

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19500291

研究課題名（和文） 聴覚皮質ベルト領域のコミュニケーション音による差別化

研究課題名（英文） Differentiation of auditory belt fields using communication sounds

研究代表者

小島 久幸（OJIMA HISAYUKI）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号：00104539

研究成果の概要：モルモットは種特異的な鳴き声を発する。鳴き声等の自然音とノイズ・純音に対する反応性が聴覚皮質領域で異なると仮定し、c-fos の発現に基づきそれら領域を区分することを目的とした。第1段階では数種の鳴き声を採取・分類して刺激音を作成した。またモルモットで c-fos 発現を大脳皮質で観察したデータが乏しいため、最適な抗体と刺激方法を検討した。第2段階ではモルモットに鳴き声と音構成要素である純音を聞かせ、一次聴覚野（field A）と聴覚連合野（VRB）領域での c-fos 発現パターンの違いを見いだした。ケタミンとザイラジン混合麻酔では c-fos 陽性細胞は見いだされなかった。また聴覚皮質の背側に位置する体性感覚野での発現もほとんど認められず、染色の特異性を確認した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：脳・聴覚連合皮質・コミュニケーション・免疫組織科学・極初期遺伝子

1. 研究開始当初の背景

聴覚皮質は一次聴覚野を含む Core とそれを取り囲む高次聴覚野を含む Belt からなる。Belt 領域での音情報処理に関しては著しく研究は遅れている。この遅れは第一に Belt にある神経細胞が音のどのような属性に特異的あるいは優先的に反応性を示すかについて解明がなされていないことに起因する。モルモットは2個の領域を Core に、4-5個の領域を Belt に含む。これら複数の領域が均一な機能的役割をもつと考えることは無理があり、

領域に特徴的な応答様式が存在すると考えられるが、まだ解明には至っていない。この想定される領域特異的な反応性は光学的イメージング法を用いて探索するアプローチも可能であるが、反応特異性が光線の到達する脳表面に表現されているかどうかについてはわかっていない。皮質深層の関与も考慮に入れた際、より全体を観察できるアプローチである形態学的な手法を必要としよう。

一方高次聴覚野は合成複合音である周波数変調音(FM)や振幅変調音(AM)でより強い活性化

が引き起こされることが知られていることから、複数の高次聴覚野が単に音属性の基本的な要素である周波数、音源決定因子、音圧等で差別化されると考えるより、自然音に近い音刺激でその個別の機能が差別化されると思われる。

機能と形態学を結びつけることができる手法の一つに神経細胞の発火活動に呼応して発現が起こる遺伝子を用い、その発現タンパク質を検出して活動細胞の分布を調べることができる。このことによりより広範な領域の特定の音刺激に対する細胞活動度を探查することができる。

2. 研究の目的

(1) 本研究ではまず刺激として動物の鳴き声を外界ノイズを含まない条件下で採取し、刺激音としてデジタル化し、適宜スピーカーから発するために外部トリガーにより駆動できるようにする。

(2) この種特異的な鳴き声刺激に対し、細胞の活動に依存して活性化される極初期遺伝子 immediate early genes の内の一つである c-fos の発現をモルモットの大脳皮質で調べる。これは従来調べられたことがないことから、発現が生じる最適条件を免疫組織化学的に、また刺激適用条件において見いだす必要がある。

(3) 特定の鳴き声異なる聴覚皮質でどのような発現パターンを示すかを、聴覚皮質全体の連続切片を作成して調べる。このパターンにより古典的な染色方法で形態学的に区分されている領域を機能的な観点より差別化することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 聴覚皮質を活性化するための刺激音(コミュニケーション音)の採取とデジタル化:

刺激音の採取--モルモットを単独で実験室内にある防音室に設置した小グラウンドに置き、その鳴き声をACO社製のマイクロフォン(自由音場型、7012, f特20-40kHz)を用いてSONY社製DVCAMレコーダー(DSR-45A)に録音した(f特40-24kHz, 48kHzサンプリング周波数)。その後、インターフェイス(10, AJA社製)を経由してコンピューターに取り込み、音声編集ソフト(Raven, Cornell University)でデジタル化し、ノイズの少ない刺激音ライブラリーとした。

これら鳴き声は16 bit、標本周波数25 kHzでデジタク化し、TDT System 3 のSigen fileとして保存しておく。外部トリガーからの制御によりTDT System 3のReal time processorは即時に音波形を合成し、オーディオパワーアンプを経て防音室にのダイナミックスピーカーから発せられた。

ノイズの混入の制御--雌雄のモルモットを

同一ケージに置くと、当初30分程相互に鳴きあう。この時期はさまざまな鳴き声が採取できるが、動物自体が移動し、探索行動を行う時期でも有り、行動に由来するノイズが混入する可能性がある。よって記録された音声は編集を行った。鳴き声採取中は音声録音と同時に行動をビデオ記録し、後にoff-lineで映像と音声を対応させることができる編集ソフト(final cut pro, Apple社製)上でノイズ音、あるいはノイズの入った可能性がある行動を含む期間を除外して、より純粋にコミュニケーション音のみを含むエポックを選別した。

(2) c-Fos を用いた免疫組織化学的手法の条件設定:

モルモットの大脳皮質における c-Fos タンパク質を検出する実験は行われていない。従って rat で良好な結果を示すことが確立している単クローン抗体 Ab-5(Calbiochem 社製)と多くの動物と交叉性反応を示す単クローン抗体 K-25(Santa Cruz Biotechnology 社製)を x1000, x2000, x4000, x8000 倍に希釈して染色性を検討した。モルモットを 4% paraformaldehyde (0.1M リン酸緩衝液)固定液で還流後、脳を 20% スクロース(0.1M リン酸緩衝液)に浸し、沈下後 50 μm の連続切片を作成し、リン酸緩衝液で洗浄し、2% 正常ヤギ抗体、0.4% Triton-X-100、1% ウシ血清アルブミンを含む blocking 溶液(希釈溶液)に1時間、その後上記濃度の抗体を含む希釈溶液中で12時間室温反応させ、洗浄後 x200 倍の biotinylated 抗ウサギ抗体を含む希釈溶液中に2時間、洗浄後 ABC 反応溶液に2時間浸した。洗浄後型どおりの DAB 反応を行い反応産物を可視化した。また最適抗体と希釈倍率を選定後は、連続切片の内3分の1は c-fos 免疫染色、隣接する3分の1づつの切片はそれぞれ Nissl 染色と cytochrome oxidase 染色を行い、伝統的な形態に基づく領域決定の基準とした。

大脳皮質にシグナルを検出するための刺激提示時間に関する条件設定:

動物は無麻酔で音刺激を聞くため、必要以上に長時間音刺激に暴露されると歩行を開始し、また高頻度に噛み行動を起こし、これらの運動が音源となり、鳴き声刺激に対する反応の特異性を低下させると考えられた。このため防音室移動後の順応時間と c-fos 発現に有効な音提示時間を決定することが行動観察から行われた。

音刺激とそのコントロール:

音は無麻酔、無拘束下で与えた。使用した鳴き声はオスが主にメスに接近する際に発する purr 音、餌を要求する際発する whistle 音、また捕まれて不快を示す際に発する scream 音を用いた。スピーカーは動物の斜め上 1m の距離に置いた2台の同一なダイナミックスピーカーから与えた。2種類のコントロールを

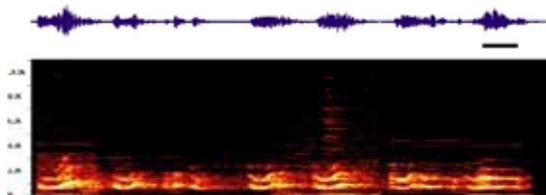
設定した。一つ目は動物を麻酔して同一音を聞かせ、完全に受動的な状況下での聴覚皮質の活性化との差異を示すために用いた。もう一つは鳴き声に代わり、純音を継続しながら同一時間与え続け、反応性が単に音刺激による結果ではなく、音の種類により生じることを示すために用いた。

