

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：34310  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2009～2011  
 課題番号：21700209  
 研究課題名（和文） 脳幹神経ネットワークによる発声の聴覚フィードバック制御モデル  
 研究課題名（英文） Neural substrate for auditory feedback control of vocalization  
 研究代表者  
 小林 耕太 (KOBAYASHI KOHTA)  
 同志社大学・生命医科学部・助教  
 研究者番号：40512736

研究成果の概要（和文）：キクガシラコウモを被験体とし脳幹部の神経ネットワークが聴覚発声制御に果たす役割の解明を目指し、聴覚発声制御中の動物の脳幹からの活動電位の記録および薬理操作を同時実行した。疑核において発声の周波数および時間パラメタ(持続時間、発声間隔)それぞれを特異的に関与する部位の同定に成功し、周波数制御に相関して活動が変化するユニットは薬理学操作により GABA あるいは GABA 受容体の薬理操作により神経活動が有意に変化した。この結果は発声の周波数と時間パラメタは独立制御を受けること、周波数を制御する神経は GABA による抑制制御を受けることを示唆する。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to investigate neural mechanisms of the audio feedback control of vocalization using the horseshoe bat as a model animal. Single unit recordings and pharmacological manipulation of the neural activities in nucleus ambiguus (NA) were conducted while the subject animals were controlling their frequency and temporal parameters of vocalization depend on the auditory feedback of their echo. Results show that regions where the drug injections can affect the frequency and temporal aspect of vocalization are anatomically segregated, and all frequency correlated units in NA received GABAergic control.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	300,000	90,000	390,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：情報学・知覚情報処理・知能ロボティクス

キーワード：コウモリ / センサー統合・統合 / 聴覚フィードバック

1. 研究開始当初の背景

本研究の目的は、発声の聴覚フィードバック制御を司る神経メカニズムを明らかにすることであった。現在までヒトでは聴覚-発声制御システムの研究は脳内のどの部位が中枢であるかの特定もなされていない。吃音

(日本国内に約 120 万人の患者が存在する)に代表される非流暢性発話の原因も聴覚フィードバック制御の障害によるが、聴覚-発声統合のシステムが解明されていないため、有効な治療法が存在しない。

現在までに行われた聴覚フィードバック

による発声制御の生理機構の研究はヒトを対象にした研究と動物を対象にした研究の2つに大別される。ヒトを対象とした研究では心理実験および脳機能計測の結果、フィードバック制御に関与する複数の独立した神経系路の存在が示唆されている。具体的には言語学習のような高度なフィードバック処理は皮質が、発声のピッチや振幅の維持のような基礎的な制御は脳幹部が担う可能性が示された。一方で動物を使用した生理メカニズムの研究では、発声行動が聴覚系（皮質および脳幹）の神経活動に影響を与えること、聴覚刺激が発声制御系の活動に影響を与えることが複数の哺乳類（サル、ネコ）を対象として独立に報告されている。この結果はヒトで存在が示唆されている発声パラメータの基礎的な制御を担う部位が哺乳類一般に存在することを示している。しかしどのような神経ネットワークにより、聴覚情報のどの側面が具体的に発声のどのパラメータに影響を与えるかについては依然不明のままである。先行研究の問題として以下の3つがあげられる。生理実験が容易な実験動物（ラット、サル、ネコ等）の発声は複雑な音響構造を持つため、音声を定量的に分析するのが困難。実験の多くでは、音声を誘発するために電気刺激を使用しているが、脳幹部の実験では記録地点が刺激地点と近くなるため、神経活動の記録が不可能。ヒトやコウモリと異なり、多くの哺乳類は聴覚を剥奪されてもほぼ正常に発声することが可能であり、聴覚フィードバックが発声に影響を与えないため、聴覚刺激を独立変数としたデータを得ることが困難な点である。

