

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791882

研究課題名(和文)難聴モデルマウスを用いた聴覚野周波数マップの研究：耳鳴の積極的予防を目指して

研究課題名(英文) Study of auditory cortex function and frequency map in mice using flavoprotein fluorescence imaging

研究代表者

窪田 和 (Kubota, Yamato)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：40547593

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：フラビン蛋白蛍光イメージング法にて、マウスの大脳聴覚野機能を研究した。その結果以下の知見を得た。先行持続音呈示後の一次聴覚野応答で、通常検出できないON、OFFに対応する二峰性応答を得た。周波数変調音刺激で刺激中に急激に変調方向を変えると、UF、DP領域に特異的な反応が見られ、トレーサーで追跡すると内側膝状体レベルで一次聴覚野と異なる部位から投射されていた。加齢性難聴マウスを用いた高音難聴マウスの聴覚野反応では、中等度以下の難聴では聴覚野マップに変化が見られなかったが、高度難聴になると中音域の活動が強くなっていた。両側聴覚野同時測定では刺激側の対側聴覚野で応答が強い傾向であった。

研究成果の概要(英文)：We studied the cerebral auditory cortex function in mice using flavoprotein fluorescence imaging method. As a result, we got the following findings. 1: After continuous tonal sound exposure, On and Off responses in A1 were strongly observed. 2: Changing the direction of frequency modulation of stimuli, specific reactions were observed at UF and DP area. It had been projected from the site that is different from the primary auditory cortex in the medial geniculate body. 3: Age-related hearing loss mouse, there was no apparent change in the auditory cortex map in moderate hearing loss. Activities in midrange stimuli had become strong when it comes to severe hearing loss. 4: In both sides measurement, strong responses were observed in the contralateral auditory cortex of the stimulus side in the auditory cortex.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 耳鼻咽喉科学

キーワード：聴覚医学 中枢聴覚 イメージング

1. 研究開始当初の背景

大脳聴覚野の詳細な機能は未だに解明されていない部分が多く存在する。内耳障害の結果生じる中枢性耳鳴をはじめ、難聴による語音弁別能の低下など様々な事象に、大脳聴覚野における刺激応答性の変化が関与していると推測されている。聴覚野の詳細な機能を評価するため、マウス聴覚野を用いた光学的イメージングを行っている。

脳活動の計測法として使用したフラビン蛋白蛍光法は自家蛍光を用いた低侵襲な計測方法である。神経細胞内のミトコンドリアに存在する電子伝達系にはフラビン蛋白が介在し、神経活動の亢進により電子伝達系が活性化する際に還元型から酸化型へと変化する。この際に青色の励起光を照射することで緑色の自家蛍光を発する。また、マウスの頭蓋骨は非常に薄く透明度が高いため、開頭せずに蛍光を捉えて神経活動のイメージングを行うことが可能であり、低侵襲な実験デザインが可能である。

大脳聴覚野には音の周波数に対応するように応答する細胞が連続して配列されるマップ構造が存在する。また、聴覚野内には担当する機能が異なる複数の領域が存在しており、互いに情報伝達を行いながら総合的な情報処理を行っている。我々はこれまでの研究から、一定の環境音下で飼育したマウスでは曝露された音の周波数における聴覚野の反応が増強すること、前聴覚野は音の立ち上がり鋭敏に反応すること、前聴覚野を抑制すると一次聴覚野の反応が低下することから、皮質間での情報伝達に方向優位性があること、二音を報酬の有無で件付けを行ったマウスでは報酬のある音に対しては聴覚野反応は変化せず、報酬が無い音に対する反応が低下するなどの結果を得ている。

2. 研究の目的

内耳性難聴に伴う聴覚入力減少による中枢性耳鳴、難聴患者における語音弁別能低下、聴覚過敏などの現象は内耳はもとより中枢での情報処理の変化により生じていると推定される。聴覚処理の中枢である聴覚野において、難聴によりどのような変化が生じているのかを知るために、聴覚野のイメージング解析を行う。大脳聴覚野でのマップの可塑的变化との関連を中心に解析し、また基礎的な聴覚野機能や可塑的变化の生じるメカニズムについても研究する。

