

令和 5 年 6 月 28 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2022

課題番号：17K11336

研究課題名（和文）耳鳴モデル動物の皮質可視化による聴覚野の皮質過剰補正の検証

研究課題名（英文）Inspection of the excessive revision of the auditory cortex on the ear ringing animal observed by optical recording

研究代表者

細川 浩（Hosokawa, Yutaka）

琉球大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：80181501

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,800,000円

研究成果の概要（和文）：急性耳鳴が発生した状態で、聴覚野の音情報処理がどのように変化するかを電位感受性色素による光学的計測法を用いて解析した。聴覚野の音のタイミング処理を調べるため繰り返し音、周波数処理を調べるためFM音を付加しサリチル酸の影響を調べた。サリチル酸過剰付加で急性耳鳴りを生じた状態では左右の特性が同じになり、左右差が消失した。次にサリチル酸付加後の過渡期におけるFM音刺激による聴覚皮質応答を周波数バンド解析で調べた。サリチル酸過剰投与により30分後に下行FM音刺激に対する周波数バンド応答が同期し、全周波数バンド応答で振幅が減少した後、中間周波数バンド応答が復活した。下行FM音ではoff応答のみ残った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

耳鳴りは自覚的な生理現象で、多くの原因があり、その発生機序はよくわかっていない。サリチル酸過剰付加して作成した耳鳴り動物を研究することにより、末梢でのメカニズムが解明されてきた。今回は、電位感受性色素により聴覚野の電位変化を直接観察した。音の周波数分析や時間処理において、聴覚野の過剰補正による耳鳴りが、左右の聴覚特性の同一化や音周波数の弁別の低下をもたらしたことは、耳鳴りの発生により脳状態が変化したことを示唆する。この研究は、耳鳴りの緩和や治療に貢献すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Many publications have shown that the application of salicylate at high doses induces reversible tinnitus in human and animals. We analyzed how the acoustic information processing in the auditory cortex changes in the state of acute tinnitus using cortical optical measurements. Repeated sounds were added to investigate the timing processing of sounds in the auditory cortex, and FM sounds were added to investigate the frequency processing. We examined the frequency band response analysis of the cortical analysis to FM sound during the transitional period after salicylic acid addition. Thirty minutes after salicylic acid overdose, the frequency band responses to downward FM sound were synchronized, and the mid-frequency band responses were restored after a decrease in amplitude in all frequency band responses. Only the off response remained for downward FM sound.

研究分野：聴覚生理学

キーワード：耳鳴り 光学的計測 聴覚皮質 FM音

1. 研究開始当初の背景

サリチル酸を人や動物に過剰投与すると急性耳鳴を生じることが知られている。サリチル酸付加による聴覚系の各神経核応答の影響が異なることが報告された。サリチル酸の過剰投与の影響を測定すると、末梢の蝸牛電位及び蝸牛神経核の応答振幅が周波数非依存で一律に減少した。下丘では、ほぼ影響がなく中音域の周波数で増強が観察され、皮質では、低周波と高周波を除き応答振幅が上昇することが報告された。

2. 研究の目的

本研究では、(1)急性耳鳴が発生した状態で、聴覚野の音情報処理がどのように変化するかについて皮質の光学的計測法を用いて解析した。聴覚野の音のタイミング処理を調べるため繰返し音、周波数処理を調べるため FM 音を付加した。サリチル酸を過剰付加による急性耳鳴り状態では左右の特性が同じになり、左右差が消失することが明らかにした。(2)サリチル酸付加後の過渡期における皮質の FM 音刺激の周波数バンド応答を調べた。サリチル酸付加による皮質の過剰補正の過程で周波数バンド応答にどのような変化が起こるか調べた。