## 2. 研究の目的

上述の問題を解決し、発声の聴覚フィードバック制御を司る神経メカニズムを明らかにするため、キグガシラコウモリ (*Horseshoe bat, Rhinolophus ferrumequinum*) をモデル動物とした研究を実施した。コウモリは超音波による発声を行い、その発声（コール）が物体から反射して返ってくる反射音（エコー）を聴くことで、外界の位置関係を感知している。多くのコウモリのなかでもキグガシラコウモリは聴覚フィードバック制御の研究において特に有用なモデル動物である。その理由は、彼らは聴覚フィードバックに依存して、リアルタイムで発声の周波数制御を行っているからである。具体的には、彼らは餌である虫を捕まえるために飛行しながらソナーを使用するが、飛行によるドップラーシフトによりエコーの周波数が絶えず変化する（最大 3kHz）。その時、エコーの周波数が一定になるように、発声するコールの周波数を常に調整しているのである。この行動はドップラ

ーシフト補正行動（DSC: Doppler-shift compensation）と呼ばれ、この行動を対象とすることで従来の研究の問題点を克服できる。

すなわち、(1) キグガシラコウモリのコールは主として狭い帯域の音声からなり、音響構造が単純であるので定量分析が容易である。(2) DSCは極めて定型的な行動であり、脳定位固定装置に拘束した状況でも動物は自発的（電気刺激を必要とせず）に発声およびDSC行動をおこなう。(3) 実験者が操作した擬似エコーによりこの行動を誘発することが可能であり、詳細な入出力の関係を記述し、実験することができる。このような行動的な特殊性にも関わらず聴覚および発声を支配する基本的な（脳幹部の）神経解剖および生理学的な性質についてコウモリは他の哺乳類とよく共有している。以上の行動学的ならびに生理学的な利点を利用することで哺乳類における発声の基礎的パラメータの聴覚フィードバック制御機構の研究をおこなった。

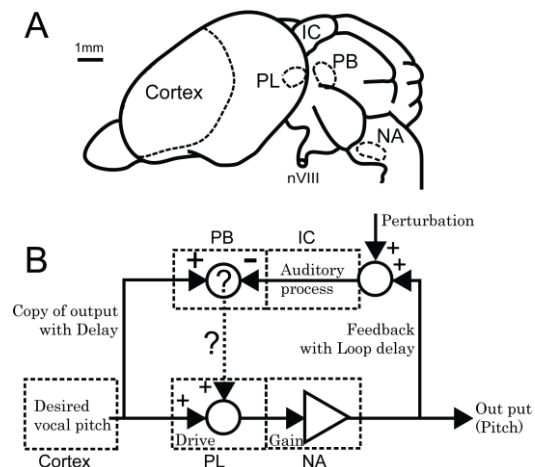


図1 キグガシラコウモリの聴覚-発声統合に関わる神経系とその役割 A. 聴覚フィードバック制御に関与する主要な神経系。脳側方からの図、左が前方。B. 本研究計画が推定している、フィードバック制御の神経ネットワーク。

### 各部位の名称

PL: Para-Lemniscal tegmentum. PB: ParaBrachial nucleus. IC: Inferior Colliculus. NA: Nucleus Ambiguus. nVIII: Cranial Nerve VIII.

## 3. 研究の方法

被験体として成体のキグガシラコウモリを使用した。動物は地方自治体の許可に基づいて捕獲した野生動物であった。飼育は温度、湿度、日照時間がコントロールされた動物舎

において、自由給水、自由給餌されていた。飛行に関するエコーロケーション行動・発声制御行動が損なわれないよう飼育環境は彼らが飛行するのに十分な広さが確保されており、エサおよび水はその摂取のため飛行する必要があるよう配置されていた。

### (1) PB ニューロンが周波数制御において果たす機能の推定

コウモリはスピーカからの擬似エコーに応答し発声周波数の調整 (DSC 行動) を行う (図 2)。DSC 行動下の動物の PB ニューロンの活動をシングルユニット記録することで、PB が周波数制御において果たす機能の推定を目指した。研究開始までに予備実験として PB の神経活動の細胞外記録に成功していた。実験では神経の活動の変化が目標周波数や発声周波数に相関するか、あるいはエコー周波数およびエコーの遅延時間とに相関するかについて定量化をおこなった。

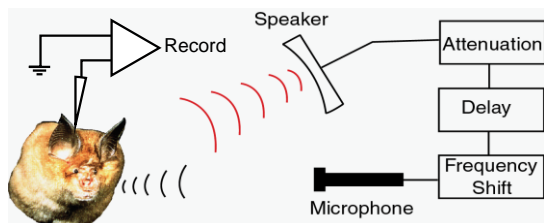


図 2 実験装置の模式図

### (2) 脳幹の発声制御神経である疑核における発声のパラメータ制御 薬理的な同定

キクガシラコウモリは DSC 行動に加え聴覚フィードバック (エコー遅延) に依存して発声の持続時間、発声間隔も変化させる。この行動を利用して、聴覚フィードバックに依存する発声のパラメータ制御に関与する部位の同定を目指した。具体的には発声器官の筋肉 (声帯筋) を制御する運動ニューロンが存在する疑核の神経活動を局所的 ( $\pm 300 \mu\text{m}$ ) に薬物注入により変化させ (Muscimol および Kynurenic Acid による) 発声への影響を調べた。

### (3) BIC/ICX (下丘腕/下丘外側核) の聴覚フィードバック制御への関与

実験 (2) と同様の操作を聴覚フィードバック制御の中核と推定される PB に出力をもつ BIC/ICX に対して行い、聴覚フィードバック行動への影響を観察・定量化することで BIC/ICX の聴覚フィードバック制御に果たす役割を推定した。

### (4) 脳幹の発声制御神経である疑核における発声のパラメータ制御 活動電位記録

発声の周波数制御に特異的に関与すると推定された疑核吻側部について聴覚発声制御中 (DSC 行動中) の神経活動を記録した。実験では電解液 (KCl) を充填したガラス管電極を使用し、細胞外電位を記録した。また活動記録と同時に神経活動の薬理操作をおこなった。

### (5) コウモリ以外のほ乳類を使用した発声制御の研究

コウモリを対象として得られた発声制御に関わる神経系の機能について、コウモリ特異的な存在でないことを確認する目的で、聴覚生理学の標準動物の 1 種であるスナネズミ (*Meriones Unguiculatus*) を被験体として発声制御系を電気刺激により同定するとともに薬理操作実験をおこなった。

## 4. 研究成果

本研究の目的は聴覚-発声制御における脳幹神経ネットワークの役割を明らかにすることであった。主としてキクガシラコウモリを被験体とした研究により、聴覚フィードバック制御回路は発声のパラメータ毎に解剖学的に独立したネットワークにより制御されること、周波数制御についてはフィードバックゲインをコントロールする中枢が存在する可能性が示唆された。

本研究では聴覚発声制御の神経機構解明を目指し、ネコ、サル等を使用した従来の実験では困難な研究を計画・遂行した。ほ乳類以外のモデル動物を使用した発声制御の神経機構の研究では国内外ともに鳴禽類 (歌鳥) を対象にしたものが最も盛んに行われている。それらの研究では聴覚による実時間制御ではなく、発声の音列の順列制御が対象である。また研究対象として脳幹部ではなく大脳-基底核のネットワークを対象としている。

ヒトでは、発声の制御には複数の機能的に独立した回路 (大脳と脳幹に存在すると推定されている) が関与することが知られており、鳴禽類における国内外の成果と本研究の成果を今後統合していくことで、ヒトを含む動物の行う聴覚発声制御の総体を研究・解明していくことが可能であろう。

以下には個々の実験結果をまとめた。

(1) 予備実験に引き続き発声中の PB ニューロンの活動パタンの違いにより神経の分類をおこなった。その結果 PB 内には、聴覚応答型、Pre Motor 型および聴覚入力と発声行動の両方に依存して活動を変化させる聴覚発声依存型の 3 種類の神経が存在することを確認した。計画では聴覚発声依存型ニューロ

