

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22500368

研究課題名(和文)社会行動を利用したモルモット音弁別の音響および神経基盤

研究課題名(英文) Neural mechanisms of discrimination of natural sounds learned by guinea pigs in the competition-based training

研究代表者

小島 久幸(OJIMA, HISAYUKI)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・講師

研究者番号：00104539

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：モルモットを用いて音識別学習系を確立し、音識別した動物の聴覚皮質における神経活動の特徴、特に時間情報の表現、を見いだすことを目的とした。競争原理に基づいた新しいトレーニング法を開発し、訓練が困難な動物の学習を容易にした。条件刺激音に対する訓練動物の聴覚野における活動(膜電位感受性色素を用いた光学的イメージング)と、訓練を受けない対照動物での活動には明確な差がなかった。しかし条件刺激音を時間軸に沿って反転した逆転音に対して、両群間で活動ピーク比の有意な差(対照>訓練; $p<0.05$)を見いだした。この結果は聴覚皮質の可塑的变化では、回路が時間情報の処理に特化するように変化した可能性を示唆する。

研究成果の概要(英文)：The current study is to illustrate changes in global activation pattern after conditioning to a natural sound (footstep, F sound). Our assumption is that behavioral achievement would be linked to changes in cortical network. This was revealed in the voltage sensitive dye optical imaging. Competitive training, in which multiple animals were trained together, facilitated animals to reach reward earlier than competitors. Imaging results showed that obvious differences in cortical activation have not been found between naive and trained animals with F sound. The time-reversed F sound, which is spectrally the same as but temporally reversed from F sound, resulted in reduced peak activation, both in naive and trained animals, but in much more reduction in trained animals. These results suggest that the cortical network which may have been dominantly tuned to F sound suppresses activation by its temporally-modified version more efficiently than the corresponding naive network.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・融合基盤脳科学

キーワード：auditory cortex natural sound discrimination classical conditioning voltage-sensitive dye imaging positive reinforcement guinea pigs

1. 研究開始当初の背景

動物の生息する自然界では、音研究で従来使用されてきた純音や白色ノイズのような音響シグナルは極めて希で、多くが周波数軸に沿った複数のエネルギーピークを示す音響構造を持った広帯域ノイズである。また経時的なエネルギー分布も音開始時点で強く徐々に減弱していく特性を示すことが多い。このような音響構造を示す自然音には、音を識別する手がかりが複数あり、音識別を行なう際に全体として”acoustic object”として捉えられる。

この自然音刺激がどのように脳において処理されるかは、純音での脳内処理や条件づけに関する知見（例えば LeDouex group の業績）とは対照的に、まだ十分に解明されていない。特に自然音がどのように記憶され、識別されているかは多くが未解明であり、動物を用いた脳科学的アプローチに基づいた実験系を必要としている。音の処理機構の解明には音響要素（周波数とか時間情報）に対する応答性を丹念に調べ上げて、それを統合していくアプローチが従来行なわれてきた（例えば Wang group の業績）。一方、自然音そのものを刺激単体として用いることは比較的最近に始められ、一定の知見が得られている。そこでは構成する周波数要素の役割がどのように表現されているか、あるいは異なる重みづけがどのようになされているかに関して調べられてきている。

本研究では主に自然音に含まれる時間情報を操作し、それに伴い動物の行動様式がどう変更され、それに伴い脳内表現がどのように活性化されるのかを神経行動科学的に解明することを研究の目標とした。その際、ある特定の自然音を条件づけに用い、それと周波数情報は同一だが時間関係が異なる時間逆転音に対する応答性を訓練動物とナイーブ動物間で比較し、条件行動の惹起に対応して皮質活動性がどのように変化がするかどうかという観点から、この問題に挑んだ。

2. 研究の目的

上記の目標である音識別における時間情報の意義を調べるため、時間情報を変調した音に対する行動様式の変化を見だし、かつ呼応する聴覚皮質活動の変化を解析する実験系を確立することをめざした。その際”自然音を処理する”ということ、刻々と変化する複数の周波数集合を対応周波数部位の集団が逐次的に処理していくと仮定した。従ってある自然音に特異的に条件づけられた聴覚皮質は、特定の周波数表現部位が強く結合し、また相互に結合する部位間には活性化の方向性があると考えた。即ち行動-皮質活動関連を解明するため、ある自然音に対して条件付けされた実験群と条件付けされていない対照群と比べ、どのような点において皮質活動の変化が生じているか、また、識別群とそれを学習していない対照群で、訓練音とは