3. 研究の方法

a. **動物**：モルモット (400-650 g) をケタミン (80 mg/kg)、キシラジン (40 mg/kg) で麻酔し、気管カニューレ、心電用電極を装着後、脳定位固定装置に固定し、側頭部にある聴覚領を露出した。側頭部に合わせてキャップを作成する。その後、動物をエスラックス (1.25 mg/kg/h) で不動化し、人工呼吸下で実験を行った。麻酔条件を一定に保つため、心電波形をモニターし、定期的に瞳孔反射を調べ、適宜ケタミン (20 mg/kg/h) を追加した。サリチル酸 (200 mg/kg) を腹腔内に投与して過剰サリチル酸投与動物を作成した。

b. **光学測定**：脳表面に電位感受性色素 (RH795:0.2mg/ml) を含んだ脱脂綿を乗せ60-120 分染色した。落射型蛍光顕微鏡を用いて励起光波長580 nm 以下で励起し、放出光波長620 nm 以上の光を4倍の対物レンズを介して、100x100 チャンネルのCMOS カメラ (MiCAM ULTIMA BrainVision) に投射した。2ms/frame の速度で512 ms または1024ms の時間記録した。心電図に同期させて刺激ありと刺激なしのデータを5回加算平均し、その差を応答とした。測定領域は、一辺5 mm の正方形で、ほぼ中心領域 (一次聴覚野とDC 野) を一度に測定するように測定領域を調整した。

c. **音刺激**：周波数バンドを調べるため純音刺激として、刺激時間200ms、立ち上がり下がり時間5 ms の純音 (0.5, 1, 2, 4, 8, 16 kHz、音圧 45-75 dB SPL) を用いた。上行FM 音 (開始周波数:0.5 kHz, 終止周波数:16 kHz, 75 dB SPL) を持続時間 (16, 20, 32, 40, 64, 80, 160 ms) でFM 変調した。それぞれの変調速度は、1000, 800, 500, 400, 250, 200, 100 Hz/msである。動物の頭頂より15 cm 離れた対側45 度に置いた小型スピーカより音刺激を与えた。

d. **周波数バンド応答の算出**：純音刺激 (0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0 kHz) 応答の時空間パターンから一次聴覚野 (AI) とDC 野に最初に出現した活動スポットの位置を同定した。その位置からAI とDC 野との活動スポット間距離をバンド間距離として測定した。2 ms後の活動の広がった領域を周波数バンドとしてその内部の測定点の平均波形を計算して周波数バンド応答とした。

4. 研究成果

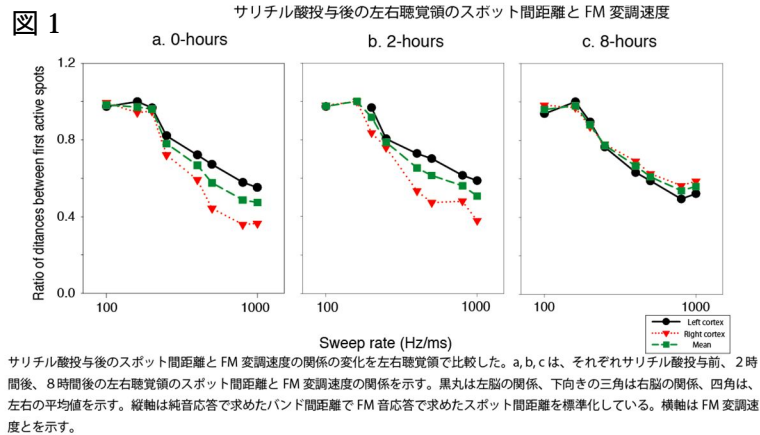
a. 急性耳鳴が発生した状態での左右の特性変化

a-1: FM 音刺激特性

図1は、FM 音応答により出現した AI と DC 野の活動スポット間距離 (FM スポット間距離)

と変調速度の関係を示す。FM スポット間距離は、同じ持続時間の純音応答で求めたバンド間距離で標準化している。変調速度特性は 200 Hz/ms を Cut-off とするローパス型になった。右脳の変調特性は、左脳より急峻に減少し、変調速度 1000 Hz/ms では純音に比較して 4 割のスポット間距離になった。一方、左脳は 6 割程度であった。しかし、サリチル酸を投与して 2 時間後、

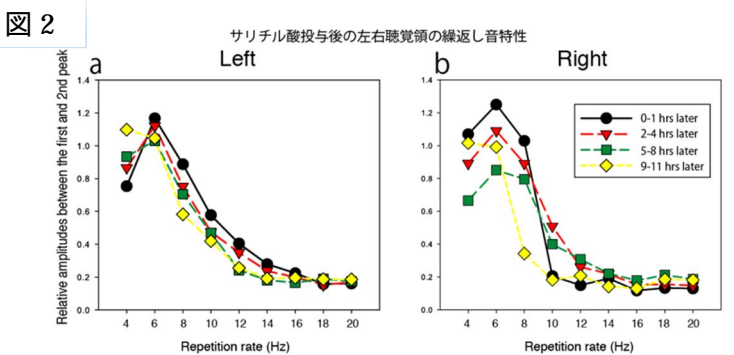
右脳の変調特性は 5 割程度であった。しかし、サリチル酸を投与して 2 時間後、右脳の変調特性は 5 割程度になったが、左脳ではあまり変化がなかった。8 時間後には、左右の聴覚領の変調特性は同じになった。変調速度 1000 Hz/ms で FM スポット間距離が純音バンド間距離の 5 割程度になった。



a-2: 繰り返し音特性

図 2 は、サルチル酸付加後の左右の聴覚領の繰り返し音特性を示す。左脳の繰り返し音特性 (図 3a) は、サルチル酸付加前から 8 時間までは、6 Hz にピークをもつバンドパス型の特性を示した。サルチル酸付加すると時間とともに 6-16 Hz の特性が減少し、逆に 4 Hz の特性は増加した。サルチル酸付加後 9 時間後には 6Hz をカットオフ周波数とするローパス型の特性になった。右脳の繰り返し音特性 (図 3b) は、左脳と比べ 8Hz に鋭いカットオフを持つバンド型を示した。

サルチル酸付加後、時間とともに 10-16 Hz では増加し、4-8 Hz では減少した。サルチル酸付加後 9 時間では、4, 6Hz の特性が増加し、6 Hz をカットオフ周波数とするローパス型になった。



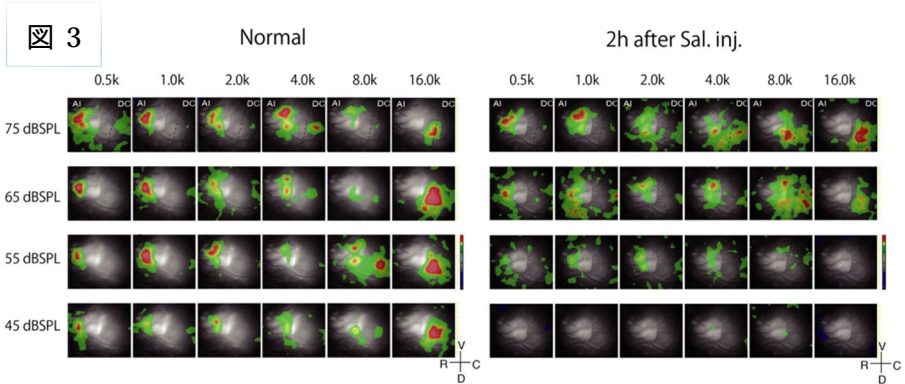
b. サリチル酸付加後の過

渡期における FM 音刺激応答変化

b-1: 純音刺激応答

図 3 は、サリチル酸付加前と付加後 2 時間の純音刺激の音圧と周波数に対する応答の時空間パターンを示した。各条件下の純音刺激を行った時に活動スポットの現れた時空間パターンを示した。低い周波数は右の一次聴覚領(AI)と DC 野に活動スポットが現れた。16kHz の純音では AI と DC 野の境界に表示された。サリチル酸付加前は、45 dB SPL の音圧まで周波数(0.5-16kHz)で活動スポットが出現した。サリチル酸付加後 2 時間では、刺激周波数と活動スポットの位置は、付加前と同じであるが、16kHz では 55dB SPL で消失し、0.5-16kHz の周波数で 45dB SPL の音圧で出現しなかった。

図4 a は、図1の左データのサリチル酸付加前の周波数バンド解析を行った結果を示した。暖色は低周波数バンド応答を示し、冷色は高周波数バンド応答を示した。



低周波刺激では、0.5kHz バンド応答が大きく、高周波刺激では 16kHz バンド応答が大きかった。図4 b は、サリチル酸付加後 2 時間の周波数バンド解析した結果を示した。閾値が高くなり、2, 4kHz で 55 dB SPL になった。強い刺激では、16kHz バンド応答も観察できるが、8 kHz バンド応答が、各純音刺激で大きかった。

図4a Band responses to tone stimulation in the left CTX

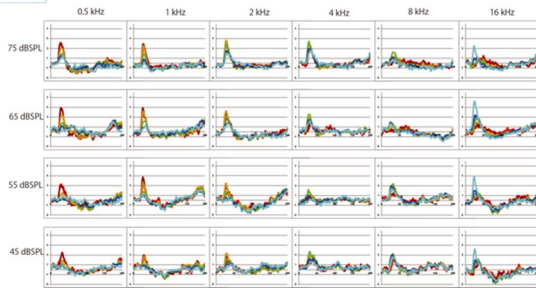
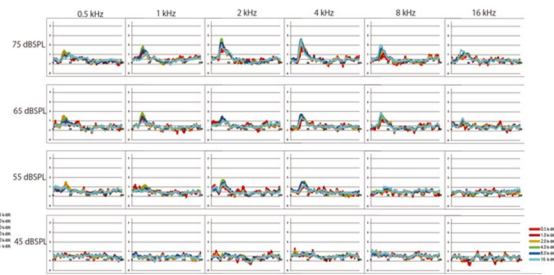


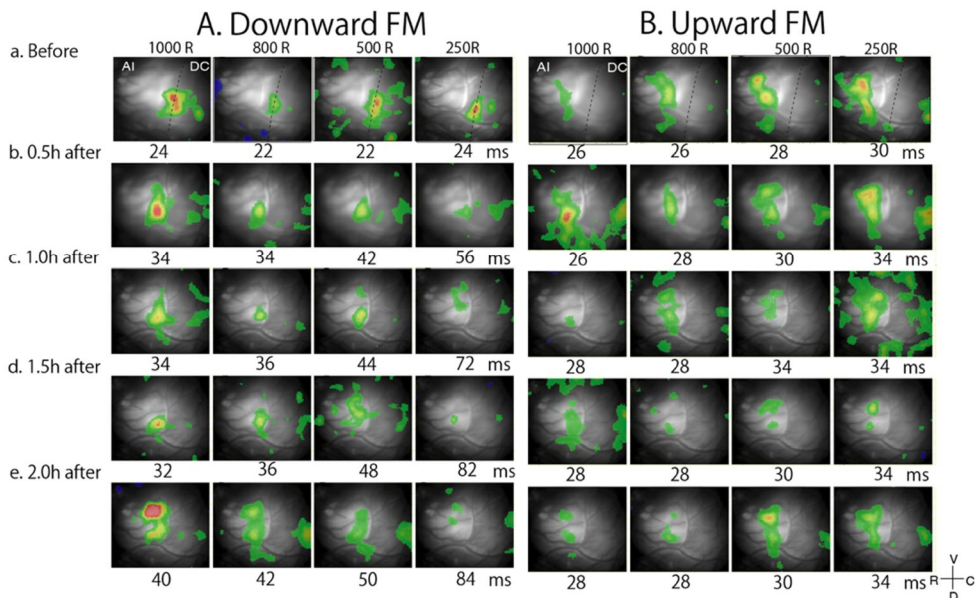
図4b Band responses to tone 2h after Sal inj.



b-2: FM 音刺激

図5 は下行 FM 音および上行 FM 音の変調速度とサリチル酸付加後の変化を示した。サリチル酸付加前、後 0.5, 1, 1.5, 2 時間後での FM 変調速度 1000, 800, 500, 250 Hz/ms(R)の下行 FM 音および上行 FM 音に対する時空間パターンを活動スポットの出現時間で表示した。

