

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657054

研究課題名(和文)マウスの超音波発声とその認知を司る神経機構の解明

研究課題名(英文)Neural mechanism of ultrasonic vocalization of mice

研究代表者

西川 淳(Nishikawa, Jun)

北海道大学・情報科学研究科・准教授

研究者番号：20392061

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：マウスの超音波発声は時系列構造を持つことが知られており、その神経メカニズムが注目されている。本研究では、DBA/2Jマウスの超音波発声が老化に伴う難聴に従ってどのように変化するのか調べ、6～8週齢では発達効果により基本周波数が下降していくのに対し、11～13週齢では聴力の低下に伴い基本周波数が上昇(難聴効果)していくことを明らかにした。また、聴覚皮質内における神経情報伝達を解析するために、SAMマウスの聴覚皮質を含む急性スライス切片から多点同時計測を行い、電流源密度解析を用いて電流源の時空間ダイナミクスを可視化した。その結果、深層から浅層へ、そして層に平行に活動伝搬していく様子が得られた。

研究成果の概要(英文)：Ultrasonic vocalization (USV) of mice is composed of a sequence of vocal elements. Therefore, neural mechanism of ultrasonic vocalization has intensely been focused. In this study, we investigated changes in USVs of DBA/2J mice according to hearing loss. As a result, the average fundamental frequency of vocal elements was decreased in 6～8 weeks of mice as developmental effect, while it was increased in 11～13 weeks of mice according to hearing loss. We also executed in vitro experiments for 64-ch multi-site recording from acute brain slices including auditory cortex of SAM mice. Using current source density analysis, we visualized spatiotemporal dynamics in the auditory cortex, which are initial activity propagations from deep to shallow layer, and additional propagations along horizontal direction.

研究分野：神経行動学

科研費の分科・細目：基礎生物学 動物生理・行動

キーワード：超音波発声 マウス 神経科学 聴覚皮質 聴性脳幹反応 難聴 老化促進モデルマウス 電流源密度解析

### 1. 研究開始当初の背景

複雑な時系列規則を持つ発声を獲得する能力は、ヒトのみに備わった言語を操る能力を支えている重要な高次脳機能の一つである。近年、雄のマウスが雌への求愛行動として複雑な時系列規則を持った超音波を発していることが報告されたことにより注目を浴びた。しかしながら、その発声制御や認知に関わる神経機構については未知の部分が多い。本研究では、マウスにおける聴覚発声統合の様式を明らかにすると共に、マウス聴覚皮質における神経応答を分析することにより、言語獲得の神経機構を解明するための哺乳類モデルを確立し、今後目指すべき遺伝子改変動物を用いた遺伝子 - 神経活動 - 行動を繋ぐ統合的研究への試金石とする。

### 2. 研究の目的

本研究では、マウスの超音波発声 (Ultrasonic vocalization: USV) の聴覚発声統合の様式を明らかにすると共に、マウス聴覚皮質における神経活動伝搬の諸特性を明らかにすることを通して、マウスの超音波発声を支える神経機構の一旦を明らかにすることを目的とする。

そのために、加齢性難聴のモデルマウスを用いて聴性脳幹反応 (Auditory brainstem response: ABR) により聴力を評価した上で超音波発声を録音し、老化に伴う聴力の低下が超音波発声の諸特性にどのような影響を及ぼすのか解析する。

また、複数の系統のマウスを用いて、聴覚皮質における神経情報伝達特性を明らかにするために、聴覚皮質を含む急性スライス切片から多点同時計測を行い、電流源密度解析 (Current-source density analysis: CSD) により電流源の時空間ダイナミクスを解析する。

### 3. 研究の方法

聴力の低下に伴う超音波発声の変化を調べる実験では、急速に難聴が進むことが知られている DBA/2J マウスを用いた。内耳除去などのように聴覚をいきなり奪うのではなく、老化に伴う難聴がそうであるように徐々に聴力が低下していく過程で超音波発声にどのような変化が現れるかを調べることに主眼を置いている。発達及び加齢の各段階において超音波発声を録音すると共に、ABR 計測を実施して聴覚閾値を算出することにより聴力を推定して解析を行った。超音波発声の録音は、防音箱の中に雄を単体で孤立させ、雌の尿が付着した紙片をケージ内に入れることで超音波発声を誘発して録音を行った。計測は Ultra-SoundGate 116H 超音波録音システム (Avisoft Bioacoustics) を用いた。超音波発声の解析に音声解析ソフトウェア SASLab Pro (Avisoft Bioacoustics) を用い、必要に応じて

Matlab (MathWorks) で作成した解析プログラムも用いた。聴性脳幹反応の計測には Medusa RA16 生体計測システム (TDT) を用いた。計測されたデータから ABR の閾値を推定する際には、ABR 波形解析ソフトウェア BioSigRP (TDT) を用い、必要に応じて Matlab (MathWorks) で作成した解析プログラムを用いた。

急性スライスを用いた電気生理実験では、老齢のマウスを用いた実験の前段階の実験として、若齢 (7~14 週齢) の通常老化をする SAM-R1 系統、その倍の速度で老化が進んで難聴となる SAM-P1 系統、従来からよく研究されている C57BL/6J 系統のマウスを用いた。ハロタン麻酔を施したマウスの頭部から脳を取り出し、リニアスライサーを用いて coronal 方向に 400  $\mu\text{m}$  の厚さでスライスし、混合ガス (O<sub>2</sub>: 95%, CO<sub>2</sub>: 5%) でバブリングした 28 の人工脳脊髄液 (Artificial cerebrospinal fluid: ACSF) の中に 3 時間入れて回復させた。この聴覚皮質を含む 400  $\mu\text{m}$  の急性スライス切片を 8 × 8 = 64 個の電極がパターンニングされた MED プローブ MED-P515A 上に置き、ACSF を灌流しながら MED システム (アルファメッドサイエンティフィック) の多チャンネルアンプを用いて各記録点における電位変動の多点同時計測を行った。特定の記録点に、-30  $\mu\text{A}$  の振幅で電流パルスを印加し、それに対する応答を各記録点の電位変動として計測した。測定のスプリングレートは 20 kHz で、100 Hz ~ 10 kHz のバンドパスフィルタをかけることで電気刺激に対する神経応答としての LFP (Local field potential) の波形を得た。得られた LFP 波形を空間的にスプライン補完し、CSD 解析を行った。CSD とは、多点計測された細胞外電位から脳内の電流源を推定する手法である。CSD は LFP の空間的な 2 階微分で得られるため、層を貫通する軸以外では電位が均一であるという仮定を用いて近似的に算出した。

### 4. 研究成果

DBA2/J マウスから超音波発声を録音してソナグラムを作成したところ、図 1 のような周波数ジャンプを含む超音波発声を計測することができた。

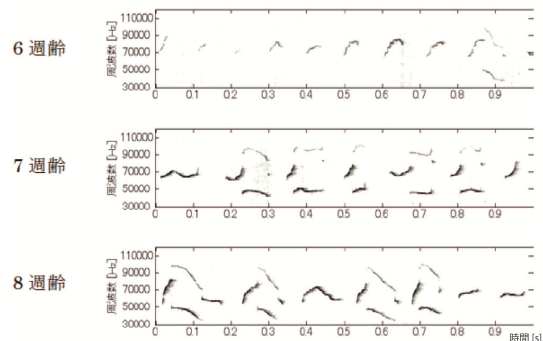


図 1 : 計測された DBA2/J マウスの超音波発声。

これらの個体に ABR 計測を実施したところ、週齢が同じでも聴力の低下の仕方が個体によって分かれることが明らかとなったため、図 2 のように I, II, III, IV の 4 つのパターンに分けて解析を行った。

		発達影響	
		有	無
難聴傾向	無	パターン I	パターン III
	有	パターン II	パターン IV

図 2 : ABR と週齢を元にしたパターン分け。

パターンごとに ABR で推定した聴覚閾値と超音波発声の音要素の基本周波数との関係を調べたところ、6~8 週齢では発達効果により基本周波数が下降していくのに対し、11~13 週齢では聴力の低下に伴い基本周波数が上昇(難聴効果)していくことが分かった(図 3)。これらの結果は、DBA2/J マウスにおける超音波発声の音要素の基本周波数は、発達の影響や聴力低下の影響を(少ないながらも)受けるということを示唆している。

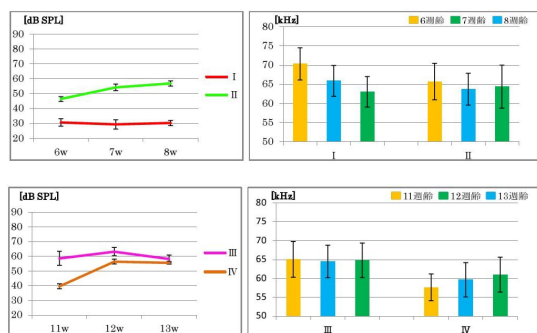


図 3 : ABR により推定した聴覚閾値と USV の基本周波数との関係。

次に、SAM-R1, SAM-P1, C57BL/6J マウスの聴覚皮質を含む脳スライスから in vitro 多点同時計測実験を行った。図 4, 5, 6 は、それぞれのシステムを用いた実験結果の代表例をまとめたものである。左から、計測した脳スライスの中の位置に多点電極が置かれたかが分かる写真、刺激点に電気刺激を行った際の LFP 波形、それから計算される CSD 波形、CSD の時間発展をカラーマップとして表現したものを示した。その結果、皮質の各層に応じた電流源密度分布が時間発展する様子をとらえることができたが、若齢条件ではこれらの 3 つの各システムの応答特性間に有意な差が見られないことが分かった。

より詳細に CSD を比較するために、各層ごとに平均化した解析も行ったが、やはり系統間に一貫した差異は見られなかった。この状況が、老化が進むことにより様々な部分に差が現れると考えている。

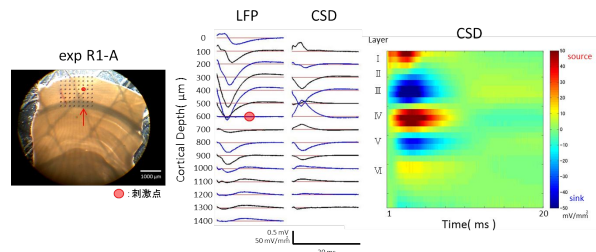


図 4 : SAM-R1 マウスにおける多点 LFP 計測及び CSD 解析の代表的な結果。左から、脳スライスと各記録点の位置、LFP 波形、CSD 波形、CSD の時間発展のカラーマップを示している。

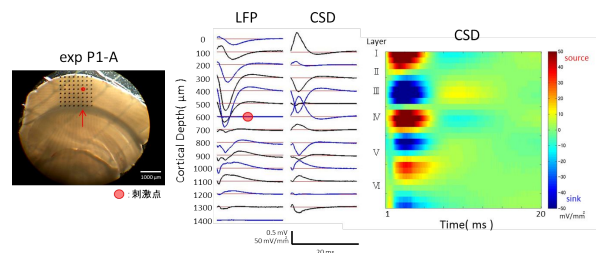


図 5 : SAM-P1 マウスにおける同様の結果。

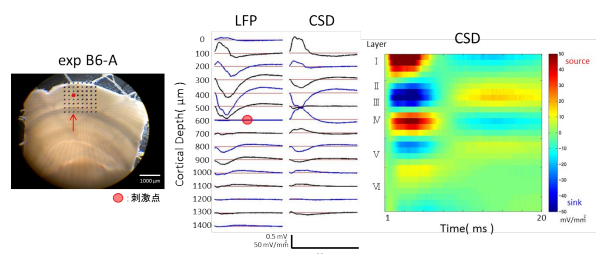


図 6 : C57BL/6J マウスにおける同様の結果。

## 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)

J. Nishikawa and K. Okanoya, "Cantor coding of song sequence in the Bengalese finch HVC," *Advances in Cognitive Neurodynamics (III)*, 査読有, pp. 629 – 634, (2013).

〔学会発表〕(計 8 件)

J. Nishikawa, M. Noto, H. Kitamura, T. Tateno, "Unidirectional dual- component propagation of neural activity evoked by sound and electrical stimulation in rat multiple auditory cortical fields revealed by optical imaging with voltage-sensitive dye," *The 43rd Annual Meeting of the Society for Neuroscience (Neuroscience 2013)*, San Diego, California, USA, November. 9-13, 2013.

H. Kitamura, J. Nishikawa, T. Tateno, "Multi-electrode array recording of propagation of activity evoked by electrical micro-stimulation in horizontal and coronal slices of the mouse auditory cortex," *The 43rd Annual Meeting of the Society for Neuroscience (Neuroscience 2013)*, San Diego, California, USA, November. 9-13, 2013.

能登将成, 西川淳, 舘野高, "ラット聴覚野における聴覚誘導に関連した神経活動: 膜電位感受性色素を用いた光計測による検討," *社団法人 日本音響学会聴覚研究会*, 豊橋市, 愛知県, 2013年11月28~29日.

西川淳, 能登将成, 北村宏幸, 舘野高, "ラット聴覚皮質における機能的な異方性: 音及び電気刺激に対する神経活動伝搬方向の解析," *電気学会 電子・情報・システム部門大会*, 北見市, 北海道, 2013年9月4~7日.

西川淳, 能登将成, 舘野高, "音及び電気刺激が誘発するラット聴覚皮質の神経活動伝搬特性-膜電位感受性色素による光計測," *第36回 日本神経科学大会 (Neuro 2013)*, 京都市, 京都府, 2013年6月20日~23日.

北村宏幸, 紺野雄輝, 西川淳, 舘野高, "急性海馬スライスにおける局所電気刺激に対する誘発応答の多点記録—標準及び逆電流源密度解析法の評価—," *電気学会 電子・情報・システム部門大会*, 弘前大学, 青森県, 2012年9月5日~7日.

H. Kitamura, J. Nishikawa, and T. Tateno, "Hybrid-type computational modeling of the peripheral auditory system using a piezoelectric acoustic sensor as a front-end transducer for sound processing," *The 8th FENS Forum of Neuroscience*, Barcelona, Spain, July. 14-18, (2012).

H. Kitamura, J. Nishikawa and T. Tateno, "Developing a thin-film electrode system to record in-vivo cortical responses evoked by an artificial peripheral auditory device," *MEA Meeting 2012 8th International Meeting on Substrate-Integrated Microelectrode Arrays*, Reutlingen, Germany, July. 10-13, (2012).

{図書}(計 0 件)

{産業財産権}

○出願状況(計 0 件)  
○取得状況(計 0 件)

{その他}

ホームページ等  
<http://tt-lab.ist.hokudai.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西川 淳 (NISHIKAWA, Jun)  
北海道大学・大学院情報科学研究科・准教授  
研究者番号: 20392061

(2) 研究分担者

無し.

(3) 連携研究者

無し.