

科学研究費補助金研究成果報告書

平成22年5月17日現在

研究種目： 基盤研究（A）

研究期間： 2007～2009

課題番号： 19200025

研究課題名（和文）聴覚野における和音・不協和音識別のメカニズム

研究課題名（英文）Neural mechanisms for perception of harmony in the auditory cortex

研究代表者

澁木 克栄（SHIBUKI KATSUEI）

新潟大学・脳研究所・教授

研究者番号： 40146163

研究成果の概要（和文）：

和音とは基音（F0）の整数倍の倍音の組み合わせからなり、和音を聴くと、その中にF0が含まれていない場合でもF0を知覚するので、F0応答を手掛かりに和音の識別メカニズムを探索することができる。我々はマウス聴覚野のF0に対する応答を経頭蓋フラビン蛋白蛍光イメージングによって可視化した。さらにこのF0応答の生ずるメカニズムを解析したところ経験依存的に形成された皮質内回路の働きによるものであることが判った。

研究成果の概要（英文）：

Perception of harmonic sounds is accompanied by sensation of the fundamental (F0) that is missing in the original sounds. Responses to this “missing F0” can be recorded in the primary auditory cortex. We investigated F0 responses, which were visualized using transcranial flavoprotein fluorescence imaging in anesthetized mice. Our results indicate that “missing F0” is produced by experience-dependent intracortical circuits in mice.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	14,500,000	4,350,000	18,850,000
2008年度	11,700,000	3,510,000	15,210,000
2009年度	11,700,000	3,510,000	15,210,000
年度			
年度			
総計	37,900,000	11,370,000	49,270,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学一般

キーワード：フラビン蛋白蛍光・経頭蓋イメージング・聴覚野・和音・マウス

1. 研究開始当初の背景

脳活動によって電子伝達系のフラビン蛋白は緑色自家蛍光を発する酸化型になる。この現象を利用すると、自家蛍光を利用した脳機能イメージングが可能である。特にマウス

は頭蓋骨の透明度が高く、経頭蓋イメージングができる。我々はこの方法を用いてマウス大脳皮質聴覚野の解析を行った。聴覚野ではTonotopic Map、即ちニューロンの至適周波数が高さに応じて並ぶ構造が観察された。し

かし両側聴覚野を破壊しても動物の周波数弁別能は低下せず、聴覚野の機能が周波数弁別にないことは明らかである。聴覚野の機能は種に特異的な鳴き声の弁別など、むしろ複数の周波数からなる複合音を特異的に識別する機能を持つと考えられている。従って和音（各要素の周波数が単純な比で表せる複合音）と不協和音（各要素の周波数が単純な比で表せない複合音）の識別も聴覚野でなされると予想される。しかし、和音と不協和音の識別メカニズムを動物実験で解析することは困難である。従って、我々は和音と不協和音を容易に聴き分けることができるにもかかわらず、どのようなメカニズムで識別しているのか、全く判っていない。

2. 研究の目的

和音と密接に関連した現象に Missing Fundamentals という現象が知られている。すなわち各要素の周波数が基本周波数 F0 の整数倍からなる合成音を聴かせた場合、この中に F0 が含まれていないときでも、あたかも F0 が存在するかの様に聞こえるという現象である。F0 が聞こえるのは、合成音の各要素の周波数比が比較的単純な和音の場合に限定され、不協和音では F0 は聞こえない。即ち、和音と不協和音をどのように聴き分けるのかという問題は、なぜ特定の合成音（和音）の場合にのみ F0 応答が出現するのかという動物実験で解析可能な問題に置換できる。後者を解析するために経頭蓋フラビン蛋白蛍光イメージングは適した方法である。何故なら聴覚野は Tonotopic Map 構造を持ち、F0 応答が出現するかどうかは特定の Tonotopic Map の区画が活動するかどうかで客観的に調べることができるからである。本研究では、この F0 応答をメルクマールにして、和音と不協和音の識別メカニズムを解明することを目的とした。また和音と並んで複雑な音を特徴づけるもう一つの要素である周波数変調 (FM) 音に関する解析も行った。

3. 研究の方法

ウレタンで麻酔したマウス聴覚野の応答を経頭蓋フラビン蛋白蛍光イメージングによって解析した。必要に応じて殆ど鳴かないプロトカドヘリン α 欠損マウスや皮質特異的に 50% の NMDAR 1 受容体を欠

損するマウスも使用した。また、マウスの聴覚機能を解析するため、行動学的なテストも行った。

4. 研究成果

(1) F0 応答の解析：

マウス大脳皮質の経頭蓋フラビン蛋白蛍光イメージングで聴覚野の音に対する応答を解析すると、音の高さに応じて応答する部位が異なる Tonotopic Map が確認された。20 kHz の音と 25 kHz の音のように比較的簡単な周波数比で表せる和音を聞かせると、応答が 5 kHz (20 kHz と 25 kHz の最大公約数) に対応する部位まで広がった。しかし、19 kHz + 26 kHz のように簡単な比で表せない不協和音の場合は応答部位が低周波数側に広がる現象は生じなかった。

我々は、聴覚野内の 20 kHz と 25 kHz に応ずるニューロン群が経験依存的に形成された皮質内結合を介して 5 kHz に相当する領域を駆動すると考えている。即ち、動物の鳴き声など自然界に存在する音は、基本周波数とその整数倍の周波数からなることが多いので、至適周波数が整数比で表される一連のニューロンは同期して発火する確率が高く、その結果として経験依存的な結合が形成され得る。この仮説を検証するため、20 kHz と 25 kHz の聴覚野領域をフラビン蛋白の退色を利用して経頭蓋的に光不活化した。このとき 5 kHz を直接聞かせたときの聴覚野の応答は抑圧されないが、20 kHz と 25 kHz の音を同時に聞かせたときの 5 kHz の脳部位の応答が消失した。この結果は皮質内神経回路によって 5 kHz の領域が駆動されていることを示唆している。

F0 が認知されるメカニズムとして従来想定されているのは、和音波形の繰り返し周期から F0 に相当する情報が抽出されるというものである。即ち、20 kHz と 25 kHz の波形を重ね合わせれば、5 kHz に対応するうなりが生ずるので、このうなりの情報から F0 が認知されるという考え方である。この可能性を否定するために我々は 20 kHz と 25 kHz の音をモザイク状に並べた音をマウスに聴かせ、モザイクの間隔が 15 ms 以下であれば F0 応答が生ずることを確認した。モザイク音には 5 kHz に相当するうなりが含まれないので、うなりからこの F0 応答が生じた

は考えられない。一方皮質レベルでは音の細かな時間的情報が失われるので、本来モザイク状であった音も皮質に到達する頃には融合した音として聞こえ、F0 応答が生じたと思われる。以上の実験結果からマウスにおいて F0 応答は皮質内回路の働きによって生ずることが強く示唆される。

(2) マウスの F0 認知能力の検討

従来 F0 を認知できる能力はヒトを対象とした研究で知られ、マウスで同様な能力があるかどうかの検討はなされてこなかった。またヒトの F0 は精々数百ヘルツしかなく、5 kHz というマウスの F0 はヒトより一桁以上も高い。そこで我々はマウスが 5 kHz の F0 を認知できるかどうかを行動学的に検証した。

まずマウスに 2.5 kHz と 5 kHz の純音を提示し、どちらか一方の提示中に報酬を与えた。その結果、マウスは報酬音の提示中に報酬を得るための行動を行い、他方の音を無視するような学習が成立した。その後、2.5 kHz の F0 (22.5+25+27.5 kHz の和音) と 5 kHz の F0 (20+25+30 kHz の和音) を聴かせ、マウスがどちらの音に報酬を得るための行動を示すかを解析した。その結果、マウスは F0 音があたかも純音であるかのような行動を示した。即ちこの実験によりマウスは 5 kHz 程度の高さまで F0 を認識できることが明らかになった。

(3) F0 を検出皮質回路の経験依存的形成

それでは F0 を検出する皮質回路は如何に形成されるのであろうか。一つの可能性は、この回路は本来マウスの鳴き声を検出するための回路であり、鳴き声を聴くという経験を繰り返し行うことにより、経験依存的に形成されるのではないかということである。即ち聴覚野の鳴き声に必ずニューロンは互いに結合して皮質内回路を形成することが知られ、またマウスの鳴き声は数キロヘルツを基音とし、基音とその整数倍の倍音から成り立っていることが知られているからである。従って、マウスにおける鳴き声を検出する回路は和音を検出する回路でもあり、そのような回路は、和音の成分から F0 を含む全ての成分に対する応答を再現できる回路でもあるはずである。

この仮説を検証するため、我々は鳴き声を発することが極端に少ないプロトカドヘリン α の欠損マウスで F0 応答がどうなるかを検討した。その結果、ホモ欠損マウスでは F0 応答が殆ど見られなくなることが判った。この実験に用いたホモ欠損マウスはホモ欠損マウスの両親を掛け合わせることで作られ、鳴き声を聴くという経験を殆ど持たない。しかし同じホモ欠損マウスでもヘテロ欠損マウスの両親同士を掛け合わせたとき 4 分の 1 の確立で生まれるマウスは、両親のマウスは普通に鳴くので鳴き声を聴くという経験を十分に有し、通常の F0 応答を示した。即ち F0 応答を示すか否かは、その個体がプロトカドヘリン α を有するかどうかではなく、鳴き声を聴くという経験を有するかどうかで決定されると考えられる。

もし F0 応答に経験が重要な役割を示すとしたら、異常な経験は異常な F0 応答を生じさせるのではないかと予想される。そこで我々はマウスを 19 kHz + 26 kHz + 5 kHz の混合音に曝しながら飼育した。このようなマウスでは、本来 F0 応答を生じさせないはずの 19 kHz + 26 kHz の不協和音で 5 kHz の領域に F0 応答様の反応を記録した。またコントロール実験として、19 kHz + 26 kHz の音の組み合わせと 5 kHz の音とを交互に聴いて育てたマウスでは、F0 応答様の反応は記録されなかった。以上の実験は、F0 を検出する皮質回路が経験依存的に形成されるという可能性を強く示唆するものである。

(4) 皮質 NMDA 受容体の関与

本来基音とその整数倍の倍音から成るマウスの鳴き声を聴くと、鳴き声の各成分にそれぞれ必ず皮質細胞間の結合が強化されるとすれば、それはヘップの法則で説明できる。ヘップの法則は NMDA 受容体の機能が必要であるとされているので、F0 を検出する回路の形成には NMDA 受容体の機能が必須であると予想される。そこで我々は皮質特異的に NMDAR1 受容体を 50% のみ欠くマウスで実験を行った。何故このようなマウスを用いたかということ、皮質特異的に全ての NMDAR1 受容体を欠くマウスでは、発育障害があり、何らかの異常知見があったとしても、一次的なものなのか、発育障害に伴う二次的なものなのかの区別が困難であ

るからである。

皮質特異的にNMDAR1受容体のヘテロ欠損マウスではF0応答の振幅が、コントロールマウスに比較して有意に小さいことが判った。この実験結果から、F0応答を検出する皮質内回路の形成にはNMDA受容体が必須であり、この回路がヘップの法則に従う経験依存的なメカニズムで形成されることが明らかとなった。

(5) FM音を検出する皮質内メカニズム

和音は自然界に存在する動物の鳴き声などの自然音を特徴づける性質の一つである。しかし、和音の他にも音の高さが変化する振動数変調(FM)音も別種の特徴の一つで、これらFM音を識別することは、動物にとって大きな意味を持つ。しかし聴覚野がFM音をどのように情報処理するかは良くわかっていない。本研究ではこの問題も解析するため、マウス大脳聴覚野活動を経頭蓋フラビン蛋白蛍光イメージングにより記録・解析した。純音に対する聴覚野の応答は一次聴覚野(A1)と前聴覚野(AAF)において周波数特異的なマップを示すことが知られている。FM音は高い音から低い音まで様々な高さの音を含むので、これを単に提示したのみでは、このA1とAAFのマップを含む聴覚野の広い領域が活性化されてしまう。そこで、特殊な刺激法を開発し、音の高さや強さを変化させずにFM変調の方向性のみを変化させた時の蛍光変化を記録し、聴覚野のどこがFM変調の方向性に応ずるのかを解析した。即ち一定の範囲で周波数が上昇する切れ切れのFM音を幾つか重ね合わせ、周波数毎の音圧がほぼ一定でありながらFM変調方向が上昇(下降)から下降(上昇)へとステップ状に変化する音刺激を与えた。このとき、AAFの内側かつA1の前方の限局した領域に蛍光応答を認めた。この領域はまた、FM音を提示したときに最も短い潜時で蛍光応答が出現する領域でもあった。このAAFの内側かつA1の前方の領域は、これまで超音波に特異的に応ずる部分であると言われてきたが、少なくとも我々が実験に用いたC57BL6系統のマウスのこの部分は超音波に対して明確な応答を示さなかった。従って、少なくともC57BL6系統のマウスではこの領域がFM音の処理に特化した領域である可能性がある。

和音はA1における経験依存的な皮質内回路形成機構で認知されると考えられるが、このようなFM音の処理はA1とは全く異なる領域においてなされるので、恐らくその回路形成機構も和音とは全く異なるメカニズムを有すると考えられる。それが如何なるものなのか、今後の課題として興味深い。

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12件)

Ohshima S, Tsukano H, Kubota Y, Takahashi K, Hishida R, Takahashi S, Shibuki K: Cortical depression in the mouse auditory cortex after sound discrimination learning. *Neurosci Res*, (査読有) 67: 51-58, 2010.

Kitaura H, Hishida R, Shibuki K: Transcranial imaging of somatotopic map plasticity after tail cut in mice. *Brain Res*, (査読有) 1319: 54-59, 2010.