時間情報のみが異なる時間逆転音に対しどのように皮質応答性が変化するかを見いだす。その差異が条件行動の生起になんらかの関与をすると推定する。

3. 研究の方法

多様な鳴き声ゆえ聴覚研究において頻繁に使用されてきたモルモットを用いた。非嫌悪性刺激を用いた自然音弁別の行動実験法に、動物の社会行動を導入し、動物に競争原理に基づいた積極的な行動を惹起させる実験パラダイムを構築した。それにより定説であったモルモットの条件付けの困難さを克服した。その後、音情報のどのような側面、即ちスペクトル構成、音全体のリズム、構成セグメントの配列や順序、が自然音弁別行動に影響しているかを、条件音を音響編集ソフトを用いて変調し試験音として聞かせて、行動学的に判定した。さらにこの刺激-行動関連が形成された後、電気生理学的に膜電位感受性色素を用い聴覚皮質活動性を訓練個体と非訓練対照個体を用いて比較した。訓練個体では周波数情報に特化した可塑性が生じていると想定し、時間逆転音に対する活動性の変化を調べ、そのような可塑性が生じていない対照群と比較検討した。

(1) 全ての音は実験室内で動物の飼育環境周囲から、高感度マイクロフォン（アコー社; 1/2 インチ 7146 型）を用いて採取した。音編集ソフトとして Amadeus Pro (Haire 社) を用い周波数、時間要素、音圧等の変調を行なった。音圧は平均 60 dB SPL となるように増減した。継続時間は、音の特性により統一できなかったが、ほぼ 6 秒から 10 秒間であった。動物の反応開始時間が平均 3 秒であることから、この差の行動への影響は最小限と考えられる。訓練は実験室内（即ち防音室外）で約数日間条件付け後、防音室内に移して継続した。其の際、条件音以外に 6-7 種の環境音を混ぜた刺激音セットを用いて訓練を行なった。訓練中はコンピューター上でファイル化された刺激源音、行動タイミング、reinforcement（給餌）のタイミング、ダイナミックスピーカー（Yamaha 社；NS-10MM）から供給された再生音の全てをデータレコーダ（SONY 社 DVCAM；DSR-45A）に、映像と併に同期して記録・保存した。また行動のタイミングは、給餌受け上部に設けた赤外線検知器により急激な頭部運動ごとに TTL 出力として記録した。

(2) 膜電位感受性色素による皮質活動

条件付け音に対し特徴行動が継続する 3 回のセッション（6 試行/セッション）で平均 95%以上の確率で生じた場合条件付け群とした。その後様々な試験音を用いた行動判定試行に供された（下記参照）。この変調音による試験終了後、動物は研究分担者へ輸送され、2-3 日静かな環境で飼育された後、防音室内でのイメージング実験に供された。ここでは訓練に使用した物とほぼ同一特性を有

するダイナミックスピーカーから条件音とその時間逆転音をそれぞれ4回聞かせ、得られた活動パターンを空間フィルターに通した後、平均化した。

動物はケタミン+セラクタル麻酔・人工呼吸下で開頭手術を行い、硬膜を剥離後色素(RH795)を滴下した。励起光580nmを照射し吸光度の変化分として活動度とした。2ms/frameで時空間データとして保存。画像化はoff-lineで行なった。

(3) 行動実験は代表者が行なった。膜電位感受性色素による皮質活動の計測は分担者である豊橋技術科学大学の堀川が指導を行い、代表者の小島、および大学院生が実施した。データ整理は分担者と大学院生および小島が行なった。論文は代表者と分担者が協同で執筆ないし今後執筆予定である。

4. 研究成果

(1) ”競争原理”を用いた学習行動の促進

日々行う給餌の際、飼育者の接近に伴い生じる足音 (footstep sound, F音) を条件刺激音とし、餌と連関させると容易に音識別学習がなされることが判明した。さらに他の7種類の自然音と組み合わせた試験音セットを聞かせても、F音(標的音)に対してのみ学習行動が惹起された。この学習行動は特徴的で、“急速で頻繁な首頭振り”行動と“大きく円を描いて歩行する回転運動”の片方あるいは両方からなった。これは条件音の無い時に見られる自発的な餌探索行動から容易に区別することが可能であるため、条件付けの判定規範(条件行動)とした。

一方この学習過程において、個体ごとの訓練では条件F音ではなく、それに続く餌供給に伴う雑音に動物はしばしば条件づけられた。これを回避する方策として2匹同時に訓練箱に置き餌獲得を行なわせると、条件音に対してのみ容易にかつ安定して条件行動をおこす事が可能になった。その理由として個体間で競争の原理が働いたと考えた。即ち餌を他より早く獲得しようとするため、給餌雑音に先行する刺激音に注意を優先的に移行するようになったと推定した。この新たな試みを学会発表・誌上発表した。

(2) 音響特性に基づいた音識別

F音から周波数要素と時間要素を独立に除去した変調音を作成し、音識別における音響要素の重要性を検討した。それら変調音に対する条件行動の有無を指標にして、音識別の際にどのような音響要素に依存しているかを解析した。総数18匹のモルモットを用いた。

使用したF音は10個のsegmentsからなり、150Hzから12kHzに分布するほぼ同一の周波数帯域をもち、エネルギーピークは低周波域に局在し0.6kHz、1.8kHz、3.0kHzに主要ピークを有するnon-harmonicなnoise様の自然音である。

まず周波数要素の関与を調べるため、F音全

体の周波数帯域をほぼ均等に3等分した周波数帯域を持つ試験音と、エネルギー分布を考慮し実効値が等しくなるよう3分割した周波数帯域を持つ試験音を動物に聞かせた。その結果、種特異的にある周波数帯域を優先的に聞き分けるのではなく、エネルギー的にパワーのある帯域が音識別に強く影響することが判明した(図1)。

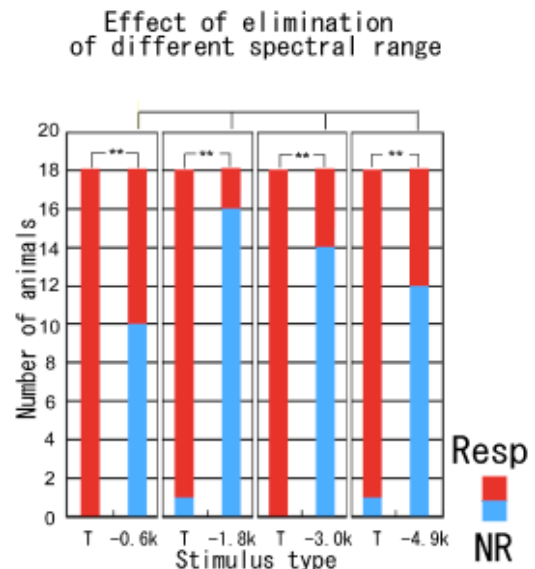


図1 条件音(T)とそれから周波数要素を除去した試験音(横軸; -0.6k, -1.3k, 1.3.0k, -4.9k)に対する条件行動の有無。赤色は条件行動有り、青色は無しを個体(縦軸)ごとに示す。

また時間要素に関してはF音を構成するセグメントの順序やセグメント間隔を変えた変調音には、標的F音と同様な反応行動をおこした。音圧を増幅した音、segment間隔を条件音と比較し半分短縮したせわしない音、2倍、3倍にした間延びした音は般的

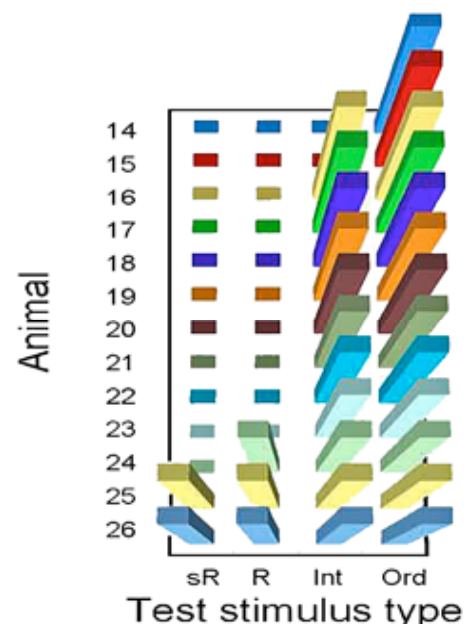


図2 条件音から時間要素を変調して作成した試験音(横軸:sR, 局所的に時間軸に沿ってsegmentを反転; R, 条件音全体を反転; Int, 全segmentsの間隔を2倍; Ord, segmentの順序を変化)に対する条件行動の有無。棒は+, 四角は-を個体(縦軸)ごとに表示。

な応答を示し、条件F音と区別しない事が判明した。しかし条件F音全体を時間軸に対して反転した音(R)、また各segmentを局所的に時間軸反転した音(sR)は、ほぼ全ての個体において識別された(図2)。

以上から周波数要素と微細な時間要素に依存して、モルモットはnon-harmonicなノイズ様の自然音を識別していると考えた。

(3) 条件音とその時間逆転音に対する皮質活動のイメージング

訓練済み動物12例、対照ナীব動物12例をイメージング実験に供した。刺激音はF音の最後の4個のsegmentsを使用した。

①モルモット聴覚皮質のコア領域から活動を記録した。コアを形成するAIおよびDC領域は、純音刺激に対し蝸牛末梢位置に対応する活動の分布(周波数局在)を示す事から、この局在がイメージングできない個体は、その後の試験刺激を用いた実験には使用しなかった。

対照ナীব動物と条件付け動物のAI, DC領域において条件F音に対する活動は、Fの4個のセグメントに対応して4つの活動が現れる。それぞれの活動は、ほぼ同形であり、最初の鋭い興奮性活動とそれに続くマイナスの活動(抑制)、およびその後のゆっくりした弱い興奮活動からなる。対照動物と条件付け動物の比較では、各領域内における活動ピーク値の大きさには有意な差を認めなかった(図3)。また活動領域面積にも顕著な差は見いだせなかった。

条件刺激音(F)による聴覚皮質の活性化

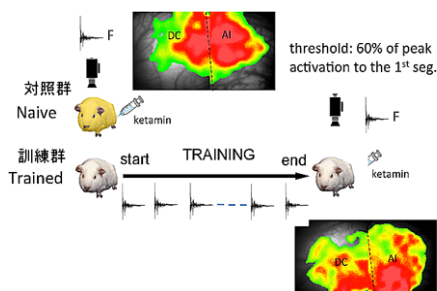


図3 条件付け音(footstep)に対する聴覚皮質の活動。訓練動物(Trained)とナীব対照動物(Naive)で比較した。1st segmentに対する応答。AI, 一次聴覚野; DC, 背側皮質。

しかし行動学的には、訓練群は例外無くF音に対して条件行動を起こすのに、対照動物は全く起こさないことから、回路の可塑的変化は空間すなわち周波数情報より時間情報

を主に選別するような変化であろうと推定した。そのため周波数成分は同一であるが、微小時間で見ると時間経過が全く異なる時間軸逆転音を用いて、この潜在的な可塑的变化を見いだそうと探索した。

② segment単位で局所的に時間軸に対して反転した(sRF)音に対するAI, DCの活動は、訓練群、対照群とも鋭いピークが無く緩やかな興奮活動が現われ、それにつづく減衰部分に見られる抑制活動も明瞭ではなかった。しかしsRFに対するAI, DCの活動は、一貫して全てのsegmentで対照動物よりも訓練動物で活動が低下していた(図4)。

時間逆転音による活性化の比較

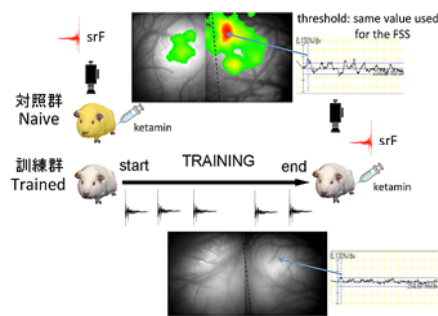


図4 条件付け音のsegmentを局所的に時間反転した試験音に対する聴覚皮質の活動。訓練(Trained)とナীব対照動物(Naive)で比較。1st segmentに対する応答。

③AIとDCにおけるF音とsRF音に対する活動の大きさの比(sRFに対する活動/Fに対する活動)の平均(n=9)を、対照群と条件付け群で比較すると、AIでは、この活動の減少度合いが条件付け群の方で有意に大きかった。DCにおいても同様の傾向が認められた(図5)。

活動ピーク値の比較

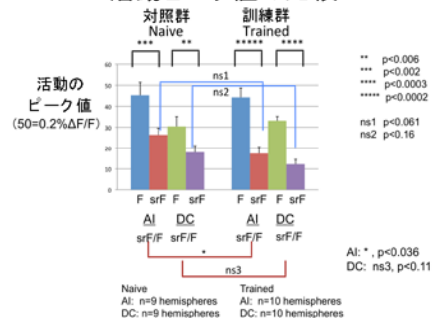


図5 活動ピーク値の訓練群と対照ナীব群間での比較。sRFに対する活動/Fに対する活動比に有意差(p<0.05)が認められる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

① Ojima H, Taira M, Kubota M, Horikawa J: Recognition of nonharmonic natural sounds by small mammals using competitive training. PLoS One, 査読有, vol. 7, no. 12,

2012, pp. e513182012, doi:10.1371/journal.pone.0051318.

②Schreiner CE, Kanold PO, Ojima H, Shamma SA, and Lomber SG, Auditory cortical function- Insights from current approaches, *Acoustics Today*, 査読有, vol. 8, 2012, pp. 42-50, <http://dx.doi.org/10.1121/1.4729579>.

③Ojima H, Interplay of excitation and inhibition elicited by tonal stimulation in pyramidal neurons of primary auditory cortex, 査読有, vol. 35, no. 10, 2011, pp. 2084-2093, doi:10.1016/j.neubiorev.2010.11.009.

[学会発表] (計 7 件)

① Numata R, Ojima H, Ishida T, Taira M, and Horikawa J, Plastic changes of auditory core fields after behavioral conditioning to natural sound. 36th Annual Midwinter Meeting of ARO, Feb 17, 2013, Baltimore USA,

② Ojima H, Tachi E, and Taira M, Sound recognition by guinea pigs: spectral and temporal cues and interval changes, 18th Auditory Research Forum, Dec 15, 2013, Shiga, Japan.

③ Ojima H, Tabei, K-I, Taira M, Lower spectral component and fine temporal structure are important for sound discrimination behavior of guinea pigs, 35th Annual Midwinter Meeting of ARO, Feb 26, 2012, San Diego, USA.

④ Ojima H, Kumei Y, Katsuyama N, Taira M, Different weighting of acoustic attributes in discrimination of natural sounds by guinea Pigs, 34th Annual Midwinter Meeting of ARO, Feb 21, 2011, Baltimore, USA.

⑤ Ojima, Komazaki, Kumei, Behavioral evaluation of sound discrimination, Auditory Research Forum, Dec 4, 2011, Shiga, Japan.

[図書] (計 2 件)

①小島久幸、窪田道典、杉本俊二、泰羅雅登、堀川順生、日本音響学会、モルモットによるノイズ様自然音の識別における音響要因、日本音響学会資料、2012、vol. 42、no. 8 pp. 663-667.

②小島久幸、中外医学社、一次聴覚野の多感覚性入出力、臨床神経科学、2011、vol. 29, pp. 1405-1408.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 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 0 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 (研究成果データベース)
http://aqua.tmd.ac.jp/ResDB/DispRsch/dsp_resdata.php?id=1082&la=ja

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小島 久幸 (OJIMA, Hisayuki)

東京医科歯科大学医歯学総合研究科・認知
神経生物学分野・講師
研究者番号：00104539

(2) 研究分担者

堀川 順生 (HORIKAWA, Junsei)

豊橋技術科学大学大学院工学研究科情
報・知能工学・教授
研究者番号：50114781

(3) 連携研究者

()

研究者番号：