

平成 21 年 5 月 13 日現在

研究種目：若手研究(スタートアップ)
 研究期間：2007 年度～ 2008 年度
 課題番号：19890080
 研究課題名(和文) 内耳障害による大脳聴覚野周波数マップの可塑性
 研究課題名(英文) Transcranial fluorescence imaging of auditory cortical plasticity caused by cochlear injury
 研究代表者
 高橋 邦行 (Takahashi Kuniyuki)
 新潟大学・医歯学総合病院・医員
 研究者番号：40452057

研究成果の概要：

フラビン蛋白蛍光イメージング法を用いて、マウス大脳聴覚野の機能を研究した。その結果、以下の3つの成果を得た。

- ① 内耳障害マウスを用いて高音障害マウスの大脳聴覚野の反応を観察した。中等度以下の軽い難聴の場合、マウス大脳聴覚野マップに変化は見られなかったが、高度難聴になると中音域の活動が強くなっていた。
- ② 一定時間青色励起光を当てると、その領域の神経活動が抑制されるという光抑制法を用いて、大脳聴覚野の亜領域である前聴覚野(AAF)と、一次聴覚野(AI)の結合を解明した。その結果 AAF と AI の結合には、AAF から AI へという一方向性の流れがあることが証明された。
- ③ 報酬と関連づいた音(S+)と報酬をもらえない音(S-)とでマウスに弁別させる行動実験を行った。その結果、マウスはS+音に対する水のみ行動の数に変化はなかったが、S-に対する間違い行動が抑制されることで弁別学習が成立した。また弁別後のマウスの大脳聴覚野の反応を見るとS+の活動に変化がないのに対し、S-に対する活動が減弱していることがわかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,280,000	0	1,280,000
2008 年度	590,000	177,000	767,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,870,000	177,000	2,047,000

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：大脳聴覚野、フラビン蛋白蛍光、マウス、可塑性

1. 研究開始当初の背景

脳活動の計測法としてこれまでは脳表に

直接針電極を刺入し活動電位を記録する電気生理学的手法が主流であった。しかし針電

極では脳表から針周辺の細胞の活動が局所的に記録できるのみであり、神経活動をネットワークとして捉えることはできなかった。神経イメージングとは、これまで顕微鏡などで形態学的にしか見られなかった構造や、電気信号としてしか捉えられなかった機能を可視化する技術である。本法を用いることで、神経活動を拡がりとして記録することが可能となった。神経機能イメージングは何を捉え、可視化するかによって大きく分けられる。脳実質に光を照射し、そこから得られる吸光や蛍光を用いる光イメージング法、神経細胞内の血流変化、代謝量変化に注目し放射線同位元素を用いて可視化する PET、脳の活動に伴い変化する酸化型ヘモグロビン量を近赤外線で見える NIRS、脳血流を核磁気共鳴を用いて画像化する fMRI などが挙げられる。PET、NIRS、fMRI は侵襲が少なくヒトにも利用しやすいため、臨床応用もされているが、動物実験においては与える刺激やタスクの問題、脳の小ささに関連した解像度の問題から、光イメージングが広く行われている。

光イメージング法は大きく分けて、外因性色素を用いて神経の活動を捉える方法と、神経細胞に元々備わっている内因性物質の変化を用いて神経活動を捉える方法とに分けられる。外因性色素を用いると反応は強く得る事ができるが、それ自体の毒性の問題、染色ムラや時間経過とともに退色するというデメリットがあるため、信号の反応強度と神経活動の強さとの相関の評価は難しい。一方、内因性信号を用いる方法は毒性や退色の問題はないが、色素を用いる方法に比し反応が小さい。一般に内因性信号という場合、酸化型ヘモグロビンと還元型ヘモグロビンの吸光度の差を用いて画像化する方法を指す事が多いが、信号強度が小さいというデメリットを持つ。そこで我々は内因性信号のひとつであるフラビン蛋白蛍光に注目し研究を行った。

フラビン蛋白蛍光イメージング法とはミトコンドリア内電子伝達系のひとつを担うフラビン蛋白が還元型から酸化型に変化するときに青色励起光により緑色蛍光を発するという性質がある。そのため神経細胞が活動すると活動した部位の代謝が亢進し蛍光を発する。これを捉え画像化する。マウスの頭蓋骨は非常に薄く、肉眼的に脳表が透けて見える。そこで経頭蓋的に青色励起光を照射し、実験を行うこととした。

これまでの電気生理学的実験から大脳聴覚野には音の周波数に応じて反応しやすいそれぞれ固有の神経細胞があり、列を成して

並んでいるということがわかっている。動物によって反応しやすい音の周波数は決まっているため、このマップは動物固有のものとなる。マウスは脳が小さくもろいため、針電極による電気生理学的実験を行うことが難しかった。我々はフラビン蛋白蛍光イメージングを用いて、無侵襲にこのマップを見ることに成功した。あわせてある偏った音の環境で飼育すると曝露された音の周波数に対する反応が増強するという結果を得た (Takahashi K, Hishida R, Kubota Y, Kudoh M, Takahashi S, Shibuki K: Transcranial fluorescence imaging of auditory cortical plasticity regulated by acoustic environments in mice. *Eur J Neurosci* 23(5):1365-76, 2006.)。このような聴覚野の可塑的变化は言語理解、発達と関連しているといわれ、重要な意味を持つとも考えられた。

2. 研究の目的

研究代表者は耳鼻咽喉科医であり耳領域を専門としている。日常臨床で難聴患者と接すると、難聴の訴えはただ単に音が聞こえないということだけではなく、言葉として聞き取れないという訴えが多いこと、難聴の訴えとともに、耳鳴や周囲の音が響いて聞こえるといった過敏反応が随伴することも多く、悩まされていることがわかった。そこで、難聴患者で言語理解能力が低下する要因、難聴に随伴する耳鳴、反響などの現象はどのようにして起こるのかを解明したいと考え、難聴が起きたときの大脳聴覚野マップの変化から、このような現象のメカニズムを探ることを目的とした。また行動実験と組み合わせることで、行動、現象と関連した大脳聴覚野内の反応を捉えることも合わせて考えた。

3. 研究の方法

7-10 週齢 C57BL/6 マウスを購入し、下記のさまざまな音に対する大脳聴覚野周波数マップをイメージングする。

イメージング法：経頭蓋的にフラビン蛋白蛍光イメージングを行う。ウレタンの腹腔内投与によって麻酔したマウスの頭部皮膚を切除、側頭筋を翻転させ、大脳聴覚野を明視下に置く。頭蓋骨表面の乾燥を防いで透明性を維持するために流動パラフィンとワセリンを薄く塗布する。経頭蓋的に青色励起光 (450-490 nm) を脳表に照射し、神経活動に伴い脳表より放射される緑色自家蛍光 (500-550 nm) を冷却 CCD カメラにより撮影する。体温は 37°C に維持し、自発呼吸下に測

定を行う。反応は右大脳聴覚野より1秒あたり9フレームの頻度で撮影する。1分毎に繰り返して得られた画像データを24回試行分加算平均した後、5×5マトリックスフィルターで平滑化して画質を向上させる。刺激直前の5フレームの平均に対する各フレームの蛍光強度変化($\Delta F/F$)を算出し、擬似カラー表示を行う。それぞれの音に対する反応ピークを画像上より求め、そのピーク値、経時変化、反応領域の面積を解析する。

刺激音：刺激はマウス前方のスピーカーから発生させる。音の種類として純音、AM音、FM音を基本とし、マウスの可聴域である5-40kHzの間で変動させる。

内耳障害モデル：マウスに30kHz、110 dB SPLの音を1-2時間聞かせる。音暴露により蝸牛に傷害を与え、高音を中心とした難聴を生じさせる。その後、1週間間隔を空けイメージングを行い、正常マウスとの反応の違いを観察する。

光抑制：我々はフラビン蛋白蛍光イメージングを行っているときに、ある一定時間長期に青色励起光を当て続けた後に反応を測定すると、反応が抑制されるという現象を得た。またこの反応は光を当て続けた限られた領域にのみ起こり、しばらくすると回復するという可逆的反応であることもわかった。これを光抑制法とした。そこで、いまだその機能が未解明である大脳聴覚野内の亜領域、前聴覚野、一次聴覚野それぞれに青色光を40分程度照射したマウスを作成し、光抑制後の反応の違いを観察した。

2音弁別行動実験：予めマウスに1-2日水を与えないようにし、水分を欲する状態にしておく。その後、一定の大きさのケージの中で自由に動けるようにしたマウスに音を提示する。基本は2音の弁別を行わせることにし、ある音(S+音)が鳴ったときに給水口をなめると報酬として水が与えられるが、他の音(S-音)では給水口をなめても水が出ないという学習をさせる。弁別学習が成立したマウスで、それぞれS+音、S-音に対する反応についてイメージングを行い、学習していないマウスと比較、検討した。

4. 研究成果

内耳傷害モデルマウスによる実験：強大音を負荷することにより、曝露した音の周波数よりも高い周波数帯に難聴が生じた。高周波数帯の難聴の程度を、50dB程度までの軽度難聴、80dB程度までの中等度難聴、それ以上の音圧でも聞こえなくなった高度難聴に分類し、解析した。その結果、軽度から中等度難

聴になった場合、大脳聴覚野周波数マップ上で、難聴になっていない低から中周波数領域の反応の強さ、領域に変化はなかった。一方、高度難聴になると低周波数領域の反応は変化がなかったが、中周波数領域の音に対する反応が強くなった。このことから高周波数領域が高度難聴になり、大脳聴覚野内でそれに対応する領域への入力が少なくなることにより、その近傍の領域の反応が強くなるということがわかった。

光抑制による大脳聴覚野内亜領域の機能解明：光抑制を用いて大脳聴覚野亜領域である前聴覚野(AAF)、一次聴覚野(AI)をそれぞれ抑制し、大脳聴覚野の反応を見た。その結果、AAFを抑制した場合、AAFの反応のみならず抑制していないAIの反応も一緒に低下したが、AIを抑制した場合はAIの反応の低下のみ見られ、AAFの反応の低下は見られなかった。このことからマウス大脳聴覚野内ではAAF→AIという一方向性の神経結合が存在していることが示唆された。

2音弁別行動実験 水分摂取を控えさせたマウスに行動実験を行い、水を報酬としてもらえるS+音と、音が鳴っても何ももらえないS-音を弁別させることができた。S+、S-音にそれぞれ純音どうして周波数を変えた組み合わせ、AM音どうしてAM周波数を変えた組み合わせ、FM音どうして変調方向を変えた組み合わせ、さらに純音とAM音、純音とFM音をそれぞれ組み合わせ、またS+音、S-音を逆にすることで実験を行った。結果はどの組み合わせにおいても、2音の弁別は可能であった。また、2音の弁別はS+音に対する水のみ行動の回数は変わらなかったが、S-音に対する水のみ回数が減少することで成立した。学習成立後のマウスを用いて大脳聴覚野の反応を測定すると、S+音に対する反応はいずれの音の場合でも学習していないマウスに比し変化がなかったが、S-音に対する反応が、S-がAM音、FM音であった場合に限り低下していた。すなわちS-音が純音であった場合は、弁別学習が成立していたにもかかわらず、大脳聴覚野での反応に変化はなかった。以上の結果から音の弁別学習はS-に対する音に対する不必要な行動低下と、それに伴って大脳聴覚野での反応性の低下という形で成立することがわかった。また純音のように単純な音の場合は大脳聴覚野で学習が成立するのではなく、さらに低位の神経核で学習が成立するということが示唆された。

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)

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.* 60: 422-430. 2008.

[学会発表] (計 7 件)

Kuniyuki Takahashi, Tadashi Wada and Sugata Takahashi: Cochlear implantation and critical periods for recovery in speech recognition. (The 12th Auditory Research Forum: 2007 年 12 月 1 日)

Shinsuke Ohshima, Hiroaki Tsukano, Yamato Kubota, Kuniyuki Takahashi and Katsuei Shibuki: Transcranial flavoprotein fluorescence imaging of neural activities in the mouse auditory cortex after sound discrimination learning. (The 12th Auditory Research Forum: 2007 年 12 月 1 日)

amato Kubota , Kuniyuki Takahashi , Shinsuke Ohshima , Katsuei Shibuki and Sugata Takahashi: Transcranial functional brain imaging using flavoprotein autofluorescence in the mouse auditory cortex. (The 12th JAPAN-KOREA Joint Meeting of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery: 2008 年 4 月 5 日)

大島伸介、窪田和、高橋邦行、澁木克栄、高橋姿: 経頭蓋的フラビン蛋白蛍光イメージングで捉えた 2 音弁別学習によるマウス一次聴覚野の可塑性. (第 6 回側頭骨疾患研究会: 2008 年 1 月 12 日)

大島伸介、窪田和、高橋邦行、澁木克栄、高橋姿: 経頭蓋的フラビン蛋白蛍光イメージングで捉えた 2 音弁別学習によるマウス一次聴覚野の可塑性. (第 109 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会: 2008 年 5 月 16 日)

大島伸介、塚野浩明、窪田和、高橋邦行、菱田竜一、高橋姿、澁木克栄: マウス音弁別学習による聴覚野活動変化の経頭蓋蛍光イメージング. (第 31 回日本神経科学大会. 2008 年 7 月 10 日)

Shinsuke Ohshima, Hiroaki Tsukano, Yamato Kubota, Kuniyuki Takahashi, Ryuichi Hishida, and Katsuei Shibuki: Transcranial flavoprotein fluorescence imaging of cortical depression in the mouse aud

itory cortex after sound discrimination learning. (The Society for Neuroscience 2008 Annual Meeting. 2008 年 11 月 17 日)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 邦行 (Takahashi Kuniyuki)
新潟大学・医歯学総合病院・医員
研究者番号: 40452057

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし