

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25861536

研究課題名(和文)フラビン蛋白蛍光イメージングによる両耳分離補聴の検討

研究課題名(英文)The processing of dichotic listening in the mouse auditory cortex using flavoprotein fluorescence imaging

研究代表者

大島 伸介(OHSHIMA, Shinsuke)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：70632438

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：「音は聞こえるが言葉はわからない」という感音難聴者では、従来の補聴器治療に限界を感じる。語音明瞭度を改善させる両耳分離補聴方式や、図形と音、すなわち視覚と聴覚を関連付けた新しい難聴リハビリ方式の可能性に注目し、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反応を観察した。両耳分離補聴のデータ採取は技術的に困難であった。次に、視覚と聴覚刺激を関連付けてマウスを飼育後、関連付けられた図形の視覚刺激のみを行い、聴覚刺激なしで大脳聴覚野が反応することを発見した。難聴者に音を聞かせるだけでなく、聴覚以外の感覚刺激を利用した新たな聴覚リハビリについて、さらなる研究を行っている。

研究成果の概要(英文)：In patients with sensorineural hearing loss "I hear sound but I do not understand the words", we feel the limit of traditional hearing aid treatment. We focused on the possibility of dichotic listening system for improving speech intelligibility and a new auditory rehabilitation that associates shape and sound, ie visual and auditory sense. Mouse cerebral auditory cortex responses were observed using flavoprotein autofluorescence imaging. Data collection of dichotic listening was technically difficult. After the mouse was exposed by associating visual and auditory stimuli, cerebral auditory cortex responses were found only by looking at the shape without sound. I think that these results can contribute to further new auditory rehabilitation using sensory stimulation other than hearing.

研究分野：医歯薬学

キーワード：大脳聴覚野 イメージング マウス 両耳分離補聴 聴覚リハビリ

1. 研究開始当初の背景

「声はきこえるが言葉はわからない」という感音難聴、特に後迷路性難聴者では補聴器を装用しても語音明瞭度が改善せず、従来方式の補聴器装用に治療の限界を感じることもある。難聴者に対する新たな補聴システムの開発により難聴者のQOLの改善が望めるが、そのうち両耳分離補聴(Dichotic)方式は語音明瞭度を向上する補聴方式として注目されている。

また、平衡機能の低下しためまい患者では前庭覚以外の視覚刺激や深部知覚刺激を用いた新たなリハビリの有用性が知られている。このように異なるモダリティを利用したリハビリは中枢の可塑性を利用した斬新な発想である。われわれは視覚刺激を併用して難聴リハビリへ応用することを着想した。視覚・聴覚連想記憶を用いた関連付けトレーニング後、視覚刺激が聴覚野反応に及ぼす影響を明らかにできれば、新たな聴覚リハビリの方法論を構築できるかもしれない。

われわれは以前から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神経活動や可塑性を研究している。本研究では両耳分離補聴に次いで、ある図形と音が関連付けられたマウスに対して、関連付けられた音刺激なしで図形だけを見た時の聴覚野反応の解析を行い、視覚・聴覚連想記憶後の視覚刺激が聴覚野にもたらす影響を検討する。両耳分離補聴による新たな補聴方式、視覚・聴覚連想記憶を用いて視覚刺激を併用した新たな聴覚リハビリの可能性が見出せれば、難聴者のQOL改善に寄与できると考えた。

2. 研究の目的

(1)両耳分離補聴(Dichotic)方式

語音明瞭度に影響を及ぼす因子として、われわれは周波数マスキングに着目した。これは低周波数帯域成分の入力により、高周波数帯域成分がマスクされてしまう現象である。この影響の回避を目的とする補聴処理として、入力音声を周波数軸上で相補的に分割し、左右の耳に振り分けて提示する両耳分離補聴(Dichotic)方式が期待されている。しかし、その最適な分割周波数についての見解は明確でなく、それを検証するため、フラビン蛋白蛍光イメージングを用いて両耳分離補聴に対する両側聴覚野の反応を同時に測定し、両耳分離補聴はどのように大脳聴覚野に伝達され、語音明瞭度の改善に聴覚野がどのように関わっているのか、そのメカニズムに迫りたい。

(2)視覚刺激を併用した聴覚リハビリ

ある図形と音刺激に暴露されたマウスは暴露された図形と音を関連付けて、連想記憶することができる。視覚・聴覚刺激暴露により視覚・聴覚連想記憶を得たマウスの聴覚野反応が、関連付けられた視覚刺激によりどのような可塑性を生じるかを解析することが

本研究の第二の目的である。聴覚刺激がなくても、視覚刺激だけで聴覚野の反応が惹起されることが示されれば、視覚刺激を併用した聴覚リハビリにより、活動性の低下した難聴者の聴覚野の活性化を促す可能性が期待できる。

3. 研究の方法

(1)フラビン蛋白蛍光イメージング

脳活動の測定法として、これまでは脳表に針電極を刺す電気生理学的手法を用いるのが一般的であったが、2次元的なマップを作成するのは困難である。そこで2次元的な情報を直接とらえる方法として光学的イメージング法が有効である。われわれはミトコンドリアの電子伝達系内に存在するフラビン蛋白の性質に注目した。フラビン蛋白は還元型と酸化型が存在し、青色励起光を照射すると酸化型のみ緑色蛍光を発するという性質を持つ。神経細胞の活動により細胞内のカルシウム濃度が上昇すると酸素代謝が亢進し、フラビン蛋白が還元型から酸化型へと変化し、緑色自家蛍光の上昇が起こる。これを記録することにより脳表での代謝が亢進している部位、すなわち神経活動を画像として同定することができる。さらにマウスの頭蓋骨は非常に薄く、頭蓋骨越しに光学的イメージングが可能であり、脳自体に無侵襲で神経反応を得る事ができる点がフラビン蛋白蛍光イメージングの大きなメリットである。

対象動物は C57BL/6 マウスでウレタン 1.6g/kg 腹腔内投与によって深麻酔後、自発呼吸下に管理する。マウスの頭部皮膚を切除し、頭蓋骨を露出後、デンタルセメントで実験台に固定する金具を接着固定する。その後側頭筋を翻転させ、大脳聴覚野を明視下に置く。マウス頭蓋骨の乾燥を防ぐため流動パラフィンを用いる。イメージング撮影は、青色励起光(450-490nm)を頭蓋骨越しに脳表に照射し、神経活動に伴って発した緑色自家蛍光(500-550nm)を冷却 CCD カメラで撮影する。通常 1 秒当たり 9 フレームの頻度で撮影し、20 回以上のトライアルを平均加算する。刺激提示直前の複数枚の平均画像を基準として、刺激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可視化するとともに、活動範囲のうち特定の領域に関心領域を設定すれば経時的に神経活動の変化を評価できる。

(2)両側同時イメージングの工夫

これまでのフラビン蛋白蛍光イメージングのシステムは、側頭部に位置する聴覚野を測定するためにマウスを側臥位に近い体位で固定して、マウスの直上から顕微鏡を垂直向きにして記録をとっていたため、測定は一側のみであった。われわれは、腹臥位でマウスを固定し、両脇に2台の顕微鏡を設置して水平方向から両側側頭葉の聴覚野を両側同時に測定できるシステムを構築した。両側聴覚野の同

時測定が可能になり、腹臥位により安定した呼吸状態を維持できる点がメリットで、本システムの独創的な点である(図1)。

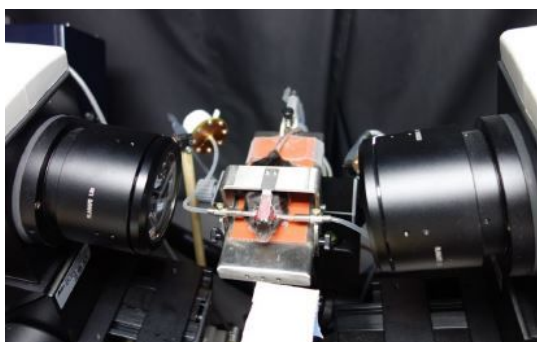


図 1：両側同時測定可能なフラビン蛋白蛍光イメージングシステム

中央の実験台にマウスを腹臥位とし、両側斜め上方に顕微鏡を配置した。マウス頭部はデンタルセメントで固定、音提示は顕微鏡脇のスピーカーから導音管を介してマウス外耳道へ入力する。

(3)両耳分離補聴(Dichotic)方式

labVIEWソフトを用いてコンピュータでFM音を合成し、パスフィルタを介して出力する。分割周波数をパスフィルタのカットオフ値に設定し、左右にそれぞれ高周波数帯域/低周波数帯域に分けた異なる周波数の音刺激を振り分けて出力する。マウス用のイヤホンを用いて、左右の耳に異なる周波数帯域の独立した音刺激を行う。つまり左右の耳に異なる周波数の音刺激を同時に入力し、大脳聴覚野の反応をフラビン蛋白蛍光イメージングにより両側同時に測定する(図2)。周波数マスキングを回避し周波数弁別能や語音明瞭度の改善をもたらす両耳分離補聴のメカニズムを解析する。

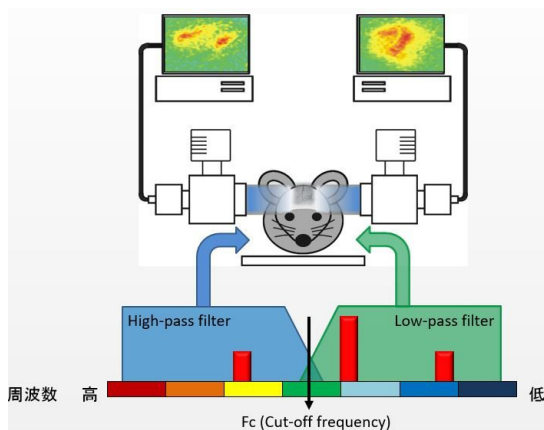


図2：両耳分離補聴のフラビン蛋白蛍光イメージング

広帯域プログラマブルフィルタにより設定したカットオフ値より高周波音/低周波音に分割して、左右の外耳道へ異なる周波数の音刺激を同時に入力し、それに対する左右の大脳聴覚野反応を同時にフラビン蛋白蛍光イメージングで測定する。

(4)視覚・聴覚連想記憶

防音暗室の飼育箱内にスピーカーと、四隅にモニターを設置した。スピーカー、モニターから 30 秒間隔で 5 秒間、それぞれネコの鳴き声、マルの図形が提示され、この飼育箱の中で2週間の暴露を行った。暴露条件(A+V)はネコの鳴き声とマルの図形を両方提示した。対照実験として、条件(A)はネコの鳴き声のみ、(V)はマル図形のみで暴露飼育を行った(図 3)。暴露後、音刺激は行わずに暴露に用いたマル図形のみ視覚刺激した際の聴覚野反応をフラビン蛋白蛍光イメージングにより測定した。

さらに暴露刺激の条件を変え、図形 B (星の図形)を用いて同様に暴露飼育後、図形 A、図形 B に対する聴覚野反応を測定した。

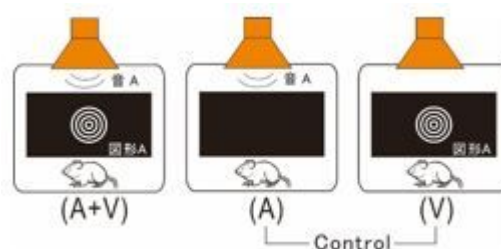


図 3：暴露条件

音 A (ネコの鳴き声)、図形 A (マル図形)を用いて、(A+V)音 A+図形 A、(A)音 A のみ、(V)図形 A のみとして、防音暗室箱で 2 週間飼育した。

4. 研究成果

(1)両耳分離補聴(Dichotic)方式

これまでわれわれが使用してきたイメージングシステムでは聴覚野反応の観察は一側のみで、頭蓋骨側面の聴覚野と測定用顕微鏡を平行にして、再現性の高いデータを得ることが容易であった。本研究では水平方向に顕微鏡を 2 台設置して両側聴覚野の同時記録が可能となったが、マウスの頭蓋骨側面の角度には個体差があり、聴覚野と顕微鏡を両側同時に合わせて再現性の高いデータを得ることは、一側の測定に比して高い技術、経験が要求された。そのため、両耳分離補聴の実験データの再現性が低く、統計学的に有意な結果は得られなかった。

(2)視覚・聴覚連想記憶

暴露後の視覚刺激 A に対する聴覚野の反応は、暴露条件(A)、(V)、暴露なしに比較して、暴露条件(A+V)で有意に高かった(図 4)。

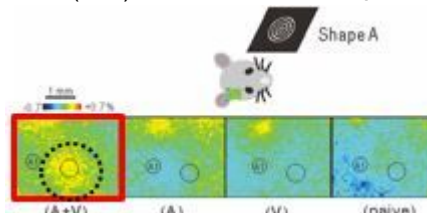


図 4：暴露された視覚刺激 A に対する聴覚野反応

対照実験として、暴露で使用されていない視覚刺激 B (星の図形) に対しては、暴露条件(A+V)、(A)、(V)、暴露なしのいずれも聴覚野の反応が認められなかった。以上の結果より、視覚刺激単独でも、暴露により関連付けられた聴覚刺激をマウスが連想できることが示された(図 5)。

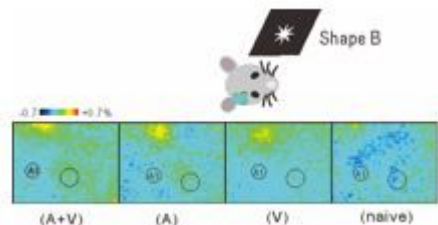


図 5：暴露されなかった視覚刺激 B に対する聴覚野反応

さらに、視覚・聴覚の関連付けに関する検討を進めた。(A+V)暴露で使用する聴覚刺激 A (ネコの鳴き声) 視覚刺激 A (マルの図形) の場合、暴露後に視覚刺激 A(丸の図形)により聴覚野は反応したが、視覚刺激 B (星の図形) には聴覚野は反応しなかった(図 6)。

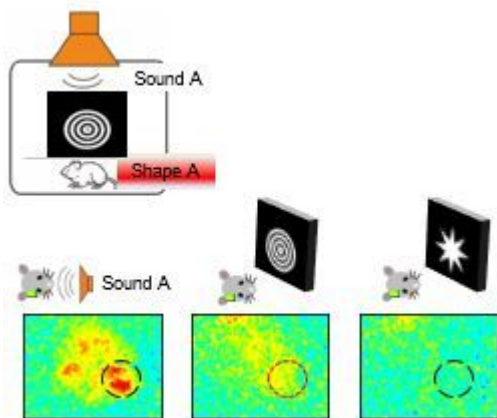


図 6：暴露された視覚刺激に特異的な聴覚野反応

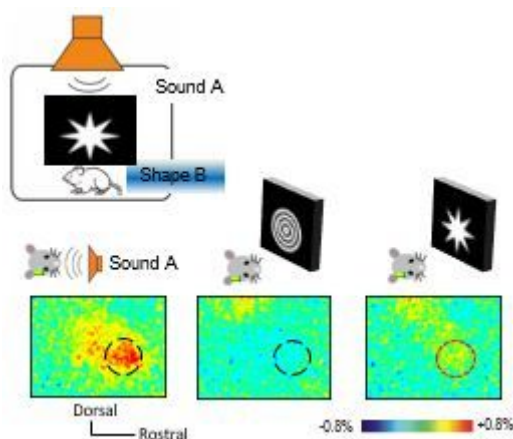


図 7：暴露された視覚刺激に特異的な聴覚野反応

逆に、(A+V)暴露で使用する聴覚刺激 A (ネコの鳴き声) のまま、併用する視覚刺激に B (星の図形) を用いると、暴露後に視覚刺激

A(丸の図形)による聴覚野反応は消失し、視覚刺激 B (星の図形) に対して聴覚野は反応した(図 7)。つまり、暴露に使用した視覚刺激で聴覚野の反応が惹起されるが、暴露で使用されていない視覚刺激に対して聴覚野は反応しなかった。暴露された視覚刺激に特異的に聴覚野が反応することがわかった。

本結果より、視覚・聴覚の連想記憶を利用したりハビリが難聴者の聴覚野反応の可塑性を促す契機になる可能性が考えられた。今後、視覚・聴覚連想記憶を積極的に利用した聴覚リハビリの有用性について研究を進めたいと考えている。

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. 8(7): e68113, 2013. (査読有)

〔学会発表〕(計 12 件)

Tatsuya Yamagishi, Hiroaki Tsukano, Hironori Baba, Yuusuke Honma, Shinsuke Ohshima, Yamato Kubota, Kuniyuki Takahashi, Ryuichi Hishida, Takeshi Yagi, Katsuei Shibuki, Arata Horii: The cortical area located dorsally to auditory cortex involved in sound-shape association memory in mice (第 82 回日耳鼻新潟県地方部会学術講演会 English Session: 2016 年 6 月 11 日、新潟大学脳研究所統合脳機能研究センター、新潟県新潟市)

山岸達矢、馬場洋徳、本間悠介、大島伸介、窪田和、澁木克栄、高橋姿：形状認知を担うマウス高次視覚野の同定(生理学研究所-新潟大学脳研究所合同シンポジウム：2015 年 3 月 5 日-6 日、新潟大学脳研究所統合脳機能研究センター、新潟県新潟市)

山岸達矢、馬場洋徳、本間悠介、大島伸介、窪田和、澁木克栄、高橋姿：Higher visual cortices responsible for shape recognition in mice (第 92 回日本生理学会大会：2015 年 3 月 21 日-23 日、神戸国際会議場・展示場、兵庫県神戸市)

Tatsuya Yamagishi, Hiroaki Tsukano, Hironori Baba, Yuusuke Honma, Shinsuke Ohshima, Yamato Kubota, Kuniyuki Takahashi, Ryuichi Hishida, Takeshi Yagi, Katsuei Shibuki, Sugata Takahashi: The

cortical area located dorsally to auditory cortex involved in sound-shape association memory in mice (The 30th Pulitzer Society Meeting / the 1st World Congress of Otolaryngology, 30 June -3 July 2015, TOKI MESSE, Niigata, Japan)

Hironori Baba, Hiroaki Tsukano, Tatsuya Yamagishi, Yuusuke Honma, Shinsuke Ohshima, Yamato Kubota, Kuniyuki Takahashi, Ryuichi Hishida, Takeshi Yagi, Katsuei Shibuki, Sugata Takahashi: Off responses produced by short-term depression of thalamic inputs to inhibitory neurons in the mouse auditory cortex. (The 30th Pulitzer Society Meeting / the 1st World Congress of Otolaryngology, 30 June -3 July 2015, TOKI MESSE, Niigata, Japan)

山岸達矢、馬場洋徳、本間悠介、大島伸介、窪田和、澁木克栄、高橋姿: Sound-shape association memory tested using a M-maze in mice (第91回日本生理学会大会: 2014年3月16日-18日、鹿児島大学郡元キャンパス、鹿児島県鹿児島市)

山岸達矢、馬場洋徳、本間悠介、大島伸介、窪田和、澁木克栄、高橋姿: マウス音・図形連想記憶を担う高次視覚野 (第44回新潟神経学夏季セミナー: 2014年7月31日-8月2日、新潟大学脳研究所統合脳機能研究センター、新潟県新潟市)

山岸達矢、馬場洋徳、本間悠介、大島伸介、窪田和、澁木克栄、高橋姿: Transcranial imaging of cortical activities after sound-shape association in mice (Neuroscience2014: 2014年9月11日-13日、パシフィコ横浜、神奈川県横浜市)

山岸達矢、馬場洋徳、本間悠介、大島伸介、窪田和、澁木克栄、高橋姿: 形状認知を担うマウス高次視覚野の同定 (第21回みかんの会: 2014年10月29日、新潟大学医学部医療人育成センター、新潟県新潟市)

山岸達矢、馬場洋徳、本間悠介、大島伸介、窪田和、澁木克栄、高橋姿: マウス聴覚・視覚連想記憶の行動学的解析 (第59回日本聴覚医学会総会・学術講演会、2014年11月27日~28日、海峡メッセ、山口県下関市)

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 Pulitzer

society meeting, 14-17 November 2013, Susesi Resort (Antalya, Turkey)

Kuniyuki Takahashi, Hironori Baba, Yuusuke Honma, Shinsuke Ohshima, Yamato Kubota, Sugata Takahashi: Bilateral functional differences in the mouse auditory cortex using flavoprotein autofluorescence imaging. (2nd meeting of EA ORL-HNS and CE ORL-HNS, 27-30 April, 2013, Nice Acropolis (Nice, France)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 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 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

<http://www.med.niigata-u.ac.jp/oto/about/research/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大島 伸介 (OHSHIMA, Shinsuke)
新潟大学・医歯学総合病院・助教
研究者番号: 70632438

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 なし