

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K20164

研究課題名（和文）内耳振動現象を解析する高解像光コヒーレンストモグラフィの開発と計測基盤の確立

研究課題名（英文）Optimization of the optical coherence tomography for the nanometer scale

研究代表者

太田 岳（Takeru, OTA）

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：30790571

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,000,000円

研究成果の概要（和文）：聴覚の末梢器官である内耳蝸牛の感覚上皮帯の光イメージングおよび振動計測手法を最適化することを通じ、マウスでの聴覚研究プラットフォームを確立することを目的とした。この動物は、約50 kHzまでの周波数を感じ取るため、光断層撮像法の改良によって高速振動をリアルタイムで捉える技術拡張を試みた。機器の性能は、生きた健康な聴覚を持つマウスおよび生後早期に難聴を呈するモデルマウスを用いて評価し、電気生理学的な実験で確かめられている報告から推定される振動動態と矛盾しない結果を得ることができた。本研究の実施により、今後遺伝子改変モデルマウスへと応用できる解析プラットフォームが創出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、国民の10人に1人以上が難聴であると言われている。超高齢化社会の到来やスマートフォンの普及により、今後患者の数はますます増加するものと予測される。難聴の多くは聴覚の末梢器官である内耳蝸牛の機能不全によるものと報告されているが、現在も確実な治療戦略がないことが社会的問題となっている。そこで本研究では内耳の仕組みをメカニカルな視点で明らかにしつつ、汎用性の高い実験動物であるマウスにおける計測手法の最適化によってアプローチした。本研究の実施により生理学的な基礎背景を整理するのみならず、難聴治療への基礎研究の歩みを進めることができたと考えられる。

研究成果の概要（英文）：The cochlear of the inner ear receives the sounds and converts the mechanical energy into the electrical signals which the brain can process. The sensory epithelium, a sheet-type tissue composed of hair-cell, supporting cell, and extracellular matrix layers, inside the organ vibrates at nanometer scale responding to the mechanical input from the middle ear. Here we optimized the technique for optically imaging the tissue and measuring the tiny motion in in vivo mice cochleae. With the optical coherence tomography, we achieved the live imaging of sensory epithelium in the high frequency region of the cochlea. As described in gerbil cochleae, the section area of the tunnel structure inside the tissue changed after the mouse died. The results suggests that the modeling the motion of the epithelium should be stood on the shape of the live image when we consider the cochlear sound processing.

研究分野：生体医工学

キーワード：内耳蝸牛 感覚上皮帯 有毛細胞 光コヒーレンストモグラフィー 微小振動

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

哺乳類は、外界の音を内耳蝸牛で電気信号に変換し、脳で情報を処理する。聴覚の成立には、この末梢臓器内の層状組織「感覚上皮帯」に惹起される「ナノ振動」が必須であり、その破綻は難聴を引き起こす。この微小な動きの制御機構の解明を目的として、近年海外では光コヒーレンス断層撮像装置 (OCT: Optical coherence tomography) を技術拡張した“in vivo 振動計測”が、モルモット、スナネズミを中心に精力的に進められている。しかし、特に 50 kHz 相当の超音波を内耳で感受するマウスを用いた上皮帯の高速振動動態は今も十分に解明されていない。海外グループによる報告がある範囲においては、計測装置の限界からマウス上皮帯振動の解析は蝸牛頂上部の計測 (低周波数の音) に限定されている。

2. 研究の目的

本研究では光コヒーレンス断層撮像装置を、麻酔下の生きた動物の計測のために最適化して、マウス感覚上皮帯の層構造をより詳細に捉えつつ、層ごとのナノ振動を計測する。具体的には、極微 (約 0.3 nm 程度) かつ高速 (約 50 kHz) な振動振幅を生きた状態で定量し、特に高周波数におけるこの動きの制御機構を明らかとすることを最終目的とする。本研究の遂行により、難聴モデル動物にも応用が可能なマウス感覚上皮帯ナノ振動計測プラットフォームを創出する。研究が計画通りに進んだ場合、難聴モデルマウスを導入し、病態の成立機構をメカニクスの視点から分析する。