Tohmi M, Takahashi K, Kubota Y, Hishida R, Shibuki K: Transcranial flavoprotein fluorescence imaging of mouse cortical activity and plasticity. *J Neurochem*, (査読有) 109 Suppl. 1: 3-9, 2009.

澁木克栄、吉武講平、駒形成司、塚野浩明、大島伸介、渡邊健児、任海学、菱田竜一(2009) マウス大脳皮質感覚野の経験による修飾。生体の科学、(査読無) 60巻、75-80頁、金原書店

Kitaura H, Tsujita M, Kakita A, Shibuki K, Sakimura K, Kwee KL, Nakada T: Activity dependent glial swelling is impaired in aquaporin-4 knockout mice. *Neurosci Res*, (査読有) 64: 208-212, 2009.

Kubota Y, Kamatani D, Tsukano H, Ohshima S, Takahashi K, Hishida R, Kudoh M, Takahashi S, Shibuki K: Transcranial photo-inactivation of neural activities in the mouse auditory cortex. *Neurosci Res*, (査読有) 60: 422-430, 2008.

高橋姿、高橋邦行、窪田和、大島伸介、

澁木克栄 (2008) 新しい光学的測定法による大脳聴覚野の機能解析 フラビン蛋白蛍光イメージング法。耳鼻咽喉科展望、(査読無)51(2)巻、74-81頁

澁木克栄、駒形成司、吉武講平、塚野浩明、菱田竜一(2008) 感覚野経験依存的可塑性の経頭蓋蛍光イメージング。「蛋白質 核酸 酵素」増刊号、増刊号、(査読無)53巻、512-517頁、共立出版

Watanabe K, Kamatani D, Hishida R, Kudoh M, Shibuki K: Long-term depression induced by local tetanic stimulation in the rat auditory cortex. Brain Res, (査読有) 1166: 20-28, 2007.

Kitaura H, Uozumi N, Tohmi M, Yamazaki M, Sakimura K, Kudoh M, Shimizu T, Shibuki K: Roles of nitric oxide as a vasodilator in neurovascular coupling of mouse somatosensory cortex. Neurosci Res, (査読有) 59: 160-171, 2007.

Kamatani D, Hishida R, Kudoh M, Shibuki K: Experience-dependent formation of activity propagation patterns at the somatosensory S1 and S2 boundary in rat cortical slices. Neuroimage, (査読有) 35: 47-57, 2007.

Hishida R, Kamatani D, Kitaura H, Kudoh M, Shibuki K: Functional local connections with differential activity-dependence and critical periods surrounding the primary auditory cortex in rat cerebral slices. Neuroimage, (査読有) 34: 679-693, 2007.

[学会発表](計1件)

Shibuki K. Transcranial flavoprotein fluorescence imaging of experience-dependent cortical plasticity. The 3rd ISN Special Neurochemistry Conference 8th International Meeting on Brain Energy Metabolism. June 28, 2008, Beijing, China.

[図書](計2件)

Shibuki K, Hishida R, Tohmi M,

Takahashi K, Kitaura H, Kubota Y: Flavoprotein fluorescence imaging of experience-dependent cortical plasticity in rodents. In In vivo optical imaging of brain function 2nd Edition (Frostig R ed). CRC Press, New York, pp193-220, 2009.

Shibuki K, Hishida R, Kitaura H, Takahashi K, Tohmi M: Coupling of brain function and metabolism: Endogenous flavoprotein fluorescence imaging of neural activities by local changes in energy metabolism. In Handbook of Neurochemistry & Molecular Neurobiology. 3rd Edition, Vol. 5, Neural Energy Utilization (Gibson G and Dienel G, ed). Springer, New York, pp322-342, 2007.

[その他]

ホームページ等

<http://www.bri.niigata-u.ac.jp/~physio/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

澁木 克栄 (SHIBUKI KATSUEI)
新潟大学・脳研究所・教授
研究者番号: 40146163

(2) 研究分担者

岩里 琢治 (IWASATO TAKUJI)
遺伝学研究所・個体遺伝研究系・教授
研究者番号: 00311332

工藤 雅治 (KUDOH MASA HARU)
帝京大学・医学部・教授
研究者番号: 80153310

(3) 連携研究者

八木 健 (YAGI TAKESHI)
大阪大学・生命科学研究所・教授
研究者番号: 10241241

菱田 竜一 (HISHIDA RYUICHI)
新潟大学・脳研究所・准教授
研究者番号: 90313551

任海 学 (TOHMI MANABU)
新潟大学・脳研究所・助教
研究者番号: 10401770