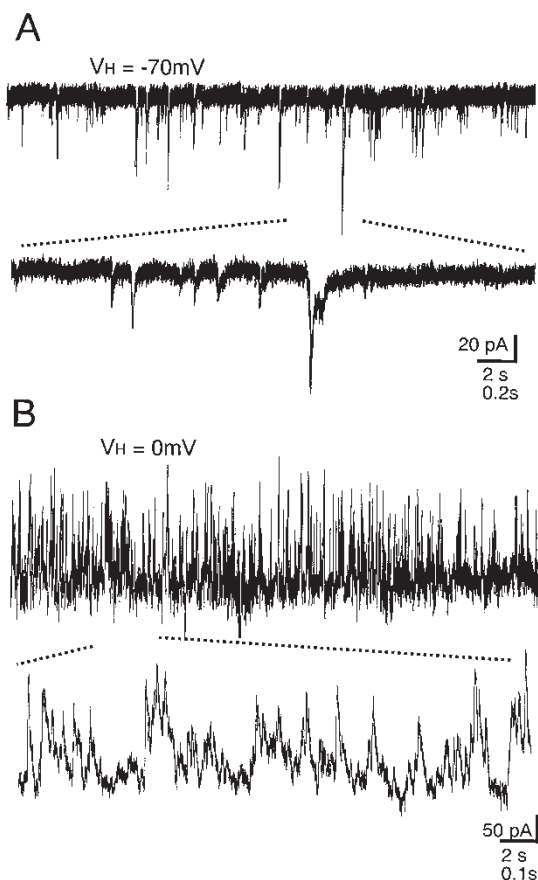


図2. 膜電位固定下における sEPSC と sIPSC
A : 膜電位 -70mV で記録した sEPSC. B : 膜電位 0mV で記録した sIPSC. A, B の下段は速い時間軸で記録したものを示す．

れている．その皮質細胞は樽のように密集していることからバレル皮質と呼ばれている [16]．今回髭に対して反応があった部位は Bregma と Lambda の間を結ぶ前 $1/3$ ，やや側方に位置する部分から記録されたものであり，これは大脳皮質における髭の体性感覚野に照らし合わせても，バレル皮質に相当する部位である [16]．一方，後肢からの入力を受ける感覚野は非常に狭い範囲に限局し，現在細胞外記録によって後肢から入力を受ける領域の特定を行っている所である．

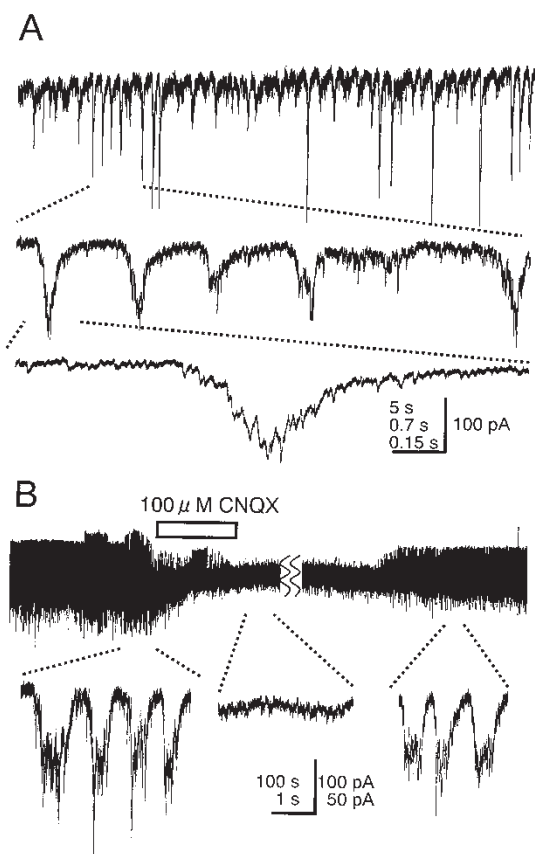


図3. 大脳皮質感覚野ニューロンで見られた oscillation と CNQX の作用.

A: 異なる時間軸で記録した oscillation を示す. Oscillation のピークには sEPSC の加重が見られる (最下段トレース).

B: 浅層で記録された細胞 (大脳皮質下約 100 μ m) に起こった oscillation に対する CNQX (100 μ M) の作用. Oscillation はほぼ完全に抑制されている.

IV 大脳皮質細胞から in vivo パッチクランプ記録を行う上での問題点

1. 脳の膨隆

時間経過と共に起こる頭蓋骨除去部でのある程度の脳の膨隆 (浮腫) は避けられない. 脳の膨隆は頭蓋部の一部の除去 (除圧) により, その除圧部分に脳圧が集中することによって起こる物理的なものと細胞へのダメージによる炎症に伴うものが推察される. 脳局所の圧力上昇は神経細胞, グリア細胞及び動脈循環に悪影響を及ぼす. この

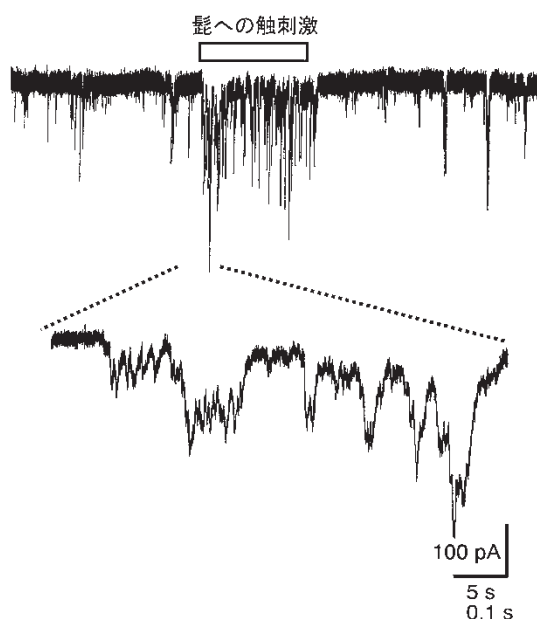


図4. 反対側の髭への触刺激に対する第1次体性感覚野細胞のシナプス応答
反対側の髭に触刺激を加えると sEPSC の振幅と頻度の著明な増加が観察された.

ような状況が長く持続すると安定したパッチクランプ記録を行うことは困難となってくる.

脳の局所膨隆を避けるためには大きく2つの方法があると考えられる. 1つはできるだけ頭蓋除去部分を大きくすること. もう1つは逆に頭蓋除去部分を小さくすることである. 前者は局所へ脳圧が集中することを避けるためであり, 後者は脳が膨隆することができない位に頭蓋除去部の面積を狭めるためである. また別の方法として硬膜を開かずに, そのままパッチ電極を脳内に刺入させることも考えられる. この場合, 問題はパッチ電極が硬膜を通過するか否かという点であるが, そのままではパッチ電極は通過しない. ラットの週令にも関係していると思われるが, 4~5週令のラットにおいて硬膜上からパッチ電極を刺入すると, 電極先端部の折れることが多く経験された. これを打開する方法として電極刺入部位の硬膜だけを最小限カットする方法が良いかもしれない. また最近 Zhu ら [12] は, 硬膜を柔らかくする

ために硬膜の上にコラゲナーゼ (Sigma) を染み込ませた濾紙を乗せ 20～30 分間処理し、patch 電極を硬膜上から脳内に刺入させる方法を発表している。我々の教室においても最近この方法に準じ、コラゲナーゼ (Clostridiopeptidase A, type I, Sigma) 処理による深層細胞の記録に成功している。但し、コラゲナーゼ処理は単に硬膜を柔らかくするばかりでなく、クモ膜下腔にある血管にも作用し、血管膜を脆弱にするようである。それは酵素処理後の操作によって血管が容易に破れてしまうことから推測される。大きな血管が一度破れると、止血にしばらく時間がかかり、パッチ電極刺入に際しても電極先端部の汚れにつながりやすい。また出血によって脳の循環状態にも悪影響を与える可能性も考えられる。さらに実験後に脳を灌流固定し、細胞の同定を行う際に、その出血がバックグラウンドシグナルとなり細胞同定が困難になることも考えられる。いずれにしてもコラゲナーゼを用いた場合、適切な酵素処理時間を決定すること、及び酵素処理後の操作を慎重に行うことは重要な点であろう。また脳の膨隆に関しては、ラットの全身状態と刺入部位での電極による細胞へのダメージも関与していることが推察され、脳の膨隆を軽減させるため、脳浮腫を抑制するグリセロールや脳圧降下・浸透圧利尿剤であるマンニトールの投与も検討する必要がある。