図5 Spatiotemporal patterns to FM in Left CTX



下行 FM 音刺激では、サリチル酸付加後、活動スポットが 2 つに分かれ、出現時間が遅れた。上行 FM 音刺激の場合は、活動スポットは 2 つのままであった。出現時間は、100-800R の変調速度

でほぼ変わらなかったが、500-250R の変調速度では高周波バンド方向に少しずれた。

図 6a は、上行 FM 変調速度とサリチル酸付加後の周波数バンド応答を示した。サリチル酸付加前、1000-800R の変調速度では、各周波数バンド応答は同期して立ち上がり、16kHz バンド応答が大きかった。500R になると 8kHz バンド応答が大きくなり、250R では、16kHz バンド応答が遅れて立ち上がった。サリチル酸 0.5 時間後の応答は変調速度が速いほど 8kHz バンド応答が大きかった。付加後 1 時間では以前の大きさに戻った。しかし、遅い変調速度では、振幅が半分になり、2 時間後には復活した。16kHz バンド応答は消失せず 8kHz バンド応答が大きかった。

図 6a Band responses to upward FM in Sal inj.

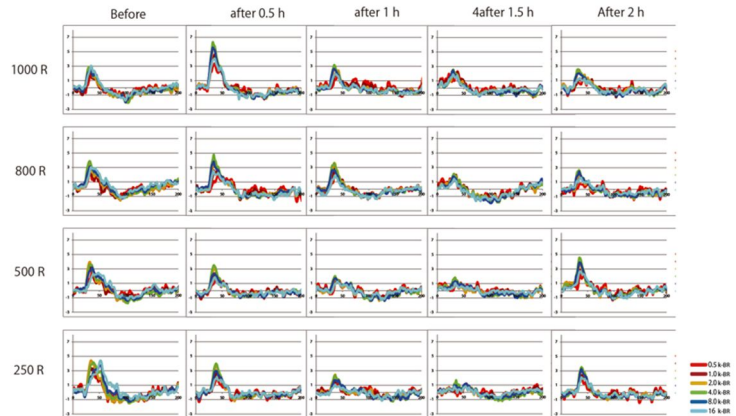
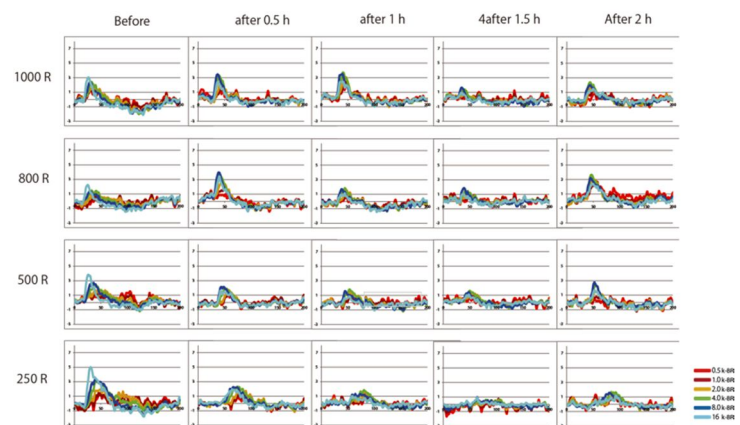


図 6b は、下行 FM 音の場合を示した。サリチル酸付加前は、1000R では各周波数バンド応答は同期したが、500R になると 16kHz バンド応答が最も早く、0.5kHz バンドが最後に立ち上がった。250R では、0.5kHz バンド応答は、16kHz バンド応答の off 応答と一致した。サリチル酸 0.5 時間後の応答は変調速度が速いほど 8kHz バンド応答潜時が短かった。付加後 1.5 時間で以前の振幅より小さくなり、2 時間後には復活した。変調速度が遅くなると off 応答のみになり、8kHz バンド応答が 16kHz バンド応答より大きかった。

図 6b Band responses to downward FM in Sal inj.



まとめ：

1. サリチル酸付加前と付加後で、純音刺激の音圧と周波数を変えて光学的応答の時空間パターンを作成すると、強い音圧では前後で時空間パターンに変化がなかった。低い音圧の純音では、サリチル酸付加後は応答がなく、全体的に閾値が減少した。
2. サリチル酸付加後の FM 音応答を調べると変調速度が速い場合は、0.5 時間後に応答の増大が見られるが、それ以外では応答が減少した。
3. 上行 FM 音では、サリチル酸付加前後で応答潜時に大きな変化は観察されなかった。
4. 下行 FM 音では、サリチル酸付加 30 分後には、周波数バンド応答は同期化し全周波数バンド応答で振幅が減少し、その後中間周波数バンド応答が復活した。下行 FM 音では off 応答のみ残った。
5. サリチル酸付加後下位から周波数情報の閾値が高くなり、皮質で過剰補正がなされ、中間周波数の閾値は戻ると推察される。長期に持続すると皮質での時間処理、周波数処理能力が低下し、左右の聴覚特性の差異は消失すると推察される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 0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 細川浩、杉本俊二、堀川順生	4. 巻 50 No.1
2. 論文標題 サリチル酸過剰投与によるモルモット一次聴覚皮質の空間的周波数特性変化	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本音響学会聴覚研究会資料	6. 最初と最後の頁 91-94
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Hosokawa Y, Kubota M, Sugimoto S, Horikawa J	4. 巻 70 (suppl. 1)
2. 論文標題 Salicylate-induced changes of the responses to the downward FM sounds in AI and DC field of guinea pigs observed by optical recording.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Physiol Sci	6. 最初と最後の頁 S109
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Hosokawa Y, Kubota M, Sugimoto S, Horikawa J	4. 巻 69
2. 論文標題 Salicylate-induced changes of tuning function in AI of guinea pigs observed by optical recording.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Physiol Sci	6. 最初と最後の頁 S138
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 細川浩、杉本俊二、堀川順生	4. 巻 48 No.2
2. 論文標題 サリチル酸過剰投与によるモルモット一次聴皮質の繰返し音応答変化	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本音響学会聴覚研究会資料	6. 最初と最後の頁 41-44
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Hosokawa Y, Kubota M, Sugimoto S, Horikawa J	4. 巻 68 S1
2. 論文標題 Salicylate-induced changes of the tonotopy map in the primary auditory cortex of guinea pigs observed by optical recording.auditory cortex of guinea pigs observed by optical recording.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Physiol Sci	6. 最初と最後の頁 S128
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 細川 浩
2. 発表標題 光学的測定法によるモルモット一次聴覚野のFM音応答の皮質活動伝搬の音圧依存性
3. 学会等名 日本生理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 細川浩、杉本俊二
2. 発表標題 光学的測定法によるモルモット一次聴覚野の上行FM音応答へのサリチル酸の影響
3. 学会等名 日本生理学会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 細川浩、杉本俊二、堀川順生
2. 発表標題 サリチル酸過剰投与によるモルモット一次聴覚皮質の空間的周波数特性変化
3. 学会等名 日本音響学会聴覚研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 細川浩、窪田道典、杉本俊二、堀川順生
2. 発表標題 光学的測定法によるモルモット一次聴覚野の下行FM音応答へのサリチル酸の影響
3. 学会等名 日本生理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hosokawa Y, Kubota M, Sugimoto S, Horikawa J
2. 発表標題 Salicylate-induced changes of tuning function in AI of guinea pigs observed by optical recording.
3. 学会等名 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiology Societies (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 細川 浩、杉本俊二、堀川順生
2. 発表標題 サリチル酸過剰投与によるモルモット一次聴皮質の繰返し音応答変化
3. 学会等名 日本音響学会聴覚研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 細川 浩、窪田道典、杉本俊二、堀川順生
2. 発表標題 光学的測定法によるモルモット一次聴覚野の周波数バンド構造へのサリチル酸の影響
3. 学会等名 日本生理学会
4. 発表年 2018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
---------	---------