3. 研究の方法

フラビン蛋白蛍光イメージング法を用いて、マウス大脳聴覚野の反応を測定した。C57BL/6 マウスを用い、ウレタン麻酔下に頭皮を剥離、側頭骨面を明視下に置き、キセノン光源より 475nm 帯の青色光を励起光として照射する。前方スピーカーもしくはコンデンサスピーカーからチューブでイヤープラグを接続し音源提示を行った。高感度 CCD カメラ

にフィルターを装着し 500~550nm の自家蛍光を捉えられるようにし、刺激音を呈示し解析ソフトにて反応強度を計測した。その際、(1)一次聴覚野において、音刺激に応答する細胞には複数の種類があり、ON 刺激に応答するもの、OFF 刺激に応答するもの、刺激中持続的に応答するものなどが存在すると言われている。従来 1 秒間程度の提示音ではそれらが混在して応答を示すため一峰性の聴覚野応答が得られるだけであった。一次聴覚野での音の開始、終了に対応する神経反応を分離して観察するために様々なパラメーターの先行刺激を与え、測定した。(2)聴覚野では周波数情報に対応する領域とそれ以外の領域が存在する。周波数の変調情報に対応する領域を調べるために FM 音を利用した。一定の周波数帯域内での無限 FM 上昇音、無限 FM 下行音を呈示音源とし、それらによる聴覚野応答を測定した。また、周波数変調の変化に応じる反応を計測するため、音呈示の途中で FM の方向性を上昇から下行、または下行から上昇というように急激に変化させ、聴覚野の反応を計測した。(3)加齢性難聴マウスにおける聴覚野マップの変化を捉え、高周波数帯域の聴力が低下した際にそれよりも低周波数帯域の聴覚野マップにどのような変化が生じるかを検討した。また、そのマップ変化を抑制するための外的な刺激(飼育時に高周波数帯域の環境雑音を継続的に曝露するなど)を行ったうえで聴覚野応答を計測しその効果を研究した。(4)両側聴覚野の同時測定を行い、片耳刺激、両耳刺激や左右で異なる音刺激を行った場合の左右聴覚野の応答性の違いや機能分担に関し検討した。

4. 研究成果

(1)通常の 1 秒間の純音音呈示では一時聴覚野の神経応答は一峰性の反応を示すが、7 秒間の持続刺激音で測定することで音開始時と終了時に同期する ON 及び OFF 反応を確認することができた。また、通常の 1 秒刺激音から ON、OFF の反応を抽出するための方法として、10 秒間の先行刺激音を呈示したのちに 30 秒間の無音時間を挟み 1 秒間の刺激音呈示を行ったところ、1 秒刺激音の開始と終了に対応した二峰性の聴覚野応答が見られた。通常、聴覚野の神経応答には ON 応答、OFF 応答、持続応答があると言われているが、先行音の刺激により持続応答に対して抑制が働き、二峰性の神経活動が記録されたものとする。また、OFF 反応は ON 反応に比べ反応強度が弱い傾向であった。

(2)周波数変調音に対する処理機構を解明するため、周波数帯域を固定した無限 FM 上昇音、無限 FM 下行音を用いて観察を行った。FM 音刺激時の反応領域を比較したところ、上昇 FM 音のみ、および下行 FM 音のみでは特記すべき事象は認めなかった。変調の変化に対応する反応を計測するために、上昇 FM 音刺激中に急に下行 FM 音に変調方向を変更する

と、同一個体における、一定の高さの音に対応する領域とは異なる領域（既知の UF 領域と DP 領域）に特異的に蛍光変化を認めた。この2領域にトレーサー（ピオチン化デキストラミン）を注入し UF、DP 領域に対応する視床核を追跡すると、一次聴覚野では内側膝状体腹側核の外側部から主に投射を受けていたが、UF 領域では内側膝状体の腹側部と内側膝状体背側核の腹側部から、DP 領域は内側膝状体の尾側寄りの外背側部から投射を受けていた。このことから音の変調情報は音の周波数情報とは別の視床核で処理されることがわかった。