2. Oscillation の起源

記録された細胞が oscillation を起こすことに關して、この oscillation がどの部位に由来しているのか、また oscillation を起こす細胞と起こさない細胞があるのは何故かという問題がある。前者に關しては intrinsic であるか、また extrinsic、即ち記録細胞外からの入力によって起きているか明らかにする必要がある。今までの報告では、大脳皮質細胞で見られる oscillation は extrinsic な入力に起因しており、intrinsic な原因で起こっているとする報告はない。CNQX を用いた我々の実験からも外部入力に起因している事が示唆されるが、さらにこの点を確認するため、記録細胞と同一部位を含む冠状断の slice 標本を作製し、各層の細胞から記録を行ったが、全ての細胞で oscil-

lation は観察されなかった。Oscillation の起源として考えられるのは、同側大脳皮質からのシナプス入力 [15] と神経細胞同士のギャップ結合の存在 [17] がある。また同側大脳皮質以外として、脳梁を介した他側大脳皮質からの入力 [18]、視床 [19]、海馬 [20] 及び大脳基底核 [21] から大脳皮質への入力の存在がある。特に Steriade ら [19] は視床で観察される oscillation を報告しており、視床は直接体性感覚野へ投射する中継核であることから、oscillation の起源の 1 つとして最も重要な役割を果たしていると考えられる。麻酔深度との関連から oscillation の頻度とラットの覚醒度には何らかの相関があるものとおもわれる。我々は記録部位の近傍に脳波記録用の電極を置き脳波との関連を調べている。今のところ結論を出すには早すぎるが、ある程度相関がある結果が得られている。脳波の構成波は α 波、 β 波、 δ 波、 θ 波に分類でき、それぞれ覚醒度に対応しているが、記録された細胞は平均 1.2Hz の oscillation を示し、この周波数は深睡眠時に現れる δ 波の周波数 (2Hz 以下) に近く、ラットの麻酔深度を反映している可能性がある。

大脳皮質細胞では oscillation を起こす細胞と起こさない細胞が存在する。この違いは、一つには記録細胞の深さもある程度関係しているようである。現在、neurobiotin を用いた形態的特徴や存在部位との関連を検討しているところである (図 5)。

3. 大脳皮質細胞からの in vivo パッチクランプ記録法の比較

In vivo パッチクランプ法を用いて、第 1 次体性感覚野の機能解析を行っている研究グループの 1 つとしてマックスプランク脳機能研究所の Sakmann グループが挙げられる。彼らは主として髭刺激によるバレル皮質の反応を深層及び浅層の細胞から記録解析を行っている [9, 10, 22, 23]。彼らの実験の有利な点は、電気生理学的手法、形態学的手法及び電位感受性の蛍光色素を用いたイメージング手法のコンビネーションであろう [10, 23]。特に biocytin を用いた形態学的二次元構築の解析は多くのデータの蓄積があり、それら手法

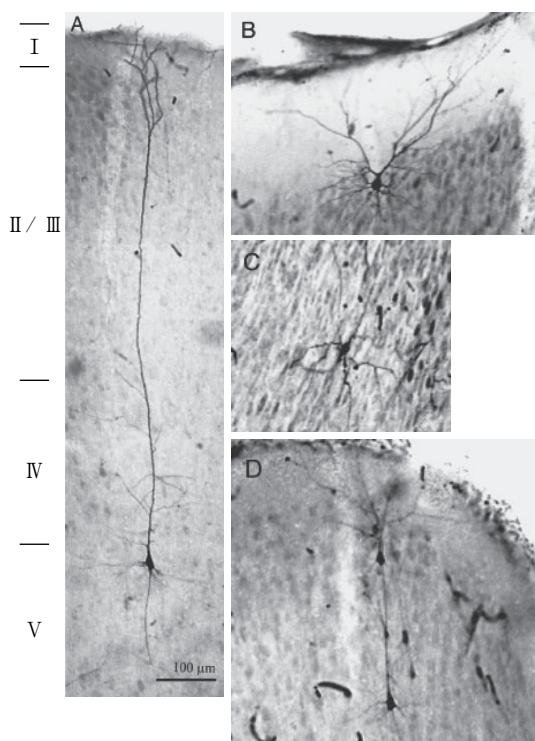


図5. Neurobiotin (0.2%) を添加した細胞内液を用いて記録し、灌流固定したニューロンの形態
 A : V層で記録された錐体細胞を示す。この細胞は大脳皮質表層に先端突起を伸ばしている。
 B, C, D : 表層で記録された細胞を示している。

のコンビネーションによる実験は他のグループをリードしている。しかし、彼らの実験では血管拍動による動きを抑制する目的で脳表面を寒天で覆うなどの処置を行い、記録電極を刺入している実験が多く、未だ薬理学的な実験結果は発表していない。一方、我々の開発した方法では頭蓋骨上にチェンバーを設置しており、脳表面を灌流することによって薬理学的な解析も行う事ができる利点を持つ。さらに筆者らの教室では既に脊髄後角細胞からの *in vivo* パッチクランプ法によって脊髄レベルにおける感覚情報処理機構の解析を行っており（古江の稿を参照）、末梢からの入力を受ける脊髄での感覚情報の修飾・統合と併せて中枢神経全体における感覚情報処理機構の解析が出来る等の利点を有している。しかしながら、脊髄から大脳皮質への中継核である視床は深部に存在する

ため、パッチクランプ記録が困難でアプローチに苦慮しているところである。今後解決すべき問題点と考えられる。

V 今後の発展性

第一次体性感覚野からの *in vivo* パッチクランプ法の実際と今まで得られたデータについて述べてきたが、今後の発展性という点で種々の方面への応用が期待される。1つはマウスへの応用であろう。これは遺伝子操作マウスでの解析を意図したものである。現在用いているラットの幼若なものは体重約 50～60g であり、成熟マウスは体重 20～40g 程度であることから比較的その応用は容易と考えられる。2番目として後肢からの応答が安定して記録できるようになれば、前述したように脊髄での *in vivo* パッチクランプ記録で得たデータと併せて検討することによって、感覚情報系の処理機構を全体的に理解する礎となるであろう。また本方法は体性感覚野だけではなく、視覚野、聴覚野、さらには海馬などの深部に存在する細胞からの記録も可能と考えられ、今後、高次脳機能を単一細胞レベルでのシナプス応答変化として解析できる発展性を秘めている。さらに、大脳のみでなく小脳や脳幹の細胞からの記録も可能と考えられ、中枢神経における様々な機能の解析に応用出来るものと期待される。

文 献

1. Svoboda K, Helmchen F, Denk W, Tank DW: Spread of dendritic excitation in layer 2/3 pyramidal neurons in rat barrel cortex *in vivo*. *Nat Neurosci* 2: 65-73, 1999.
2. Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ: Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 391: 85-100, 1981.
3. Spain WJ, Schwandt PC, Crill WE: Two transient potassium currents in layer V pyramidal neurones from cat sensorimotor cortex. *J Physiol* 434: 591-607, 1991.
4. Pei X, Volgushev M, Vidyasagar TR, Creutzfeldt OD: Whole cell recording and conductance measurements in cat visual cortex *in-vivo*. *Neuroreport* 2: 485-488, 1991.
5. Ferster D, Jagadeesh B: EPSP-IPSP interactions in

- cat visual cortex studied with in vivo whole-cell patch recording. *J Neurosci* 12: 1262–1274, 1992.
6. Jagadeesh B, Gray CM, Ferster D: Visually evoked oscillations of membrane potential in cells of cat visual cortex. *Science* 257: 552–554, 1992.
 7. Volgushev M, Pei X, Vidyasagar TR, Creutzfeldt OD: Excitation and inhibition in orientation selectivity of cat visual cortex neurons revealed by whole-cell recordings in vivo. *Vis Neurosci* 10: 1151–1155, 1993.
 8. Moore CI, Nelson SB: Spatio-temporal subthreshold receptive fields in the vibrissa representation of rat primary somatosensory cortex. *J Neurophysiol* 80: 2882–2892, 1998.
 9. Margrie TW, Brecht M, Sakmann B: In vivo, low-resistance, whole-cell recordings from neurons in the anaesthetized and awake mammalian brain. *Pflügers Arch* 444: 491–498, 2002.
 10. Brecht M, Sakmann B: Dynamic representation of whisker deflection by synaptic potentials in spiny stellate and pyramidal cells in the barrels and septa of layer 4 rat somatosensory cortex. *J Physiol* 543: 49–70, 2002.
 11. Chung S, Li X, Nelson SB: Short-term depression at thalamocortical synapses contributes to rapid adaptation of cortical sensory responses in vivo. *Neuron* 34: 437–446, 2002.
 12. Zhu Z, Wang Y, Xu XZ, Li CY: A simple and effective method for obtaining stable in vivo whole-cell recordings from visual cortical neurons. *Cereb Cortex* 12: 585–589, 2002.
 13. Furue H, Narikawa K, Kumamoto E, Yoshimura M: Responsiveness of rat substantia gelatinosa neurones to mechanical but not thermal stimuli revealed by in vivo patch-clamp recording. *J Physiol* 521 Pt 2: 529–535, 1999.
 14. Narikawa K, Furue H, Kumamoto E, Yoshimura M: In vivo patch-clamp analysis of IPSCs evoked in rat substantia gelatinosa neurons by cutaneous mechanical stimulation. *J Neurophysiol* 84: 2171–2174, 2000.
 15. Douglas R, Martin K, Neocortex. In: *The organization of the brain* (Shepherd G, ed), pp 459–509. New York: Oxford University Press, 1998.
 16. Dawson DR, Killackey HP: The organization and mutability of the forepaw and hindpaw representations in the somatosensory cortex of the neonatal rat. *J Comp Neurol* 256: 246–256, 1987.
 17. Gibson JR, Beierlein M, Connors BW: Two networks of electrically coupled inhibitory neurons in neocortex. *Nature* 402: 75–79, 1999.
 18. Sil'kis IG, Bogdanova OG: Background gamma-oscillations in neuronal networks with interhemisphere connections. *Neurosci Behav Physiol* 28: 645–659, 1998.
 19. Steriade M, Llinas RR: The functional states of the thalamus and the associated neuronal interplay. *Physiol Rev* 68: 649–742, 1988.
 20. Sirota A, Csicsvari J, Buhl D, Buzsáki G: Communication between neocortex and hippocampus during sleep in rodents. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 2065–2069, 2003.
 21. Tseng KY, Kasanetz F, Kargieman L, Riquelme LA, Murer MG: Cortical slow oscillatory activity is reflected in the membrane potential and spike trains of striatal neurons in rats with chronic nigrostriatal lesions. *J Neurosci* 21: 6430–6439, 2001.
 22. Brecht M, Sakmann B: Whisker maps of neuronal subclasses of the rat ventral posterior medial thalamus, identified by whole-cell voltage recording and morphological reconstruction. *J Physiol* 538: 495–515, 2002.
 23. Petersen CC, Grinvald A, Sakmann B: Spatiotemporal dynamics of sensory responses in layer 2/3 of rat barrel cortex measured in vivo by voltage-sensitive dye imaging combined with whole-cell voltage recordings and neuron reconstructions. *J Neurosci* 23: 1298–1309, 2003.