

平成30年 5月25日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05683

研究課題名(和文) 医工連携により創製する画期的光学測定系を駆使した内耳振動現象の統合的解析

研究課題名(英文) Analysis by a new imaging system for three-dimensional detection of nanoscale vibrations in the inner ear

研究代表者

任 書晃 (Nin, Fumiaki)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：80644905

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,500,000円

研究成果の概要(和文)：新規断層イメージング装置を用いて、生きたモルモットの感覚上皮帯の微小振動の計測を達成した。さらに本研究では、新たに派生したレーザー振動計を用いて、「振動中心のナノスケールのずれ」を計測することにも世界で初めて成功した。このレーザー振動計による実験結果を元に、上皮帯振動が有毛細胞の機能に依存すると仮定し、感覚上皮帯振動の数理モデルを構築した。加えて、その仮定が正しいことを、生動物を用いた薬物投与実験によって確認した。これらの成果は、感覚上皮帯が持つ新たな振動機構を初めて実証したのみならず、その機構には有毛細胞機能が密接に関わっていることを世界で初めて見出したものである。

研究成果の概要(英文)：We have developed an imaging system that can detect the object's nano-scale vibrations. In addition, we succeeded to record a baseline shift of the vibration by a newly derived laser interferometer. Based on the recorded data, we hypothesized that the vibrations depend on the hair cells' function, and performed mathematical simulation of the sensory epithelia. Lastly, we confirmed the hypothesis by the experiments in which we used animals and applied some drugs in vivo. These results not only show the new mechanism for the vibration of the sensory epithelia, but also found that the mechanism are related to the hair cells' function for the first time.

研究分野：聴覚生理学

キーワード：ナノ微小振動 蝸牛 感覚上皮帯 内耳

1. 研究開始当初の背景

外界からの音は、外耳・中耳を通り内耳の蝸牛へ到達する。蝸牛に入った音は、基底板という膜状組織にナノレベルの微小振動を伴う進行波を発生する。この「基底板進行波」に呼応して基底板上に分布する感覚細胞の有毛細胞が電気興奮し、信号が脳へと伝わる。従って、基底板進行波は聴覚の端緒である。基底板上のコルチ器には、有毛細胞を含んだ数種の細胞が層状に分布する。

以前より、聴覚には音刺激を非線形に増幅して感知する器官機能が備わっていることが知られてきた。すなわち、小さな入力音をより大きく増幅して外界からの微小音を敏感に感知する機能である。これまでに、この非線形増幅が障害されると難聴が誘引されること、基底板の微小振動が非線形性を持つことが判明している。さらに近年、有毛細胞が増幅機構の起源であり、単離した外有毛細胞に観察される2つの動作がその非線形性に関わることが指摘されてきた。1つは細胞体の電位が上昇すると細胞長が短縮する「外有毛細胞の伸縮能」であり、これはモータータンパク質であるプレスチンによって実現される。もう1つは外有毛細胞の「感覚毛の自動能」である。これは感覚毛に発現するアクチン・ミオシンとCa²⁺の結合により制御される。

現在、測定技術の限界により、有毛細胞の2つの動的生理現象が生体内で観察できないため、個々の細胞の動作が如何に隣接する他の細胞の挙動と共役し、その結果、コルチ器の振動、ひいては、基底板進行波に認められる非線形性を実現するのかが理解されていなかった。

2. 研究の目的

この聴覚の根幹の一つである課題を解決するため、本研究では、生動物において、基底板進行波と有毛細胞の動作を精密に同時測定する新規光学断層イメージング機器を開発する。この革新的な計測機器を駆使し、種々の条件での生体計測を実行する。これまでに、有毛細胞の振動には、質量(m)・粘性(λ)・弾性(k)といった細胞周囲の「物理パラメータ」が影響することが予想されている。そこで、実験データから、数理計算を用いて特定の物理量を解析し、有毛細胞機能の成立メカニズムを物理パラメータを含めて定量的・理論的に明示する。本計画では、光学研究者と海外の理論物理学者から支援を受けながら、申請者が生体計測と数理計算を実行し、所期の目的を達成する。

3. 研究の方法

具体的には、光学研究者と共同して「光コム」を用いた断層イメージング機器を開発する。光コムとは、搬送波としての光に楕状の非連続な周波数(コム; Comb)を持たせることで、これまでにな

い振動検知分解能と空間分解能を同時に実現する次世代の広域多波長走査法である。次に、開発した計測器を用いて、生動物内における有毛細胞の振動動態を計測する。有毛細胞の機能分子を阻害した条件下や難聴モデル動物においても、これを把握する。さらに、理論物理学者のアドバイスを得て、実験データから、その変化を物理量「力学的インピーダンス」として算出し、解析する。力学的インピーダンスとは、刺激に対する動き難さ(抵抗)である。正の値は、無生物的・受動的な動きを意味し、負の値は、生体がエネルギーを消費して振動を増幅していること示す。この解析から、有毛細胞動態を修飾する物理的条件を抽出し、基底板進行波の非線形増幅への有毛細胞の寄与を定量化する。以上により、聴覚で最も重要かつ特徴的な音受容の非線形性の成立機構を細胞レベルで定量的に理解し、難聴の病態解明の端緒とする。

4. 研究成果

生動物の基底板進行波を「細胞レベルで明確に」捉えるため、Super luminescent diode (SLD) 光源、多波長走査フィルタ、電圧駆動装置、CMOS カメラ、データ取得制御システム、スピーカシステム、干渉顕微鏡からなる新規光学イメージング装置、MS en-face OCT (図1) を創製。生体計測へと最適化した。

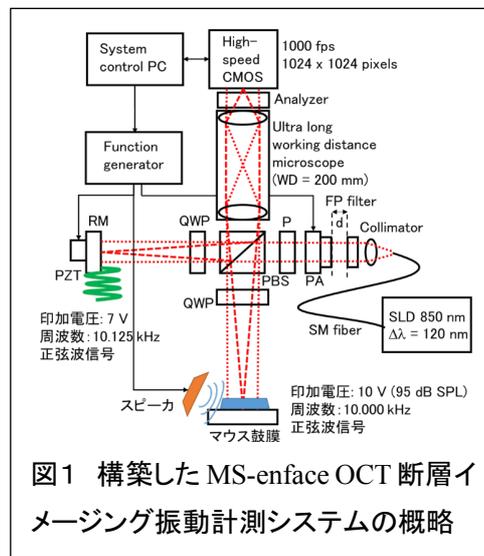
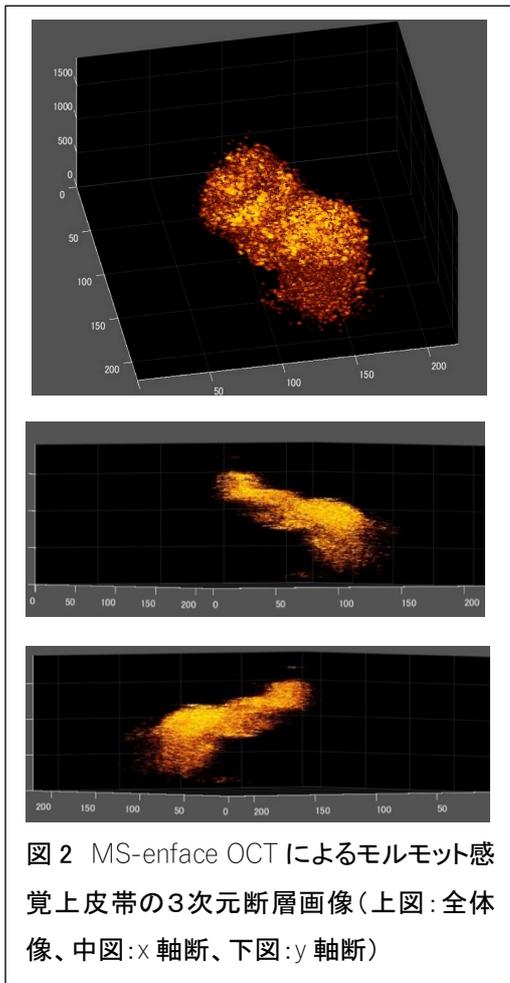


図1 構築した MS-enface OCT 断層イメージング振動計測システムの概略

(A) モルモット感覚上皮帯の3次元断層イメージング

標本として用いた基底板及びコルチ器の計測において達成した研究成果を以下に記す(図2)。モルモット感覚上皮帯の3次元断層イメージングを行った。測定時のノイズを低減するため、当初は死後動物を用いた計測を行った。そこで、性能の動作確認を行い、生動物下での計測を試みた。

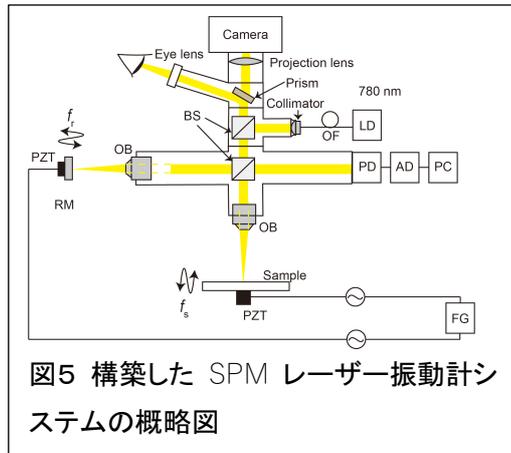
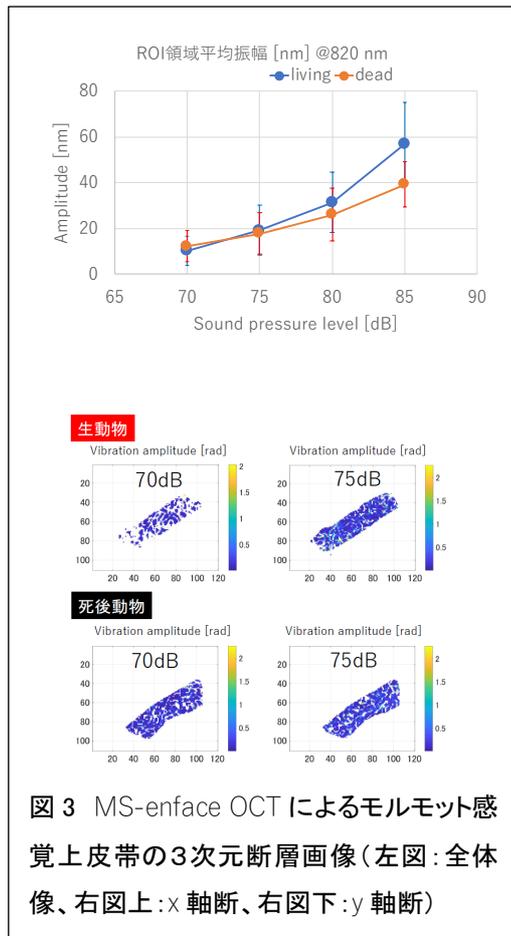


(B) モルモット感覚上皮帯の2次元微小振動計測

生きたモルモットに音を与えて感覚上皮帯を揺らし、その振動の振幅の分布を計測した。実験では、超音波マイクロフォンで動物に与える音を精密にモニターした。音圧 70~85 dB・周波数 23 kHz の純音を、動物に印加した。さらに、動物の死後、同様の計測を行い、生動物にのみ観察される感覚上皮帯振動の増幅を確認した。図3に得られた結果を示す。計測された振動の振幅は 10 ~ 80 nm であり、その分布は感覚上皮帯の帯に限局的であった(図3)。

当初、新規光学イメージング装置を用いた生体計測を実現するための生体ノイズの制御を目的として、動物の麻酔や頭部固定、取得信号の解析手法などの生体計測の経験を蓄積した。その過程において、以下の達成事項と一つの派生技術が得られた。

1) 新規レーザー振動計の構築と微小振動の一点計測



従来の計測装置であるレーザー振動計を独自に構築し、微小振動の一点計測を可能とした。ドップラーシフト解析法を活用した測定方式に基づく汎用型レーザー振動計は、すでに確立された装置である。実際、様々な会社からこの装置を購入することが可能である。しかし多くは工業用として造られた製品であり、研究者が装置内部を改変して生体計測に最適化することは非常に困難である。そこで我々は、微小振動計測法の原理に立ち戻り、過去の工学系論文に発表されている手法(Sinusoidal Phase Modulation 法: SPM 法)に立脚した振動計測機器を独自に創出した(SPM レーザー振動計:図5)。ここで用いられている方法は、高速フーリエ変換(FFT)を行う機構が必要であるため、これまでにほとんど応用され

ていなかった。近年に高性能化されたコンピュータや高感度化されたセンサーを搭載することで、以下に示すように従来のレーザー振動計と同等の性能が得られた。また、この計測機器には、比較的安価な光学素子を組み合わせることによって容易に構築できる特徴もある。

2) SPMレーザー振動計を用いたミラーの微小振動の計測

SPMレーザー振動計を用いて、ミラーの振動をサブナノスケールで捉えることに成功した。測定可能な周波数帯域として1 kHz ~ 70 kHz、この範囲における振幅の測定下限として40 pmを確認した。この性能は、汎用型レーザー振動計の性能と同等またはそれを凌駕する(図6)。

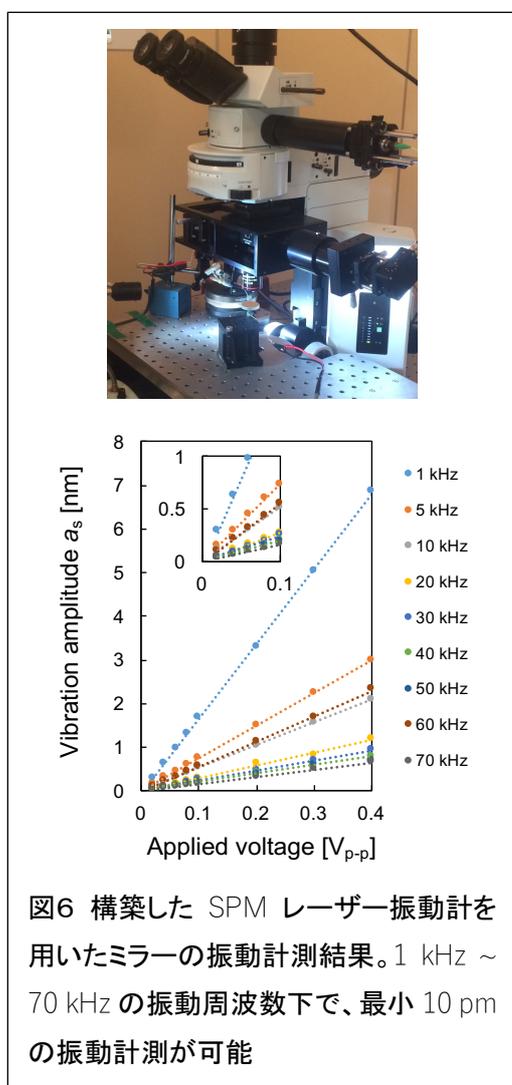


図6 構築した SPM レーザー振動計を用いたミラーの振動計測結果。1 kHz ~ 70 kHz の振動周波数下で、最小 10 pm の振動計測が可能

3) SPMレーザー振動計を用いた生動物の感覚上皮帯の計測

動物への全身麻酔に従来用いていた薬剤は、

より聴力への影響の少ないウレタンへ変更した。さらに、市販品を用いていた頭部固定装置は、より強固に頭部固定が可能な独自の装置に変更した。さらに、蝸牛開窓技術にも習熟した。これらの改善点により、手術前後で聴力の変化を最小限に抑えることに成功した(図7)。以上の経験を基に、SPMレーザー振動計を用いて生動物の感覚上皮帯のナノ振動を計測した。感覚上皮帯上に反射物体を留置しない微小振動計測は、本邦で初めての成功である。上皮帯振動の振幅の測定下限は200 pm、振動の測定周波数の上限は35 kHzを確認した(図8)。

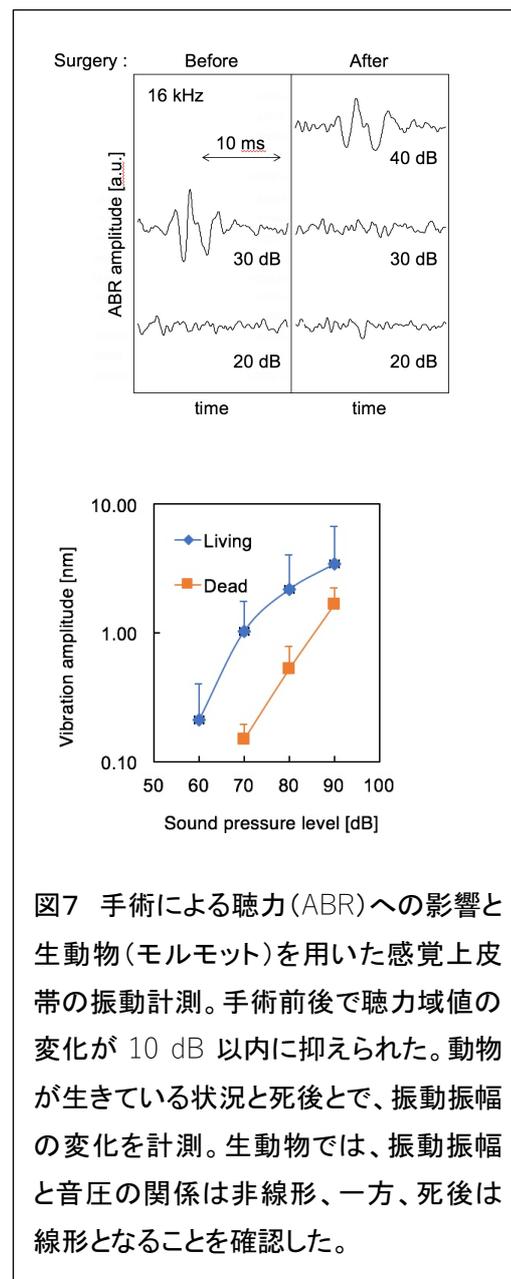


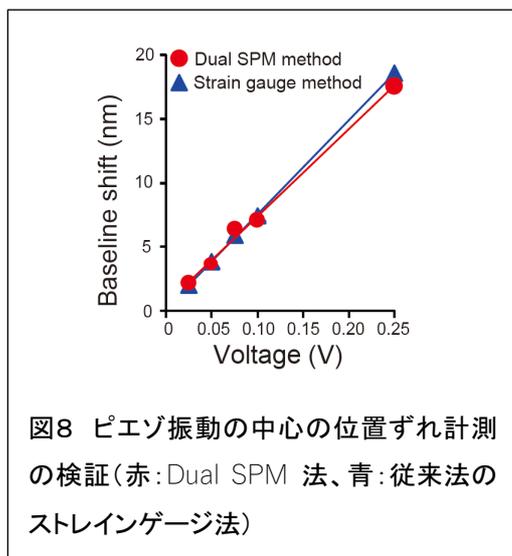
図7 手術による聴力(ABR)への影響と生動物(モルモット)を用いた感覚上皮帯の振動計測。手術前後で聴力域値の変化が 10 dB 以内に抑えられた。動物が生きている状況と死後とで、振動振幅の変化を計測。生動物では、振動振幅と音圧の関係は非線形、一方、死後は線形となることを確認した。

4) 「振動の中心位置のずれ」を計測できる画期的新規振動計測装置の開発

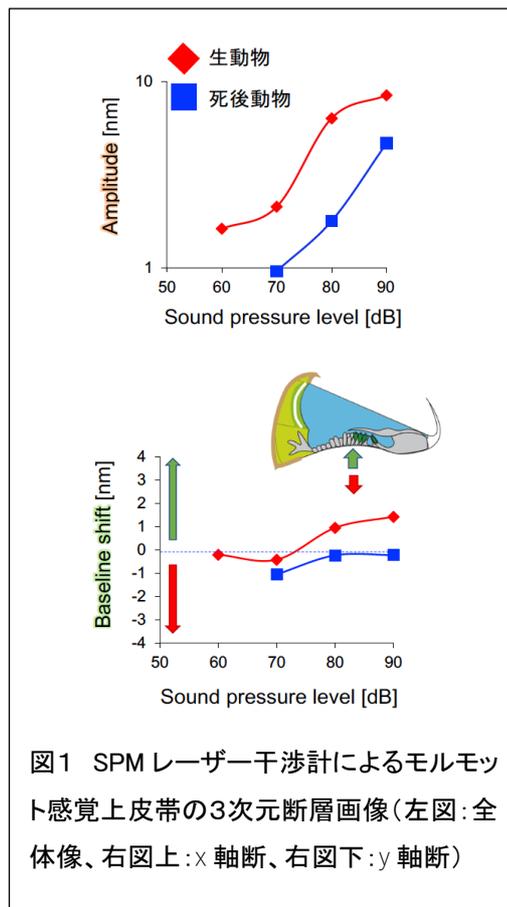
従来の汎用型レーザー振動計では、ドップラーシフト解析法を用いて、振動の「振幅」を求める。我々は、この振動計では捉えられなかった振動の「中心位置のずれ」に着目した。このパラメータは、前述のSPM方式の解析過程において得られるFFTシグナルを利用することで得られる。計算方法や装置の調整により、我々のSPMレーザー振動計では、対象物の「振幅」を測定下限10 pm、「中心位置のずれ」を測定下限1 nmの精度で“同時”に計測可能となった。

5) 新規振動計測装置による「振動の中心位置のずれ」の生体計測

振動振幅および振動中心の位置ずれの度合いをあらかじめ既知とするピエゾ素子を用いて動作確認を行った。図8に位置ずれ量を他の測定手法で検証した結果を示す。40 pmの振動振幅限界を確認すると共に、位置ずれ最小値約 1 nmを達成した。



モルモットに音波を与え、感覚上皮帯の振動振幅と振動中心の位置ずれの計測を行った。実験では、音圧50~90 dB・周波数21 kHzの純音を、超音波マイクロフォンでモニターしながら印加した。図9に得られた結果を示す。70 dB以上の大きな音圧の時にのみ、約1~2 nmの振動中心の位置ずれが計測された。この振動現象は、死後の動物では観察されなかったことから、生物が独自に持つ新しい生体の振動現象であることが確認された。



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 4 件)

- 1) Choi S, Watanabe T, Suzuki T, Nin F, Hibino H, Sasaki O. Multifrequency swept common-path en-face OCT for wide-field measurement of interior surface vibrations in thick biological tissues. *Opt Express* 23(16):21078-21089 2015.
- 2) Choi S, Maruyama Y, Suzuki T, Nin F, Hibino H, Sasaki O. Wide-field heterodyne interferometric vibrometry for two-dimensional surface vibration measurement. *Opt commun*, 356:343-349 2015.
- 3) Choi S, Sato K, Ota T, Nin F, Muramatsu S, Hibino H. Multifrequency-swept optical coherence microscopy for highspeed full-field tomographic vibrometry in biological tissues. *Biomed Opt Express* 8(2):608-621 2017.
- 4) Sato MP, Higuchi T, Nin F, Ogata G, Sawamura S, Yoshida T, Ota T, Hori K, Komune S, Uetsuka S, Choi S, Masuda M, Watabe T, Kanzaki S, Ogawa K, Inohara H, Sakamoto S, Takebayashi H, Doi K, Tanaka KF, Hibino H. Hearing loss controlled by optogenetic stimulation of nonexcitable nonglial cells in the cochlea of the inner ear. *Front Mol Neurosci* Sep 21, 2017 doi: 10.3389/fnmol.2017.00300.

[学会発表] (計 17 件)

- 1) Choi S, Nin F, Hibino H, Suzuki T. Optical multifrequency swept sensing for wide-field vibration measurement of interior surfaces in biological tissue. Biophotonics Japan. 2015 Oct 27 ~ Oct 28, University of Tsukuba, Tokyo Campus, Tokyo, Japan.
- 2) Choi S, Sato K, Nin F, Hibino H. 3D tomographic

- measurement of interior surface vibrations in thick biological tissue using multifrequency sweepable optical comb. 2016 Collaborative Conference on 3D and Materials Research (CC3DMR), 2016 June 20~24, Incheon, Korea
- 3) Choi S, Nin F, Suzuki T, Hibino H. Wide-field heterodyne en-face OCT system for vibration measurement of internal surfaces. CLEO-PR 2015, 2015 Aug 24~28, Pusan, Korea
 - 4) Choi S, Nin F, Hibino H, Suzuki T. Optical multi-frequency swept sensing for wide-field vibration measurement of interior surfaces in biological tissue. SPIE/OSJ Biophotonics Japan 2015, 2015 Oct 27~28, Tokyo, Japan
 - 5) Choi S, Nin F, Hibino H. 3D tomographic measurement of interior surface vibrations in thick biological tissues using multifrequency swept optical comb. Collaborative conference on 3D and materials research (CC3DMR), 2016 June 20-24 (22), Incheon, South Korea.
 - 6) Choi S, Nin F, Ota T, Sato K, Suzuki T, Hibino H. Multi-frequency swept en-face optical coherence microscopy with supercontinuum comb for in-vivo measurement of inner ear (Invited) OIE17 2017 Sep 12-15 (12), Sado, Japan.
 - 7) Choi S, Nin F, Ota T, Sato K, Suzuki T, Hibino H. Multi-frequency swept en-face optical coherence microscopy with supercontinuum comb for in-vivo measurement of inner ear (Invited) The 7th Korea-Japan Workshop on Digital Holography and Information Photonics (DHIP2017) 2017 Dec 20-22 (21), Daegu South Korea.
 - 8) 崔 森悦, 任 書晃, 太田 岳, 日比野 浩. 生体内ナノ振動計測を目指した多波長走査型 *en-face* OCT の開発. 第 58 回光波センシング技術研究会 2016 年 12 月 8 日 (木) ~9 日 (金)、発表 8 日 (木)、森戸記念館, 東京
 - 9) 太田 岳, 崔 森悦, 任 書晃, 日比野 浩. 二重正弦波位相変調法を用いた生体ナノ振動計測技術の開発. 口頭発表: 第 58 回光波センシング技術研究会講演会 2016 年 12 月 8 日 (木) ~9 日 (金)、発表 8 日 (木)、森戸記念館, 東京
 - 10) 崔 森悦, 任 書晃, 太田 岳, 日比野 浩. 多波長走査型 OCT による生体内振動計測. レーザー学会学術講演会第 37 回年次大会 2017 年 1 月 7 日 (土) ~9 日 (月)、発表 9 日 (月)、徳島大学、徳島
 - 11) 太田 岳, 崔 森悦, 任 書晃, 日比野 浩. 内耳蝸牛に生じるナノ振動計測のためのレーザー干渉計の作製および技術展開. 口頭発表: 第 68 回日本薬理学会北部会 2017 年 9 月 15 日 (金) ~16 日 (土)、発表 16 日 (土)、山形テルサ, 山形
 - 12) 太田 岳, 崔 森悦, 任 書晃, 日比野 浩. 内耳ナノ振動を標的としたレーザー干渉計の作製と技術展開. 口頭発表: 第 64 回中部日本生理学会 2017 年 10 月 6 日 (金) ~7 日 (土)、発表 7 日 (土)、山梨県立図書館, 山梨
 - 13) 崔 森悦, 任 書晃, 太田 岳, 佐藤 敬太, 日比野 浩. 生きた感覚上皮帯の 3 次元振動分布計測のためのスーパーコンティニウム多波長走査型 *en-face* OCT 顕微鏡. 口頭発表: 日本光学会 OPJ2017 2017 年 10 月 30 日 (月) ~11 月 2 日 (木)、発表 11 月 1 日 (水)、筑波大学東京キャンパス、東京
 - 14) 崔 森悦, 任 書晃, 太田 岳, 佐藤 敬太, 日比野 浩. 多波長走査型光干渉顕微鏡による in-vivo 内耳感覚上皮帯振動計測. 口頭発表: 第 60 回光波センシング技術研究会講演会 2017 年 12 月 5 日 (火) ~6 日 (水)、発表 6 日 (水)、森戸記念館, 東京
 - 15) 崔 森悦, 任 書晃, 太田 岳, 佐藤 敬太, 日比野 浩. 多波長走査型干渉顕微鏡を用いた広視野 in-vivo 蝸牛基底板の振動計測. 口頭発表: 応用物理学会春季学術講演会、2018 年 3 月 17 日 (土) ~20 日 (火)、発表 19 日 (月)、早稲田大学西早稲田キャンパス、東京
 - 16) 太田 岳, 崔 森悦, 任 書晃, 日比野 浩. 内耳蝸牛の感覚上皮帯に生じるナノ振動の特性: 改良型レーザ干渉計による検討. 口頭発表: 第 95 回日本生理学会大会 2018 年 3 月 28 日 (水) ~30 日 (金)、発表 29 日 (木)、サンポートホール高松, 香川
 - 17) 任 書晃, 崔 森悦, 太田 岳, 日比野 浩. 内耳感覚上皮ナノ振動の 3 次元計測を志向した新規光干渉顕微鏡の創製. 口頭発表: 第 95 回日本生理学会大会 2018 年 3 月 28 日 (水) ~30 日 (金)、発表 29 日 (木)、サンポートホール高松、高松シンボルタワー香川
- 〔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
- ## 6. 研究組織
- (1) 研究代表者
- 新潟大学医学部 分子生理学
准教授 任 書晃
025 (227) 2073
研究者番号: 80644905
- (2) 研究分担者 なし
(3) 連携研究者 なし
(4) 研究協力者
- 新潟大学医学部 分子生理学
教授 日比野 浩
025 (227) 2073
- 新潟大学工学部 電気電子工学科
助教 崔 森悦
025 (262) 6761
- インペリアルカレッジ・ロンドン
Lecture Tobias Reichenbach