

令和 3 年 8 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07345

研究課題名(和文)聴覚皮質における多点電気刺激による耳鳴り抑制法の基盤技術開発

研究課題名(英文) Development of Tinnitus Suppression Method by Multi-site Electric Stimulation in the Auditory Cortex

研究代表者

西川 淳(Nishikawa, Jun)

北海道大学・情報科学研究院・准教授

研究者番号：20392061

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、耳鳴りにおける聴覚皮質の関与を詳細に明らし、それに基づいた脳刺激による新規の耳鳴り抑制法を開発することである。まず、フラビンタンパク質蛍光イメージングおよび多点電極測定を用いて、マウス聴覚皮質の各サブ領域および層の神経細胞の活動特性の耳鳴り状態に応じた変化を解析したところ、聴覚皮質における興奮-抑制バランスが変化することを見出した。さらに、電気および磁気を用いた脳刺激法により、聴覚皮質神経活動を誘発したり、可塑的变化も誘発させたりすることができることを示した。これらの成果により、新しい耳鳴り抑制法の開発に必要な基盤技術を確立することができたと考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

耳鳴りは、実際には存在していない音を知覚してしまう病態であり、難聴と並んで主要な耳疾患である。日本の高齢人口の約12～13%が耳鳴りと推計され、音響療法、薬物療法、電気療法等が試行されているにも関わらず、耳鳴りの神経メカニズムの解明も根本的な治療法も現時点では確立されていない。本研究から得られた成果により、モデル動物における耳鳴りの神経メカニズムが詳細に解明されるとともに、電気および磁気による脳刺激法を用いた新規耳鳴り抑制法が実現されることで、将来的にはヒトにおける臨床試験への応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The goal of this study was to elucidate the involvement of the auditory cortex in tinnitus in detail and to develop a novel tinnitus suppression method based on the brain stimulation methodology. Here, we adopted a flavin protein fluorescence imaging and multi-electrode array to record and analyze how the activity of neurons in each subfield and layer of the mouse auditory cortex changes related tinnitus. We revealed the excitatory-inhibitory balance were changed according to the condition of tinnitus. In addition, we developed new electrical and magnetic brain stimulation methods, and elicited neuronal responses which is almost identical to the auditory responses. We also showed such kind of brain stimulation elicit plastic changes in the auditory responses. These results provide the basic technology necessary for the development of a new tinnitus suppression method.

研究分野：神経工学、聴覚神経科学、ブレインマシンインターフェース

キーワード：耳鳴り 聴覚皮質 驚愕応答 多点同時計測 多点電気刺激

1. 研究開始当初の背景

耳鳴りは、実際には存在していない音を知覚してしまう病態である。最近の統計によると、日本の高齢人口の約 13%、アメリカの一般人口の約 5~15%が何らかの耳鳴り症状に悩まされているとの報告がある。耳鳴りは、その慢性的な不快感から、不眠やうつ病などの精神疾患を誘発して重篤な病態へ陥ることも多く、根本的な治療法が求められている。しかしながら、現在、音響療法、薬物療法、電気療法が耳鳴りの治療法として試行されているにも関わらず、その効果は限定的であるとされている。

根本的な治療法が確立できないのは、耳鳴りの神経メカニズムの大部分が解明されていないからであり、このような背景から、耳鳴り動物モデルを用いた神経回路・細胞・分子レベルの研究が注目されている。近年、こうした動物モデルを用いた一連の研究から、末梢系における耳鳴りの疾患原因が徐々に明らかになりつつあるが、上位の聴覚中枢系の耳鳴り機序については未だに不明な点が多い (Auerbach et al., *Front. Neurol.*, 2014)。抹消系以外に目を向けると、聴覚皮質 (大脳皮質聴覚野) が重要な役割を担っていると考えられているが、聴覚皮質の中でも、各サブ領域 (A1, AAF, A2 等) や各層 (1~6 層) ごとに、耳鳴りに関わる神経活動特性がどのように生じているかについては明らかにされていない。

本研究では、耳鳴りモデルマウスの聴覚皮質において、フラビントタンパク質蛍光イメージングを用いてサブ領域を、多点電極測定により層を同定した上で、正常な状態と耳鳴り状態における神経活動特性の差異を神経細胞レベルで詳細に解析する。さらに、そこで得られた知見に基づき、電気刺激および磁気刺激による耳鳴り抑制の基盤技術を開発する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、耳鳴りにおける聴覚皮質の関与を詳細に明らかにするとともに、電気刺激および磁気刺激を用いた新規の耳鳴り抑制法を開発することである。従来の電気治療では、聴覚皮質における機序の詳細が分からない状況で、頭皮上電極への電気刺激のパラメータを探索的に見つけ出すという現象論的なアプローチであったため、根本的な治療法には至らなかった。本研究では、耳鳴りモデルマウスの聴覚皮質において耳鳴りによって生じる神経活動の特徴を詳細に解析した上で、電気刺激や磁気刺激による耳鳴り抑制の開発へと繋げようとするところに特色がある。

3. 研究の方法

耳鳴りモデルマウス作成法 (Hayes et al., *Front. Neurol.*, 2014) としては、サリチル酸ナトリウム投与 (Sodium Salicylate: SS, 200 mg/kg B.W.) と音響暴露 (100 dB SPL, 10 kHz, octave band) とを用いた。SS 投与による耳鳴りモデルマウスと音響暴露による耳鳴りモデルマウスに生じている耳鳴り症状を客観的に推定するために、音響驚愕反射ギャッププレパルス抑制 (GPIAS, Turner et al., *Behav. Neurosci.*, 2006) を行動測定した。そのために必要な音響刺激系および驚愕応答計測装置は独自に作成し、耳鳴りモデルマウスの耳鳴り判別が可能であることを確認した。背景雑音の中心周波数を変化させた際の GPIAS 測定の結果から、それぞれの条件における耳鳴り周波数についても推定した。

電気生理実験では、マウス (C57BL/6J, 8~13 週齢, 日本 SLC) に深麻酔 (ウレタン, 1500 mg/kg B.W.) を施し、フラビントタンパク質蛍光イメージング (MiCAM02, Brainvision) を用いてマウス聴覚皮質のサブ領域を同定 (Nishikawa et al., *J. Neurosci. Meth.*, 2018) した。その後、それぞれのサブ領域に合わせて、16-ch シリコン電極 (A1x16-5mm-50-177-A16, NeuroNexus) を刺入することにより、各サブ領域および層から多点同時神経活動計測 (OmniPlex, Plexon) を実施し、GPIAS で用いている音刺激 (雑音中の gap) に対する聴覚応答を計測した。得られた多チャンネル電位波形データにスパイクソーティング (KlustaKwik, Harris et al., *J. Neurophysiol.*, 2000; Spikeinterface, Buccino et al., *eLife*, 2020) を実施し、抽出した各ユニットの gap に対する onset 応答と offset 応答を算出し、通常の状態と耳鳴り状態における差異を詳細に解析した。

新規耳鳴り抑制法の開発に必要となる、電気刺激および磁気刺激法の基盤技術開発も実施した。電気刺激では、聴覚皮質への多点電流刺激により、聴覚応答を模倣させることを試みた。さらに、聴覚皮質への電気刺激により聴覚皮質神経細胞の聴覚応答特性を可塑的に変化させる方法を開発した。磁気刺激では、微細加工技術により新規のマイクロサイズ磁気刺激プローブを試作し、その脳刺激機能を生理実験により評価した。

4. 研究成果

まず、サリチル酸ナトリウム (SS) 投与による耳鳴りモデルマウス (C57BL/6J, n=5 mice) において、GPIAS を用いて耳鳴り症状を行動評価した (図3右)。その結果、SS 投与前後で、16 kHz の背景雑音の際にのみ抑制率 (GPIAS ratio) に差が見られた ($P < 0.05$, paired t-test)。これは、SS 投与により、16 kHz の耳鳴りを生じているということを意味している。

次に、同一のマウス (n=5 mice) において、麻酔下の急性電気生理実験を実施し、GPIAS 測定で用いている音刺激 (雑音中の gap) に対する聴覚神経応答を計測した。スパイクソーティングの結果、isolation distance (Li et al., 2018) が 15 以上のシングルユニットが合計 339 ユニット得られた。さらに、スパイクの波形分析により、約 7:3 の割合で興奮性細胞と抑制性細胞を推定することができた。図1は、興奮性細胞と抑制性細胞と推定されたスパイク波形 (左) と、それぞれの場合の gap に対する onset 応答および offset 応答である (右)。図1で分かるように、gap に対する聴覚応答は gap の始まり (onset) と gap の終わり (offset) で生じた。聴覚応答は興奮性細胞と抑制性細胞どちらにも見られたが抑制性細胞のほうがより強く鋭い応答を示した。また、どちらの細胞種も基本的に offset に対して強い応答を示した (図1右)。

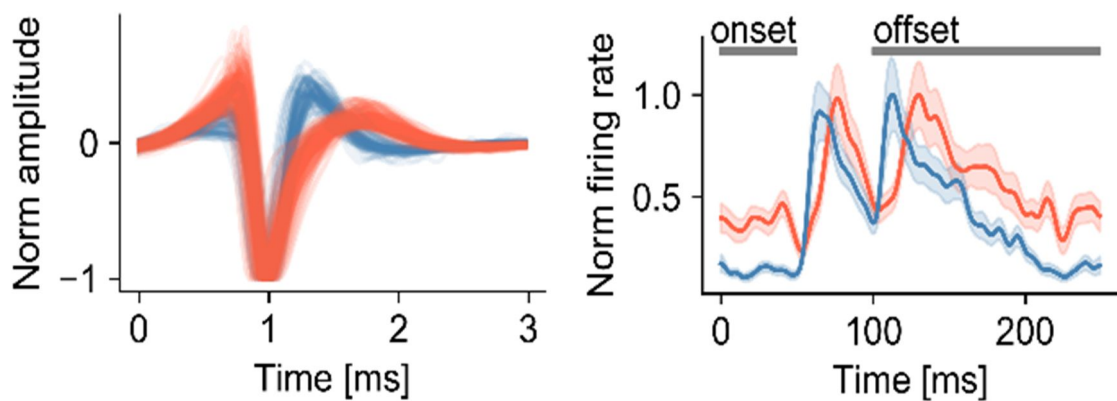


図1. 分類した興奮性細胞と抑制性細胞のスパイク波形の重ね描き(左図)。Gap 音に対する聴覚応答(右図)。赤: 興奮性細胞。青色: 抑制性細胞。

さらに、サリチル酸投与前後の gap 応答を onset と offset に対する活動比 (offset / onset ratio) で比較した (図2)。図2で分かるように、その結果、背景雑音 16 kHz に埋め込まれた gap に対する応答が細胞種ごとに逆の変化を示した。興奮性細胞は offset が onset に対して強く応答するユニットの割合が増え、抑制性細胞は逆に onset が offset に対しての応答が強くなり onset と offset に対する活動の大きさが近づいた ($P < 0.05$, paired t-test)。

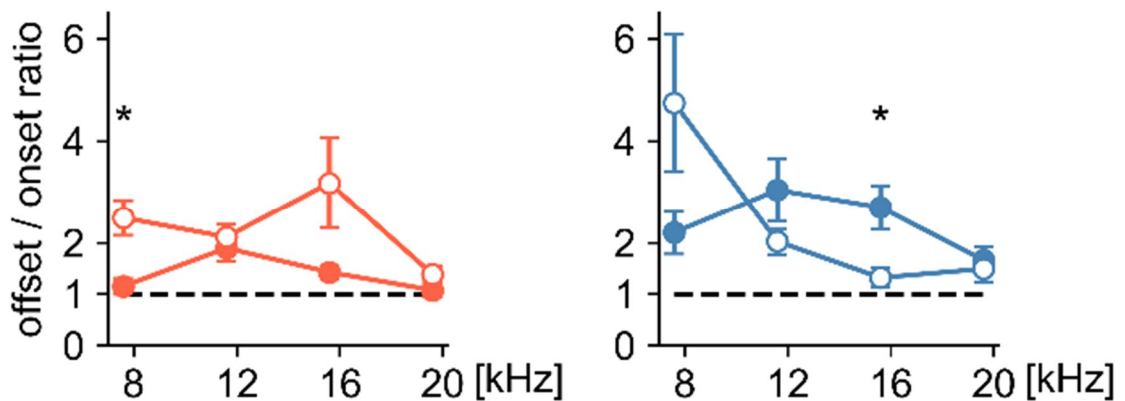


図2. 興奮性細胞 (赤) と抑制性細胞 (青) の onset と offset 応答比。黒丸: 耳鳴り前。白丸: 耳鳴り後。* $p < 0.05$

この興奮-抑制バランスの変化を捉える指標として、サリチル酸投与前後の offset / onset ratio の細胞種における比率を算出すると、投与後に 16 kHz のみ大きく変化することが明らかとなった (図 3 左)。これは、耳鳴り周波数において、聴覚皮質における興奮-抑制バランスが崩壊していることを示唆している。

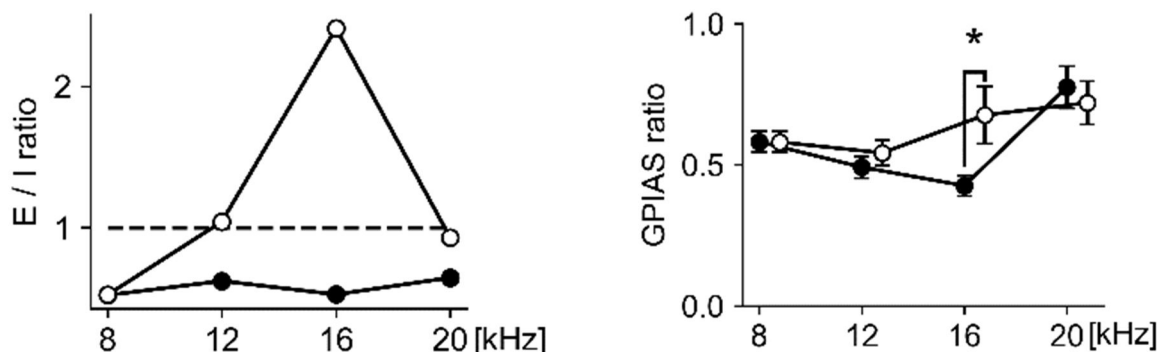


図 3. 電気生理上の gap 検出阻害 (左). 行動上の gap 検出阻害 (右). 黒丸: 耳鳴り前 . 白丸: 耳鳴り後 . * $p < 0.05$

次に、音響暴露による耳鳴りモデルマウス (C57BL/6J, $n=9$ mice) において、GPIAS を用いて耳鳴り症状を音爆後に経時的に行動評価した (図 4)。中心周波数 10 kHz (octave-band), 音圧 100 dB SPL の狭帯域雑音を 1 時間マウスの右耳に暴露した。暴露前と暴露後 1 週間おきに耳鳴り評価 (GPIAS 計測, 背景雑音周波数 6, 8, 10, 16, 20 kHz) と難聴評価 (聴性脳幹反応計測, 30 - 100 dB SPL, 6, 8, 10, 16, 20 kHz) を行った。その結果, 16, 24kHz で音響暴露 1 日後に抑制率の低下と, 難聴回復後に 3 週間以上続く抑制率の低下を示し, 急性耳鳴りと慢性耳鳴りを検出することができた (図 4)。

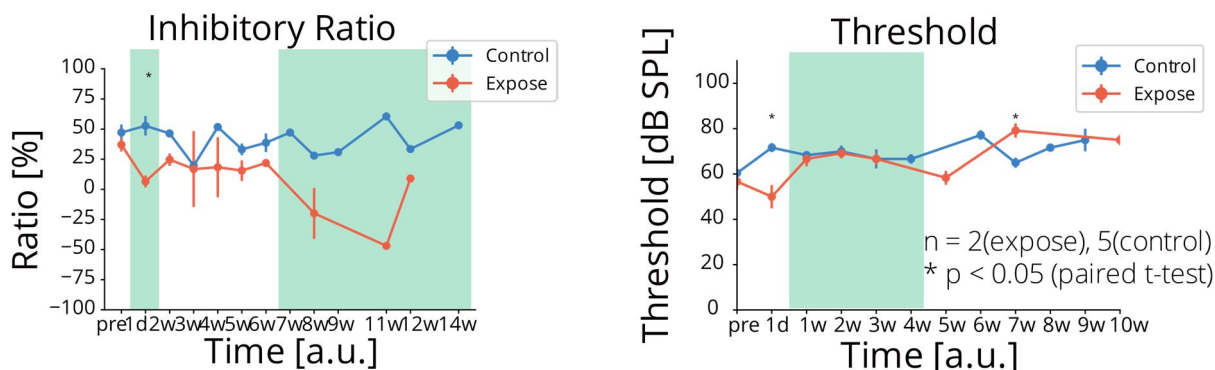


図 4. (左) GPIAS 計測における抑制率の時間変化(24 kHz, 緑:耳鳴り). (右)聴性脳幹反応計測における聴覚閾値の時間変化(24 kHz, 緑:難聴)

計測個体のうち 6 匹は暴露直後, 3 匹は慢性耳鳴りの発生時点でウレタン麻酔 (1500 mg/kg B.W.) を投与し, 手術により露出された聴覚皮質に 16ch 多点電極 (A1x16-5mm-50-177) を刺入した。50 ms の gap を含む 80 dB SPL の狭帯域ノイズ(中心周波数 6, 8, 10, 16, 20, 24 kHz) を提示した際に誘発される神経活動を計測した。半自動スパイクソーティングソフトウェア KlustaKwik を用いてスパイクソーティングを行い, 80 dB SPL のクリック音提示後に提示前の平均発火率の 2 sd を超えるピーク発火率を持つユニットを聴覚応答のあるマルチユニットとして解析に含めた。その結果, SS 投与の場合と同様に, gap 音に反応する聴覚皮質における反応は gap の始まり (onset) と gap の終わり (offset) で見られ, onset 反応を offset 反応が上回っていた。急性耳鳴り耳鳴り後, 音響暴露周波数より高い周波数のノイズに対しては offset 反応が有意に低下した ($p < 0.05$, paired t-test)。一方, 低い周波数では onset 反応が低下した ($p < 0.05$, paired t-test)。慢性耳鳴り後は有意な変化は見られなかった。耳鳴り周波数と offset/onset ratio の低下した周波数は一致しており, onset 反応と offset 反応の比較が gap 検出に関与していることが示唆される。これは SS 投与の場合と一致している。以上の結果は, こうした聴覚皮質における耳鳴りに応じた興奮-抑制バランスの崩壊が様々な種類の耳鳴りで共通する現象であることを意味している。この応答特性の変化が, 行動上の驚愕反射抑制阻害を引き起こすと考えられる。

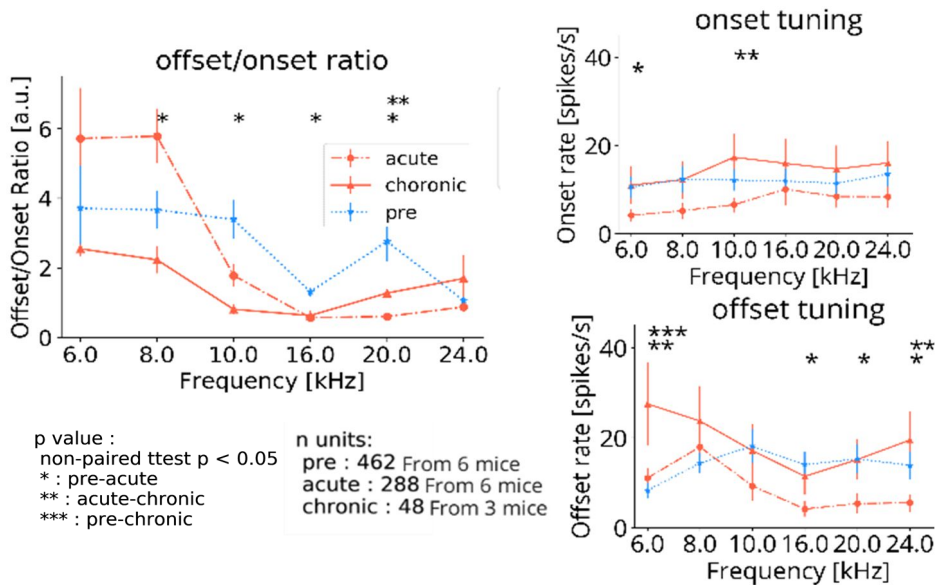


図 5. (A)offset 応答と onset 応答の比の周波数ごとの変化. (B)周波数ごとの onset 応答. (C)周波数ごとの offset 応答.

最後に、電気刺激および磁気刺激法の基盤技術開発を行った。ここまで明らかにしてきた耳鳴りの神経相関の知見を踏まえ、新規耳鳴り抑制法の開発を進めて行くためには、電気刺激および磁気刺激法の基盤技術開発が重要となる。電気刺激では、聴覚皮質への多点電流刺激により、聴覚応答を模倣させることを試みた。その結果、刺入電極により聴覚皮質の各層へ刺激・計測点を配置させ、特定のパターンで各層を電気刺激することにより音刺激に対する神経応答を模擬できることを示した。さらに、聴覚皮質への電気刺激により聴覚皮質神経細胞の聴覚応答特性を可塑的に変化させることができることも示した。磁気刺激では、微細加工技術により新規のマイクロサイズ磁気刺激プローブを試作し、その脳刺激機能を生理実験により評価した。

本研究では、サリチル酸ナトリウム投与および音響暴露による耳鳴りモデルマウスを確立し、音響驚愕反射ギャッププレパルス抑制により耳鳴り周波数が推定できることを示した。さらに、耳鳴り状態に応じた聴覚皮質神経活動の変化を捉えるため、行動実験で用いる雑音中のギャップに対する神経応答を計測した結果、聴覚皮質において興奮-抑制バランスが変化していることを見出した。この結果は、聴覚皮質における耳鳴りの神経相関の一つが、興奮性細胞と抑制性細胞の応答特性の変化であることを示唆している。また、電気刺激および磁気刺激の脳刺激に関して、聴覚皮質に刺入した多点電極から様々な電気刺激パターンを印加し、音刺激に対する神経応答特性を可塑的に制御し得ることを示すとともに、電気刺激に加えて、マイクロコイルを用いた磁気刺激法を独自に開発し、それをを用いて聴覚皮質に磁気誘発応答を励起することに成功した。これらの成果により、耳鳴りの神経相関を踏まえた新しい電気および磁気による耳鳴り抑制法を開発するための基盤技術が確立されたと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shuto Muramatsu, Masato Toda, Jun Nishikawa, Takashi Tateno	4. 巻 1721
2. 論文標題 Sound- and current-driven laminar profiles and their application method mimicking acoustic responses in the mouse auditory cortex in vivo	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 146312
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.brainres.2019.146312	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shunsuke Sugai, Hisaya Higuchi, Jun Nishikawa, Kazuo Satoh, Shuichi Murakami, Takashi Tateno	4. 巻 15
2. 論文標題 Numerical analysis of microcoil induced electric fields and evaluation of in vivo magnetic stimulation of the mouse brain	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 IEEJ Transactions on Electrical and Electronic Engineering	6. 最初と最後の頁 1672 ~ 1680
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/tee.23237	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takumi Kuwano, Hiroki Kaneta, Jun Nishikawa, Kazuo Satoh, Shuichi Murakami, Takashi Tateno	4. 巻 15
2. 論文標題 Developing a frequency selective piezoelectric acoustic sensor sensitive to the audible frequency range of rodents	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 IEEJ Transactions on Electrical and Electronic Engineering	6. 最初と最後の頁 1816 ~ 1823
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/tee.23260	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 築田元揮、中島優花、館野高、西川淳
2. 発表標題 サリチル酸に誘発された耳鳴りはマウス聴覚皮質におけるギャップのオンセットに対する神経応答に影響を与える
3. 学会等名 第42回 日本神経科学学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 築田元揮、中島優花、館野高、西川淳
2. 発表標題 マウス聴覚皮質におけるgap誘発神経応答の耳鳴り状態依存的な変化
3. 学会等名 電気学会 電子・情報・システム部門大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菊池大夢、館野高、西川淳
2. 発表標題 In vivo ラット聴覚皮質の時間周波数受容野における多点電極刺激に誘発される可塑的变化
3. 学会等名 電気学会 電子・情報・システム部門大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石坂駿人、館野高、西川淳
2. 発表標題 老化促進モデルマウス2系統(SAMP1とSAMR1) における難聴および時間処理障害の評価
3. 学会等名 第35回 老化促進モデルマウス (SAM) 学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yuka Nakajima、Takashi Tateno、Jun Nishikawa
2. 発表標題 Noise-induced tinnitus causes changes of neural responses to gap-in-noise sound in the mouse auditory cortex
3. 学会等名 The 43rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Jun Nishikawa、Motoki Yanada、Takashi Tateno
2. 発表標題 Neural correlates of gap detection deficits related to tinnitus in the mouse auditory cortex
3. 学会等名 The 43rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takashi Tateno、Masato Toda、Hiroki Kaneta、un Nishikawa
2. 発表標題 Developing a transcranial ultrasound brain stimulation method to highly localized evoked response area in the mouse auditory cortex: numerical simulation and experimental evaluation
3. 学会等名 The 43rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中島 優花、館野 高、西川 淳
2. 発表標題 騒音誘発性耳鳴りはマウス聴覚皮質においてgap-in-noise音に対する神経応答を変化させる
3. 学会等名 第30回 日本神経回路学会 全国大会
4. 発表年 2020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
---------	---------