データの解析：c-fos 反応を含む切片は x100 倍で観察し、x40 倍でカメラルチダを用いてトレースした。典型的な反応を示す切片を control と対比させて選定しトレースに用いた。また隣接する Nissl および cytochrome oxidase 染色した切片に基づき形態学的な領域の境界を設定した。定量的な解析は現時点ではまだ完了していないが、聴覚皮質の Core と Belt 間でそれぞれの境界を決定し、切片の単位面積当たりの c-fos 細胞の密度を求める予定である。

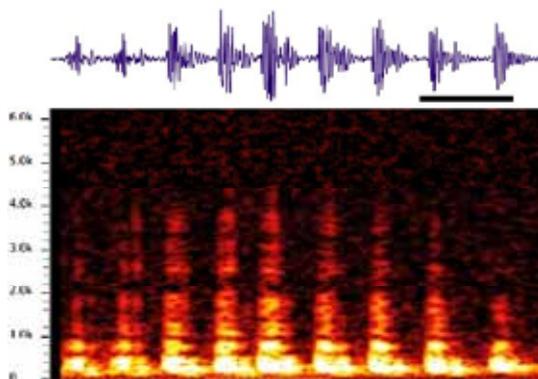
4. 研究成果

(1) 刺激音としての動物の鳴き声のライブラリーの作成：

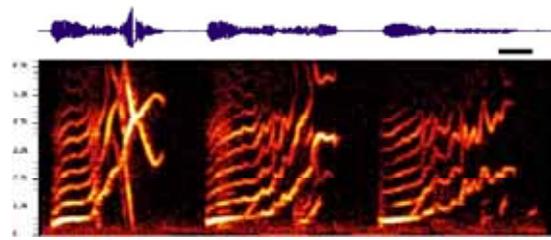
下記(図1)にモルモットが良く発する4種類の鳴き声の音波形(上段)とそのスペクトログラム(下段)を示す。縦軸は周波数で横軸は時間を表し、カリブレーション棒は0.1秒である。音は上より安静・静止時によくささやかれる鳴き声である chatter, 複数固体が、特にオスがメスに、接近する際によく発せられる purr, 餌や水などを要求する際に発せられる whistle, そして不快な状態、例えば実験者に驚掴みにされた時によく発する scream である。



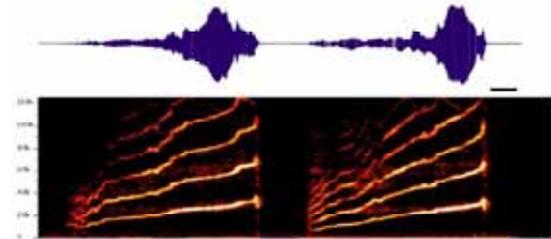
chatter 音



purr 音



whistle 音



scream 音

-図1-

(2) 動物への最適な音刺激条件：

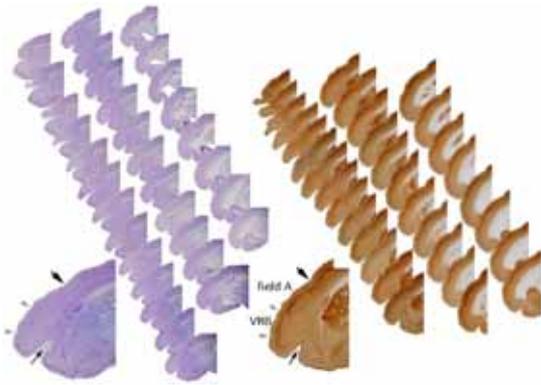
予備実験での反復した行動観察から、動物を飼育ケージから防音室へ移動後30分間だけ刺激を与えず、新しい環境に順応させ、その後60-90分間音刺激を継続して与えた場合に、不必要な運動は最小限に、また音刺激に対し時に頭部を向ける行動を行い、注意を音刺激に払っている高い警戒状態を維持していることが伺われた。

実験条件：本実験では、体重500-800g、オスのモルモット5匹を使用した。1匹のモルモットではケタミン(50mg/kg)とザイラジン(5mg/kg)の混合液を動物を防音室に移動後30分後に腹腔内に注射し、その後防音室内に体温維持した状態で90分間、音刺激を与えないで放置した。残り4匹のモルモットのうち2匹は purr, whistle, scream 音をその順位をランダムにして継続して聞かせた。他の2匹には様々な純音を聞かせた。

(3) Nissl 染色、cytochrome oxidase 染色および c-fos 染色：

Nissl 染色と cytochrome oxidase 染色を組み合わせて、一次聴覚野(AI)である field A とその腹側にある Belt 領野の一つである ventral rostral belt (VRG) 野を区別した。

下図に Nissl 染色(左)と cytochrome oxidase 染色(右)の連続切片を示す。大きな矢印は聴覚野と体性感覚野の境界に位置する pseudo-sylvian 溝を示す(図2)。小さい矢印は嗅脳溝である。2個の灰色の矢尻は背側より AI (field A) と VRB の境界、VRB と perirhinal 回の境界を示す。一方この染色法ではその他の Belt 領野を区別することは難しかった。よって今回はこの2領域における c-fos 発現を調べた。

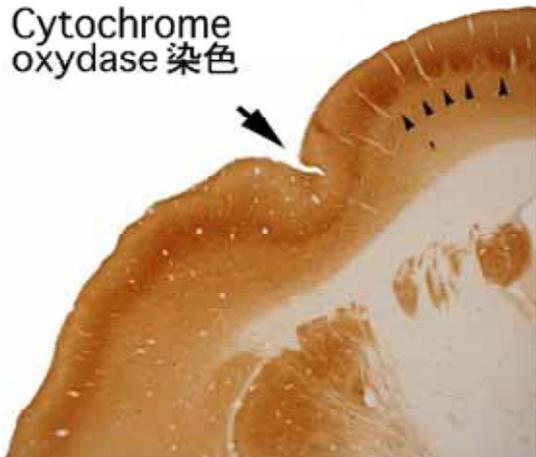


-図 2-

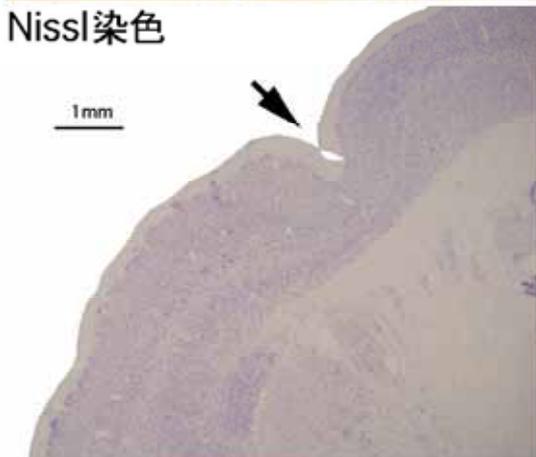
c-fos 染色および異なる刺激条件下での代表的な染色像。

Pseudosylvian 溝(下図矢印)より背側は体性感覚野でその腹側は聴覚皮質である。よってこの溝を境にして染色がその背側では認められなくなる事が期待される。結果は予想と一致し反応の特異性を示唆した(図 3)。

Cytochrome
oxydase 染色



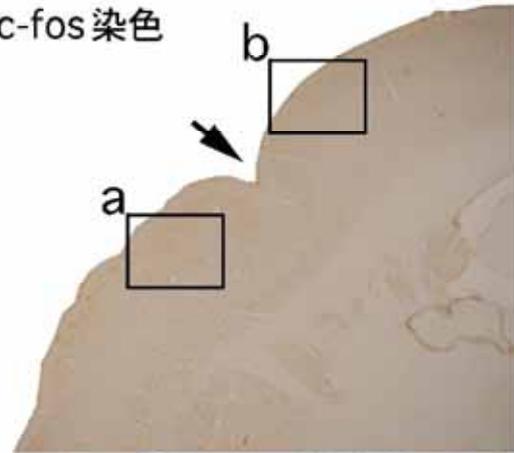
Nissl染色



-図 3-

cytochrome oxidase 染色での矢印は体性感覚野にあるバレル構造である。この部分にはほとんど c-fos 陽性細胞は見られない(図 4 b)。一方 pseudosylvian 溝より腹側の聴覚野には多くの陽性細胞を認めた(図 4 a)。

c-fos 染色



a



b



-図 4-

麻醉下での c-fos 反応性:ケタミンとザイラジンの混合麻醉をして 90 分間防音室内に動物を置いたあと直ぐに還流固定した。

Pseudosylvian 溝の腹側にある field A(一次聴覚野)にも、そのさらに腹側にある VRB 領域にも強い c-fos 陽性核を持つ細胞はほとんど認められなかった(図 5 A)。

非拘束、無麻醉下で様々の純音(周波数帯域は 150Hz から 20kHz)を 90 分間防音室内で与えた後還流固定した。陽性細胞は中程度の密度で field A において比較的全層にわたって分布し、また VRB にも低密度の細胞の分布を認めた(図 5 B)。

非拘束、無麻醉下で鳴き声(purr, whistle, scream)を 90 分間聞かせた後還流固定した。多くの陽性細胞が主に VRB,特にその深層に認められたが、field A には少なかった(図 5 C)。

麻酔薬としてケタミン+ザイラジン混合液の代わりにネンプタールを使用した。予想外の結果が認められた。刺激をおこなっていないにもかかわらず、音刺激に相当する密度の陽性細胞が field A と VRB に見られた。

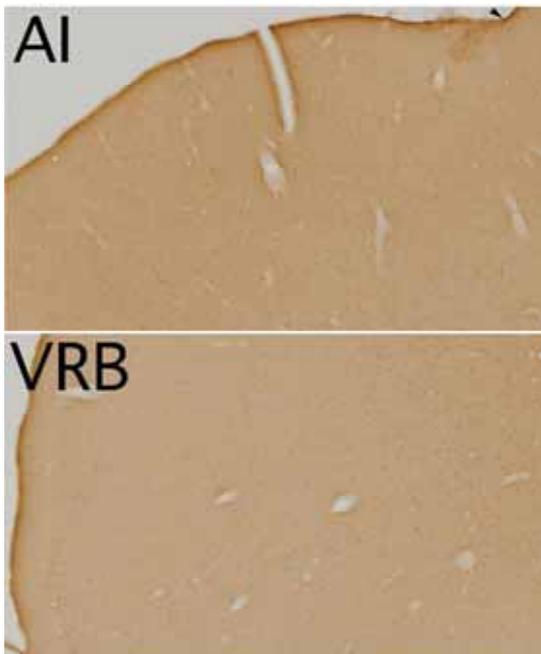


図 5 (A)



図 5 (B)

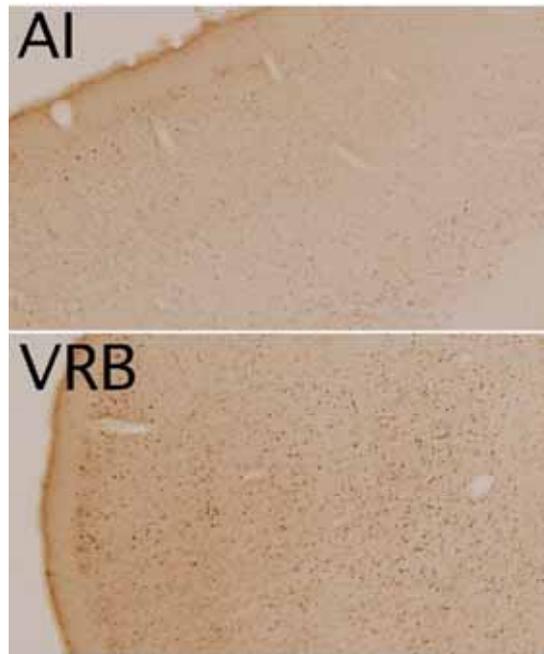


図 5 (C)

ネンプタール麻酔下で音刺激無しで動物を防音室内においておくだけで、なぜこのような c-fos 陽性細胞が出現したのか目下検討中である。
今後例数をさらに増やし定量化をしていくことが必要と考えられる。

結論

純音は主に一次聴覚野で陽性細胞の出現をみたことから、反応性は末梢からの知覚入力を反映していると考えられた。一方聴覚連合野である Belt 領域の一つである VRB において、鳴き声を刺激として用いた際に純音より多くの c-fos 陽性細胞の出現をみたことから、鳴き声処理に連合野がより強く関わっていることが推測された。

これらは種特異的な鳴き声が VRB 経路で処理されるか、鳴き声に伴う情動的な側面と鳴き声が VRB において統合されている可能性を推測させる。

一方他の聴覚連合野は field A および VRB の後方にあるが、古典的な染色法では区別しがたく、また c-fos 染色においてもより多くの陽性細胞を含むような特定の部位が後方部位に存在するようには認められなかった。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Ojima H, Taoka M, Iriki A

Adaptive changes in firing of primary auditory cortical neurons following illumination shift from light to dark in freely moving guinea pigs

Cerebral Cortex, *in press* 2009

〔学会発表〕(計 10 件)

(1) 学会口頭発表

Ojima H, Taoka M, Iriki A

Environmental stimuli induce facilitation and suppression in neurons of the ventrorostral belt field (VRB) of guinea pigs. 37th Annual Meeting of Society for Neuroscience, San Diego, Nov 5, 2007

Ojima H, Taoka M, Iriki A

Environmental stimuli induce facilitation and suppression in neurons of the ventrorostral belt field (VRB) of guinea pigs. Tucker-Davis Symposium on Advance and Perspectives in Auditory Neurophysiology (APAN). San Diego, USA, November 2, 2007

Ojima H, Taoka M, Iriki A

Modulatory effects of environmental stimuli on the acoustic responsiveness of auditory cortical neurons. 30th Annual Meeting of the Japanese Neuroscience Society, Yokohama, September 11, 2007

Ojima H, Taoka M, Tanaka M, Iriki A

Non-Acoustic Signals May Affect the Baseline Firing of the Primary-like Auditory Cortex, Field A of Guinea Pig, Possibly via a Specific Subset of Neurons. Baltimore, USA. February 16, 2009

(2) 招待講演

Ojima H

Modulation of neural activity of auditory cortex by environmental light conditions in freely moving guinea pig. At Keck Center, University of California San Francisco, USA (Prof. Christopher Schreiner Lab), November 9, 2007

Ojima H

Modulation of neuronal activity of auditory cortex by environmental light conditions in freely moving guinea pig. At University of California Berkeley (Prof. Shaowen Bao Lab) USA, November 8, 2007

小島久幸, 田岡三希, 入來篤史

自由行動下モルモットにおける一次聴覚野ニューロンの非聴覚性刺激に対する応答性。メディア科学リサーチセンター視聴覚コア・ワークショップ、聴覚皮質研究会、豊橋技術科学大学、豊橋、平成19年11月27日

小島久幸, 田岡三希, 田中美智雄, 入來篤史. 無麻酔, 非拘束モルモットにおける一次聴覚皮質ニューロンの音反応性の時間特性. 第31回日本神経科学大会, 東京, 2008年7月10日

小島久幸. 無麻酔, 非拘束下モルモットにおける聴覚野細胞反応の特性. MSRC 視聴覚コア聴覚皮質研究会 / 日本音響学会聴覚研究会, 豊橋技術科学大学, 豊橋, 2008年11月29日.

Hisayuki Ojima. Layer-Specific Connections of the Primary Auditory Field with Extrinsic and Intrinsic Targets. 13th Auditory Research Forum Japan. Doshisha University, Shiga, December 6-7, 2008.

〔図書〕(計 2 件)

小島久幸, 田岡三希, 田中美智雄, 入來篤史. 無麻酔, 非拘束下モルモットにおける聴覚野細胞反応の特性. 日本音響学会聴覚研究会資料 38(7) H-2008-123: 707-712, 2008.

小島久幸. 感覚器. 岸清・石塚寛編, 解剖学第2版、医歯薬出版 pp.261-274, 2008.

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

小島 久幸 (オジマヒサユキ)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師・00104539

(2) 研究分担者

大竹 一嘉 (オオタケカズヨシ)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授・10168966