3. 研究の方法

1年目にマウスでの実験系を確立するため、手術手技の経験を蓄積しつつ計測機器を最適化する。2020年現在までのSpectral-domain OCT装置では、マウスが聴くことのできる約50kHzの高い周波数をサンプリングする性能が備わっていない。よって、まず高い周波数に対応できる超音波スピーカーや音圧計測・校正用のマイクロフォンなどの周辺機器を導入する。その上で、信号をリアルタイムで解析する新たなプログラムを、高速演算プロセッサなどを実装したコンピュータを用いて作成する。同時に、手術用顕微鏡を用いたマウス微細頭頸部手術手技の開発に着手する。2年目に50kHzの高周波数音に反応するマウス蝸牛基底部を標的に計測を実施し、感覚上皮帯の層ごとの振動の差異を明確化する。蝸牛の頂部の感覚上皮帯は低周波数に、基底部では高周波数に呼応してナノ振動する。よって、OCTによる観測例がない基底部における計測を最優先とする。微細手術経験を活かして全身麻酔下のマウスの聴覚を正常に維持しながら、まず断層画像を撮影する。その後、計測部位が最も揺れる周波数(40-45kHzと予測)の音を用いた振動振幅計測を目指す。上記の計測を通じて、高周波振動を制御する生理的基盤を明らかにする。計画通りの計測が達成されれば、3年目は難聴マウスでの計測へと移行する。研究室への導入が容易な市販の難聴モデルマウスを導入して解析を進める。このマウスでは、小さな音を効率よく増幅する感覚上皮帯の構成細胞「有毛細胞」の感覚毛が健康モデルと比べて短く、生後早期に難聴を惹起することが報告されている。ところで、蝸牛基底部は感覚上皮帯の大きさが小さく、また上述の通り振動周波数も高い。これらの事実が計測を極めて困難にすることで、当初計画が予定通りに進行しないことも想定される。よってもしも、2年時までの計画が実行できない場合、振動周波数が低く、かつ振動振幅の大きな蝸牛頂上部を対象とした計測へと計画を修正し、対応する。この部位は小さな音でも1nm以上振動することが確認されている。したがって、振幅が相対的に小さな基底部よりも計測が容易であると予測される。過去に振幅の分布が周波数ごとに報告されているが、その解像度は不十分であり、振動の制御機構も未解明である。この部位の計測知見から、遺伝子改変動物を用いた振動計測実験系を整える。

4. 研究成果

研究開始から約1年までの期間において、生きたマウスの感覚上皮に生じるナノ振動を低い周波数から高いものまで網羅的に取得することを目指した。マウスは約50kHzの高周波音を聞き取ることが脳波計測によって証明されているため、それに見合った計測システムの改良に着手した。第一段階として、超音波計測に特化したスピーカーとマイクロフォンを搭載した。スピーカーは0dB(0.02mPaとする)から最大で110dB相当の広範なダイナミックレンジを持つものを用意し、マイクロフォンは背景ノイズが約-10dBの良好な仕様の機器を使用した。さらに計測プログラムの改善によって、マウスの感覚上皮の能動的な運動を起源とする「歪成分耳音響放射」を1kHzから70kHzまで網羅的に測定することができるようになった。よって、まずは生理現象を後半に計測するための機器性能を高めることができた。また、高周波運動をリアルタイムに捉える信号取得プログラムの実現にも成功した。当年度において、人工的な振動素子で検証したところ、約100kHzまでの周波数信号を計測できるプログラムが準備できた。次に、外科的に内耳を露出したマウスにレーザー光を照射し、感覚上皮に生じるナノ振動を実測することに着手した。マウスの感覚上皮の能動的な動作、すなわち小さな音ほどよりよく増幅する性質、は生きた健康な状態でしか観測できないことが知られている。よって、内耳や動物の身体そのも

のに大きな負荷がかからないよう、外科手術の様式を最適化した。完璧であるとは断言できないものの、約 50 dB 近辺の小さな音圧レベルの音に対して、約 1 nm の感覚上皮振動振幅を観測することができた。ナノスケールではあるものの、これは背景ノイズ(約 0.1 nm)に比べて有意に大きく、死後動物では大きく損なわれたため、生体由来の現象を捉えることができたと判断した。よって初年度では計画通りにマウスでの振動計測基盤の開発を進めることができた。次年度は、生きたマウスの感覚上皮に生じるナノ振動が、レーザー照射位置においてどの周波数域で最もよく振動し、それがどのように聴覚に関連するか、さらに振動の発生の仕方が複雑と想定される細胞複合体のどこで効率的に生じているかを模索するため、さらなる機器の改良に着手した。第一に、光断層撮像装置の光軸調整を再度見直し、最適なレーザー照射条件を設定した。物体への照射光の強度が最低でも 1 mW 以上必要であることを見出した。その環境下の元、マウスの体温を維持できるよう、温度環境も整備し、健全な聴覚を保ったままの計測ができるように機器を最適化した。マウスは説明した通り、低周波から高周波まで広範な音を受容するが、この年度においては、レーザースポットをマウス内耳蝸牛の基底部、すなわち高周波数領域に絞った。この部位には正円窓と呼ばれる透明膜構造があり、そこにレーザーを通すことで奥にある感覚上皮に非侵襲に光を照射することができた。その他の部位は骨に覆われており、約 1 mW 程度の光照射では骨の反射による光損失を克服することは困難であり、内部の構造体を撮像することはできなかった。蝸牛の基底部は、30 kHz 以上の高い周波数で振動することが報告されているため、単一周波数音刺激を 30 kHz から 50 kHz までの範囲で与え、その際の振動を計測した。その結果、至適周波数は、動物個体にも依存して 5 kHz 相当の変動があったものの、おおよそ 40 kHz 帯であることが C57BL/6J マウスにおける実験で見出された。さらに、動物の健康状態が良好な時には、感覚上皮帯の上部の振動振幅が下部の細胞外基質層構造よりも大きく振動することが示唆された。本実験では、深い手術手技が必要であったものの、振動計測の前後でマウスの聴覚は担保されていた。これは聴性脳幹反応と呼ばれる脳波的な応答を観測することで確かめられた。さらに、光断層撮像法による *in vivo* 感覚上皮帯立体撮像にも着手した。動物の生前死後において、感覚上皮帯を構成するトンネル構造を詳細に描出することができた。トンネル周囲の形状も含め動物の状態に依存してその大きさなどが変動することが示唆された。最終年度では、計画通りに、難聴モデルマウスまたはマウス蝸牛頂上部における感覚上皮帯の振動計測を実施した。前年度までの計画がおおむね予定通りに進んだため、生後早期に難聴を呈するマウスにおける振動計測を実施した。正常な聴覚を持つマウスでは、先行研究において、感覚上皮帯の上部にある有毛細胞層が下部の細胞外基質層よりも大きく振動し、小さな音刺激であるほどよりよく振動が増幅されることが知られている。まずはその再現性を担保するため、マウスの高周波聴覚を担当する蝸牛基底部において、複数回の実験を試みた。正常聴覚マウスにおいて、先行研究と同様の傾向を示す結果を実験で確かめた。一方、低周波で振動することが報告されている蝸牛の頂上部においては、再現性に関して十分な数を担保できていないものの、有毛細胞層の振動振幅が細胞外基質層よりも大きくなることが確かめられた。蝸牛頂上部における計測では、最低でも約 2 mW のレーザー照射出力が必要であることも見積もられた。蝸牛頂上部の振動は、海外のグループでも光断層撮像法を用いて調べられてきたが、本研究では報告例のない蝸牛基底部に関して計測が可能であり、広範な聴覚周波数レンジを誇るマウス動物種への応用可能性が高まった。難聴マウスにおいては、有毛細胞層における振動の増幅現象が認められず、内耳の機能不全の有無を振動計測の視点から診断できるようになった。以上から、当初計画していた解析プラットフォームは完備なものとなり、今後の聴覚計測機器として実装することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Zhang Qi, Ota Takeru, Yoshida Takamasa, Ino Daisuke, Sato Mitsuo P., Doi Katsumi, Horii Arata, Nin Fumiaki, Hibino Hiroshi	4. 巻 599
2. 論文標題 Electrochemical properties of the non excitable tissue stria vascularis of the mammalian cochlea are sensitive to sounds	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Physiology	6. 最初と最後の頁 4497 ~ 4516
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1113/JP281981	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Fumiaki Nin, Samuel Choi, Takeru Ota, Zhang Qi & Hiroshi Hibino	4. 巻 -
2. 論文標題 Optimization of spectral-domain optical coherence tomography with a supercontinuum source for in vivo motion detection of low reflective outer hair cells in guinea pig cochleae	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Optical Review	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 太田 岳、崔 森悦、任 書晃、日比野 浩
2. 発表標題 音を受容する内耳蝸牛の感覚上皮に生じるナノ振動の計測と分析
3. 学会等名 日本物理学会 第77回年次大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 太田 岳、崔 森悦、任 書晃、日比野 浩
2. 発表標題 内耳感覚上皮帯に生じる直流動作の検出とその起源
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 太田岳、日比野 浩
2. 発表標題 聴覚の末梢器官である内耳蝸牛の感覚上皮振動に含まれる直流動作の検出と分析
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 太田 岳, 崔 森悦, 任 書晃, 日比野 浩
2. 発表標題 改良型レーザー干渉法による内耳感覚上皮帯のナノ振動計測
3. 学会等名 第61回日本生体医工学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 太田 岳, 日比野 浩
2. 発表標題 音刺激により内耳蝸牛の感覚上皮に生じる直流的な動作の成立機序
3. 学会等名 日本生理学会 第113回近畿生理学談話会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takeru Ota, Hiroshi Hibino
2. 発表標題 In vivo optical imaging of the sensory epithelium in mice cochleae. Poster presentation.
3. 学会等名 International symposium on mechanobiology for human health (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 太田 岳、日比野 浩
2. 発表標題 Sound detection and processing in the cochlea of the inner ear/内耳蝸牛の音受容および処理機構
3. 学会等名 第100回日本生理学会 第100回記念大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関