(3) 難聴の進行により高音中心の難聴が生じたマウスでは、軽度から中等度難聴の場合、大脳聴覚野のマップに著明な変化がなかったのに対し、高度難聴まで至った場合には中音域の音に対する反応が強くなった。低周波数の応答領域変化及びマップ変化抑制の方法について継続して追跡中である。

(4) 両側同時に脳活動を計測しつつ両側の耳にイヤープラグを挿入し、一側は音刺激を、対側は無音で計測を行った。一側刺激によって両側の聴覚野に反応がみられたが、刺激側の対側の聴覚野においてより強い神経反応が出現する傾向が見られている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Honma Y, Tsukano H, Horie M, Ohshima S, Tohmi M, Kubota Y, Takahashi K, Hishida R, Takahashi S, Shibuki K. : Auditory cortical areas activated by slow frequency-modulated sounds in mice. (PLoS One. 2013 Jul 17;8(7):e68113.)
査読有

[学会発表](計10件)

山岸達也、塚野浩明、馬場洋徳、本間悠介、大島伸介、窪田和、高橋邦行、高橋姿、澁木克栄：マウス聴覚・視覚連想記憶のM字迷路による解析。(第91回日本生理学大会：2014年3月16日：鹿児島大学郡元キャンパス)

山岸達也、馬場洋徳、本間悠介、大島伸介、窪田和、高橋邦行、澁木克栄、高橋姿：マウス聴覚・視覚連想記憶のM字迷路による解析。(第18回聴覚研究フォーラム：2013年12月14日：同志社びわこリトリートセンター)

S.Ohshima, K.Takahashi, T.Yamagishi, H.Baba, Y.Honma, H.Tsukano, Y.Kubota, R.Hishida, K.Shibuki, S.Takahashi : Cortical depression in the mouse auditory cortex after sound

discrimination learning.

(The 29th Politzer Society Meeting : 2013年11月13日 : Susesi Resort - Antalya, Turkey)

K.Takahashi, H.Baba, Y.Honma, S.Ohshima, Y.Kubota, S.Takahashi : Bilateral functional differences in the mouse auditory cortex using flaboprotein autofluorescence imaging. (2nd Meeting of European Academy of ORL-HNS : 2013年4月27日 : Nice, France)

馬場洋徳、塚野浩明、本間悠介、大島伸介、窪田和、高橋邦行、澁木克栄、高橋姿：マウス聴覚野 OFF 反応のイメージング解析。(第11回側頭骨疾患研究会：2013年1月12日：東京)

馬場洋徳、本間悠介、大島伸介、窪田和、高橋邦行、澁木克栄、高橋姿：先行音持続刺激により出現するマウス聴覚野の二相性応答パターン。(第57回日本聴覚医学会総会・学術講演会：2012年10月12日：国立京都国際会館)

馬場洋徳、塚野浩明、本間悠介、大島伸介、窪田和、高橋邦行、菱田竜一、高橋姿、澁木克栄：マウス聴覚野における二相性 ON-OFF 応答の持続刺激後の出現。(第35回日本神経科学大会：2012年9月21日：名古屋国際会議場)

本間悠介、高橋邦行、塚野浩明、堀江正男、馬場洋徳、大島伸介、窪田和、澁木克栄、高橋姿：マウス大脳聴覚野の周波数変調 (FM) 音処理機構。(第113回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会：2012年5月10日新潟、朱鷺メッセ)

馬場洋徳、塚野浩明、本間悠介、大島伸介、窪田和、高橋邦行、菱田竜一、高橋姿、澁木克栄：ON and OFF responses in the mouse auditory cortex after exposure to long-lasting tone bursts. (第89回日本生理学大会：2012年3月30日：長野県松本文化会館)

馬場洋徳、塚野浩明、本間悠介、大島伸介、窪田和、高橋邦行、菱田竜一、高橋姿、澁木克栄：ON and OFF responses in the mouse auditory cortex disclosed after sound exposure. (第16回聴覚研究フォーラム：2011年12月3日：同志社びわこリトリートセンター)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

窪田 和 (Kubota Yamato)
新潟大学・医歯学総合病院・助教
研究者番号：40547593

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし