

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：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390395

研究課題名(和文) 両側同時経頭蓋イメージングを用いた新たな聴覚野機能の解明

研究課題名(英文) Novel insights into auditory cortex function using bilateral simultaneous transcranial imaging

研究代表者

高橋 姿 (TAKAHASHI, Sugata)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：10154824

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,100,000円、(間接経費) 4,530,000円

研究成果の概要(和文)：両耳聴では一側聴と違い、音源の空間的な位置把握、騒音下での聴取能向上などの効果が得られる。これまで動物を使った大脳聴覚野の研究は、技術的な困難さから、両耳別々に音提示、左右別の大脳聴覚野を研究することは難しかった。われわれはこれまで用いてきた落射型蛍光顕微鏡を改良し、斜め上方から投射することで両側大脳聴覚野の反応を全く同時に記録し、またコンデンサースピーカーと導音管を用いることで両耳別刺激が可能な装置を開発した。それにより、従来刺激側と反対側の大脳聴覚野で処理されていると考えられていた反応が、同側でも多くの処理がされていること、両耳刺激では片側刺激と違う反応が得られることが判明した。

研究成果の概要(英文)：Binaural hearing, unlike unilateral hearing, enables the recognition of the sound location, and the improvement of hearing ability under conditions of ambient noise. Until recently, in research on the auditory cortex, technical challenges had made it difficult to present sounds to each ear separately and conduct studies differentiating left and right auditory cortices. We have improved the fluorescence microscope that we have been using, and we have recorded the responses of the bilateral auditory cortex simultaneously. Furthermore, we have developed a device capable of stimulating each ear separately. Although the conventional thinking is that the auditory cortex contralateral to the stimulus processes the response, we in fact found that much of the processing also occurs ipsilaterally. We also found that bilateral stimulation evokes a different response from that of unilateral stimulation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：耳鼻咽喉科学

キーワード：両耳聴 大脳聴覚野 イメージング マウス

1. 研究開始当初の背景

ヒトを含めた多くの動物は左右一对の耳を持ち、それぞれの耳からの情報は聴覚伝導路で統合、処理される。その結果、両耳聴では一側聴と違い、音源の空間的な位置把握、騒音下での聴取能向上などの効果が得られる。一方、言語の処理における左半球優位性のように、最終的な認識の場である大脳聴覚野では左右の機能分担が存在する。このような両耳聴における情報統合、聴覚野における機能分化は、聴覚という感覚系の進化において、有利で効率のよいシステムとして成立したものであり、その解明はよりよい補聴理論の開発など臨床上も有用であると予想した。

2. 研究の目的

われわれはこれまで光学的イメージング法のひとつであるフラビン蛋白蛍光イメージングを用いて、マウス大脳聴覚野の研究を行い、さまざまな研究成果を得てきた。本研究で用いたフラビン蛋白蛍光イメージングはマウスの頭蓋骨越しに光を照射することで、脳自体に無侵襲で神経反応をえることができるという大きなメリットがある。しかしこれまでのシステムでは側頭部にある大脳聴覚野を両側同時に記録することは不可能であり、またマウスの耳に両耳別々の刺激音を入れることもできなかった。そこで、これまでのシステムを改良、発展させ、両側同時に大脳聴覚野の反応を測定できるようにすること、また、両耳別々に刺激音を提示できるようにすることを第一段階の目標とした。システムが構築されたら、両耳別々の刺激音を提示することにより、片耳聴、両耳聴における大脳聴覚野の反応の違いを解析する。また、左右の大脳聴覚野の反応を詳細に解析することで、大脳聴覚野の機能分化を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

いままでわれわれが行ってきたフラビン蛋白蛍光イメージングは、新潟大学脳研究所システム脳生理学教室に設置してある装置を共同で利用させていただいていた。同教室では、マウス大脳聴覚野だけでなく、視覚野、体性感覚野の研究、in vitro での大脳スライス標本を用いたイメージング実験も行っている。マウス視覚野、体性感覚野は頭頂部に位置するため、顕微鏡をマウスの直上、垂直から記録を取るのが有利で

ある。しかし聴覚野は側頭部に位置するため、同装置で聴覚野の反応を測定する場合、マウスを側臥位に近い体位で固定する必要があった。マウスにとって側臥位は腹臥位と違い生理的な体位でなく、とくに自発呼吸下で管理している本研究では呼吸状態が安定しないことがしばしば起こった。フラビン蛋白蛍光イメージングは、神経活動に伴った酸素代謝を測定する系であることから、動物の呼吸状態の安定は必須条件であり、可能な限り生理的な体位をとることがよりよい研究成果を得ることにつながると考えた。加えて側臥位の場合、反対側の聴覚野は固定台側を向くことになり、同時に両側を測定することは不可能であった。また、側臥位の場合、マウス前方に置いたスピーカーからの音提示では、両耳に全く同じ負荷がかかっているかは疑問が残った。そこで、両側同時に大脳聴覚野の反応の測定、両耳別々の刺激音提示、呼吸状態の安定のために、腹臥位で水平方向から測定することが必要と考え、新たに水平方向に設置できる顕微鏡、マウスの固定台などの設置、また今までと同様の安定した記録をとるための調整を行った。

基本的な神経活動の測定方法はこれまで行ってきた研究と同様であり、経頭蓋的にフラビン蛋白蛍光イメージングを利用する。対象動物はマウスとし、C57BL/6 を中心としたシステムを用い、ウレタン 1.7g/kg 腹腔内投与によって麻酔、自発呼吸下に管理する。マウスの頭部皮膚を切除し、頭蓋骨を露出させた後、デンタルセメントを用いて、実験台とネジ固定できるように作成した金具に固定する。その後、側頭筋を翻転させ、大脳聴覚野を明視下に置く。頭蓋骨は乾燥すると透明度が失われ、脳表に光が届かなくなるため、乾燥しないように流動パラフィン、プラスチックフィルムを使用する。測定方法は、青色励起光 (450-490 nm) を頭蓋骨越しに脳表に照射し、神経活動に伴って発せられる緑色自家蛍光 (500-550 nm) を冷却 CCD カメラにより撮影する。反応は通常 1 秒あたり 9 フレームの頻度で撮影し、20 回程度のトライアルを平均加算する。刺激音提示直前の複数枚の平均画像を基準とし、刺激音提示後の蛍光変化を経時的に画像化する。画像化された神経反応は、その活動範囲を刺激音、刺激音提示側、左右で比較する。また、活動範囲のうち、特定の領域に、関心領域を設定し、経時的な反応の変化を検討する。

研究期間初期では、基本周波数を固定させた振幅変調音 (AM 音) を用い、これまでのシステムで得られていた反応が、本システムでも得られるか検証を行う。その後、

左右同時に同じ刺激音を提示するとともに、片側ずつの刺激音提示や、同期させた左右別々の刺激音を提示することで、片耳聴、両耳聴に対する反対側、同側の大脳聴覚野の反応の違いを探る。さらにガウシアンノイズ負荷下で刺激音を提示、静寂下とノイズ環境下の反応の違いを研究する。

4. 研究成果

・両側同時フラビン蛋白蛍光イメージング記録システム、および左右別に刺激音提示できる装置の開発(図1、図2)

当教室には蛍光顕微鏡などの装置がなかったため、これまで共同で研究をさせていただいていた、新潟大学脳研究所システム脳生理学教室に設置されていた落射型蛍光顕微鏡をもとに、顕微鏡を水平に設置することから始めた。顕微鏡を水平に設置すると冷却 CCD カメラ、キセノンランプボックスなどの重さにより不安定になることから、特注の設置台をデザイン、作成した。また顕微鏡下の大脳聴覚野を観察すると、完全に 90 度の側面ではなく、やや斜め上方に位置するということがわかった。そこで水平方向に設置した顕微鏡の高低、角度をある程度自由に動かせるような可変式架台も導入した。左右の顕微鏡は、独立したイメージング画像を測定するため、それぞれを PC と接続し、画像解析ソフトにて駆動している。二つの画像解析ソフトで時間的にずれが全くないようにシンクロさせるため、その上流から電気信号を同時に入れ、同期させて記録ができるシステムを構築した。マウスを載せる実験台は上下、左右、前後が自由に動かせ、また角度も 3 次元的に可動できるように、市販のカメラを固定する三脚、雲台、ステージを組み立てた。

マウスの耳は小さく、また可聴域がヒトと違い、5-50kHz 程度とかなり高音である。そのため、高音域までフラットな周波数特性を持つコンデンサースピーカーを使用し、導音管にてマウスの外耳道に隙間なくはまるようにし、左右別に刺激音を提示できるようにした。

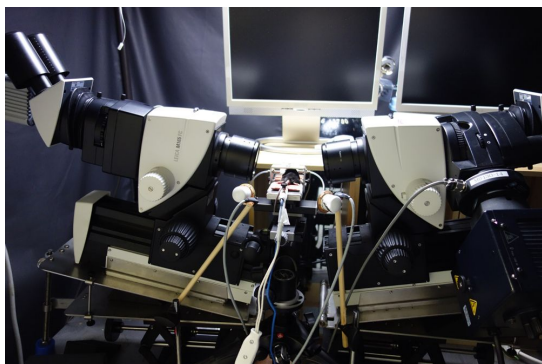


図 1 : 実験設備全体像

中央の実験台の上にマウスが腹臥位でいる。蛍光顕微鏡は両側側方に配置し、斜め上方からマウス側頭部を撮影できるような配置としている。音提示は顕微鏡脇においた小型コンデンサースピーカーにより発生させ、導音管によりマウスの外耳道へと入力している。

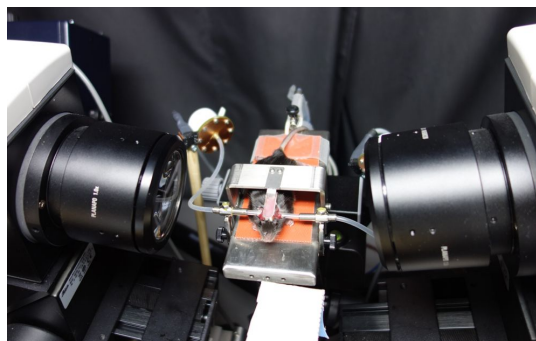


図 2 : マウスを中心とし拡大した写真。マウスの頭部はデンタルセメントにより、実験台と強固に固定されている。マウス外耳道内には導音管が挿入されており、左右別々に音提示をすることができる。

・片耳聴における同側、反対側大脳聴覚野の反応

動物の感覚入力、運動出力は、主に反対側の脳により制御されている。しかし単純な入力ではない言語理解のような機能は、左大脳半球で処理されているように、優位半球があることがわかっている。このような機能分化がなぜあるのかは、いまだわかっていない。聴覚では耳からの入力された音が、大脳聴覚野まで伝わるまでに、すでに複数回の神経核を経由し、処理されている。われわれは片耳からの音入力が単純に反対側大脳聴覚野で処理されているのか、もしくは複雑な情報処理を受け、優位半球があるのかを探るために、左右別々に片耳刺激を行うことから始めた。

片耳ずつ比較的単純な音である AM 音を入力した場合、右耳入力でも、左耳入力でも反対側の大脳聴覚野での反応が強く出現した。しかし、すべての神経活動が反対側の大脳聴覚野だけで見られるわけではなく、同側の大脳聴覚野でも反応が見られることがわかった(図3)。この同側大脳聴覚野での反応が、単純に反対側大脳聴覚野の反応が脳梁を伝わり、観察されているだけなのか、もしくは何かの意味があって神経活動処理されているのかを、現在研究中である。具体的な方法として、われわれが過去に報告したように、持続的に青色光照射を行うことで神経活動を抑制する方法を考えている。本抑制法は、脳に障害なく可逆的に神経活動を抑制できるという点で優れた方法である。音刺激をした反対側の大脳聴覚野に青色光を照射することにより、同側の反応がみられなくなれば、単純に脳梁を伝わった反応と考えられる。逆に、反対側を抑制後でも、同側の反応がみら

れば、同側で処理されていることになり、新たな研究の可能性が広がる。

左聴覚野の反応

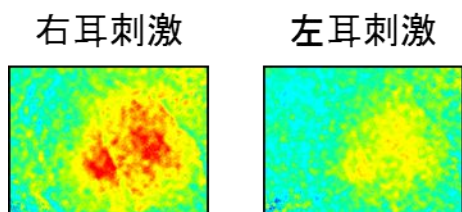


図3：AM音を刺激音として用い、片側ずつ音刺激をした場合の、左大脳聴覚野の反応
反対側の右耳から刺激した場合で反応がみられるが、同側の左耳から刺激した場合でも反応がみられる。(緑色が音刺激を行う直前の平均と変化のない部分、黄色、赤色となるにつれて、反応が強くみられた部位となる)

・両耳聴における大脳聴覚野の反応

前述のように両耳聴では一側聴と違い、騒音下での聴取能向上などの効果が得られることが聴覚心理学的にわかっている。そこで、同じマウスで静寂下での反応、騒音下での反応を観察した。その結果、静寂下では両耳刺激では同側刺激と同じくらいの小さな反応しかみられなかったのに対し、騒音下では大きな反応がみられた(図4、図5)。本結果が両耳聴における聴取能力向上とどのように関連するかは分からないが、ひとつの証拠となる可能性がある。本研究はまだ初期段階にあり、今後数を増やして、再現性を確認していく予定である。

左聴覚野の反応

(静寂下)

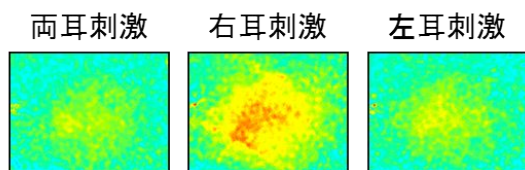


図4：ノイズのない静寂下で、同側、反対側と片側刺激をした場合、両側刺激をした場合の左大脳聴覚野の反応
本例では反対側の右耳から刺激音提示した場合にもっとも強い反応が得られ、両耳刺激した場合はむしろ反応が小さかった。

左聴覚野の反応

(騒音下)

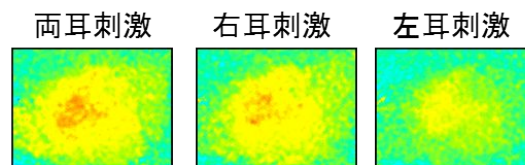


図5：騒音下で同側、反対側と片側刺激をした場合、両側刺激をした場合の左大脳聴覚野の反応

本例では両耳刺激した場合にもっとも強い反応が得られた。

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. 8(7): e68113, 2013. (査読有)

〔学会発表〕(計17件)

馬場洋徳, 本間悠介, 高橋邦行, 大島伸介, 窪田和, 澁木克栄, 高橋姿: マウス聴覚野のOFF応答のイメージング解析(第10回頭骨疾患研究会:2013年1月8日、第一ホテル東京、東京都港区)

山岸達矢, 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14-15日、同志社びわこリトリートセンター、滋賀県大津市)

Shinsuke Ohshima, Kuniyuki Takahashi, Tatsuya Yamagishi, Hironori Baba, Yuusuke Honma, Hiroaki Tsukano, Yamato Kubota, Ryuichi Hishida, Katsuei Shibuki, Sugata Takahashi: Cortical depression in the mouse auditory cortex after sound discrimination learning (29th politzer society meeting, 14-17 November 2013, Susesi Resort- Antalya, Turkey)

Kuniyuki Takahashi, Hironori Baba, Yuusuke Honma, Shinsuke Ohshima, Yamato Kubota, and Sugata Takahashi: Bilateral

functional differences in the mouse auditory cortex using flavoprotein autofluorescence imaging. (2nd meeting of EA ORL-HNS and CE ORL-HNS, 27th-30th April, 2013, Nice Acropolis, 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, 菱田竜一, 高橋姿, 澁木克栄: マウス聴覚野 OFF 応答のイメージング(第19回みかんの会: 2012年10月25日 有壬記念館 新潟市)

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: 2012年10月12日 国立京都国際会館 京都市)

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: Biphasic ON-OFF responses in the mouse auditory cortex appeared after exposure to sustained tone bursts (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、名古屋市)

馬場洋徳, 塚野浩明, 本間悠介, 高橋姿, 澁木克栄: 先行持続音刺激によって出現するマウス聴覚野OFF応答(第1回基礎・臨床研究交流会: 2012年9月5日、新潟大学医学部、新潟市)

高橋邦行, 大島伸介, 窪田和, 本間悠介, 馬場洋徳, 高橋姿, 塚野浩明, 菱田竜一, 澁木克栄: フラビン蛋白蛍光イメージングを用いた大脳聴覚野の研究 (第1回基礎・臨床研究交流会: 2012年9月5日、新潟大学医学部、新潟市)

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: 先行音刺激によって出現するマウス聴覚野のOFF反応(脳研夏期セミナー: 2012年8月4日、新潟大学脳研究所、新潟市)

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回日本生理学会大会: 2012年3月30日、長野県松本文化会館、松本市)

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、朱鷺メッセ、新潟市)

高橋邦行: 大脳聴覚野研究の現状とススめ-臨床医の立場から-(第14回新潟耳鼻咽喉科臨床懇話会: 2012年2月25日、ホテルイタリヤ軒、新潟市)

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: マウス大脳聴覚野におけるFM音情報処理領域。(第10回側頭骨疾患研究会: 2012年1月7日、ホテルメトロポリタン仙台、仙台市)

Sugata Takahashi: Special Lecture: New imaging techniques of the central auditory system. (11th Japan-Taiwan Conference on Otolaryngology - Head and Neck Surgery, 2011年12月8日、ANA クラウンプラザホテル神戸、神戸市)

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、大津市)

本間悠介, 高橋邦行, 大島伸介, 窪田和, 澁木克栄, 高橋姿: マウス大脳聴覚野のFM音方向選択性領域(第9回側頭骨疾患研究会: 2011年1月8日、新潟グランドホテル、新潟市)

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.med.niigata-u.ac.jp/oto/about/research/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 姿 (TAKAHASHI SUGATA)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号: 10154824

(2) 研究分担者

高橋 邦行 (TAKAHASHI KUNIYUKI)
新潟大学・医歯学系・助教
研究者番号: 40452057

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

(3) 連携研究者

なし