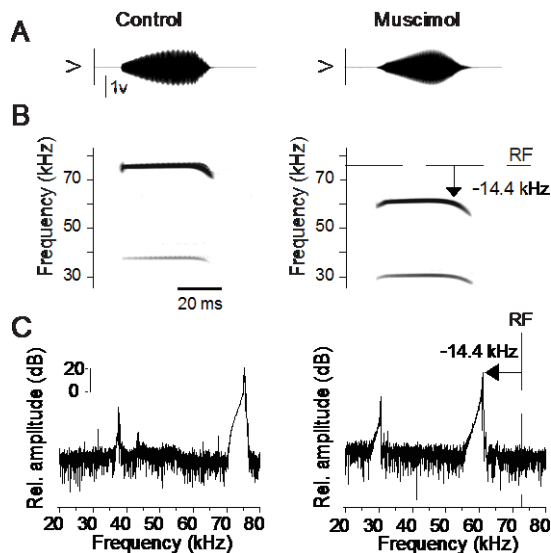


図3 疑核吻側部にMusimol (GABA作動薬)を局所注入した際の発声周波数の変化

ンに注目し、そのPB内における分布を明らかにすることで、それと平行して、どのような聴覚入力と発声出力に対応して、どのような活動パターン変化を示すかを記録する予定であった。しかしPBニューロンを安定して長時間記録することが困難であり、目標をはたすために必要なデータ(ユニット数)を得ることができなかった。今後より安定して長期記録を行うためには、動物の固定方法の工夫等、さらなる記録方法の改善が必要であろう。

(2) 発声を直接制御する脳幹の神経核(疑核:Nucleus ambiguus)において周波数、発声の持続時間、発声間隔を制御する部位を同定した。疑核およびその周辺に神経活動(Muscimol, AMPA, Bicuculline, Kynurenic Acid)を操作する物質を注入することで、発声のパラメータを制御する神経部位の機能局在を検討した結果、上述3つの発声パラメータは、解剖学的に極めて限局・独立した部位が制御することが分かった(図3 周波数への影響)。以上の結果は発声のフィードバック処理を担う回路は制御パラメータ毎に独立していることを示唆する。

(3) 脳幹部における聴覚の中核、下丘(Inferior colliculus)の腹側周辺の神経活動をMuscimol(およびKynurenic Acid)の局所注入により局所的( $\pm 250 \mu\text{m}$ )に変化させると周波数のフィードバック制御の精度が改善する(誤差  $\pm 600\text{Hz} \rightarrow \pm 120\text{Hz}$ )現象が観察された。また薬理操作を行った部位につ

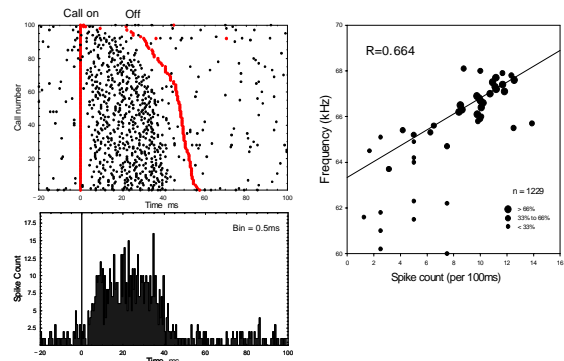


図4 キクガシラコウモリの疑核の発声周波数に相関する神経活動

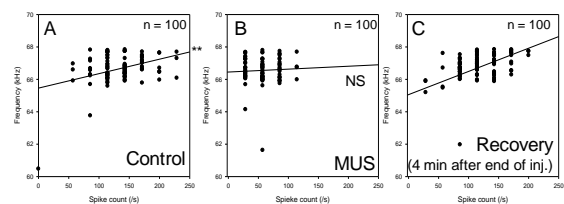


図5 キクガシラコウモリの疑核の発声周波数に関与する神経(図3と同一のユニット)にMusimolを投与した際の神経活動の変化。

いては同定をおこなった結果、ICX(下丘外側核)が実際の注入部位であった。この結果は発声の実時間フィードバック制御においてフィードバックゲインを調整する部位が存在する可能性を示す。

(4) 脳幹部疑核の吻側部分(直径 $400 \mu\text{m}$ )からの発声中の活動電位の記録を行った。記録を行なった全ての神経(72ユニット)の内、19ユニットは発声開始あるいは発声中に活動し、発火率と発声周波数に有意な正の相関が見られた(図4)。これらの神経のうち薬理試験を行なった神経(8ユニット)は全てGABAあるいはGABA受容体の薬理操作(MuscimolあるいはBicuculline)により神経活動が有意に変化した(図5)。これは発声周波数を制御する神経(輪状甲筋を支配すると考えられる)はGABAによる制御を受けることを示唆する。

(5) 聴覚生理学の標準動物であるスナネズミを被験体とし、発声制御を司る脳神経ネットワーク(中道水道周辺灰白質)を電気刺激し発声させると同時に、疑核の神経活動を薬理操作する実験を行なった。結果、彼らの発声

レパートリの中で親和的な文脈で使用される超音波音声を誘発可能な部位の同定に成功した。薬理操作ではコウモリと同様な発声パラメタの変化は観測されなかった。スナネズミを被験体とした実験系を確立できれば、野生動物であるため個体数の確保が困難であるコウモリの実験成果を参考に効率良く聴覚発声制御の神経系の研究・解明が可能になると期待できる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

(1) Kohei Nishiyama, Kohta I. Kobayasi, and Hiroshi Riquimaroux, Vocalization control in Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*) during locomotion behavior. Journal of the Acoustical Society of America, 査読有, 130: 201 1p4148-4157. 査読:有  
DOI: 10.1121/1.3651815

(2) Kohta I. Kobayasi and Hiroshi Riquimaroux, Classification of vocalizations in the Mongolian gerbil, *Meriones unguiculatus*. Journal of the Acoustical Society of America, 131:2 012 p1622-1631. 査読:有  
DOI: 10.1121/1.3672693

(3) 小林耕太 Vocalization Mechanism of Small Mammals : Mongolian Gerbil and Horse shoe Bat Model 同志社大学理工学研究所シンポジウム講演予稿集 47. 41-45 (2009) 査読:無

〔学会発表〕(計7件)

(1) Kashiwagi, A., Furuyama, T., Kobayasi, K. and Riquimaroux, H. Different type of communication calls are elicited by electric stimulation in Mongolian gerbil. Auditory Research Forum 2011, 2011年12月3日, 同志社大学びわこリトリートセンター

(2) Akiyama, N., Kobayasi, K. and Riquimaroux, H. Responsible areas for the perception of FM sound in Mongolian gerbils: Near-infrared laser study. Auditory Research Forum 2011, 2011年12月3日 同志社大学 びわこリトリートセンター

(3) 小林耕太, 力丸裕, Walter Metzner. コウモリの超音波発声にみられる行動の機能と生理学的要因の関連 Animal2011 (日本動物行動学会), 2011年9月8日. 慶応義塾 大学三田キャンパス

(4) 小林耕太, 岡ノ谷一夫, Walter Metzner. 生体における発声制御と聴覚の関連. ロボット学会 第66回シンポジウム, 2011年9月14日. 東京大学 本郷キャンパス

(5) 小林耕太. コウモリおよび鳥類における聴覚が発声に与える影響" 日本解剖学会, 2010年3月28日. 岩手県民会館

(6) 小林耕太. キクガシラコウモリの超音波発声を支配する神経の仕組み 日本動物行動学会, 2009年11月28日. 筑波大学

(7) 小林耕太. An in vitro Model of Vocalizations for the Doppler-Shift Compensating Bat, *Rhinolophus ferrumequinum*" Auditory Research Forum, 2009年12月05日. 同志社びわこリトリートセンター

(1) 研究代表者

小林 耕太 (KOBAYASI I KOHTA)  
同志社大学・生命医科学部・助教  
研究者番号: 40512736