

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 5 月 16 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22791578

研究課題名（和文） マウス経頭蓋イメージングを用いた大脳聴覚野機能の解明

研究課題名（英文） transcranial functional imaging of the mouse auditory cortex

研究代表者

高橋 邦行（TAKAHASHI KUNIYUKI）

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：40452057

研究成果の概要（和文）：マウスを対象とし、経頭蓋的にフラビン蛋白蛍光イメージングを用いて大脳聴覚野の研究を行った。その結果、1. 報酬を用いた2音弁別行動実験により、右大脳聴覚野には報酬と関連付けなかった音に対する反応が低下するという可塑性がみられるが、左大脳聴覚野にはみられないこと、2. 大脳聴覚野内に周波数変調音の方向選択性を司る新たな領域があること、3. 持続反応を馴化させることで、いままで確認できなかった ON、OFF 反応が観察できることという成果を得た。

研究成果の概要（英文）：We have researched the mouse auditory cortex using transcranial flavoprotein autofluorescence imaging. We achieved three results as following. The first is the plasticity of right auditory cortex after sound discrimination learning. The responses to rewarded sound was similar to those of naïve mouse, however the responses to unrewarded sounds were significantly depressed. The second is the detection of FM sounds selective areas in the mouse auditory cortex. The third is the visualization of ON and OFF responses after habituation of sustained responses.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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、周波数変調音

1. 研究開始当初の背景

脳活動の測定法として、これまで脳表に針電極を刺す電気生理学的手法を用いるのが一般的であった。しかし、針電極をいくつも刺し、そこから得られた点のデータは空間的な神経活動の広がりを見るのには適さない。

そこで2次元的な情報を直接とらえる方法としてさまざまな光学的イメージング法が開発されてきた。われわれはミトコンドリアの電子伝達系内に存在するフラビン蛋白の性質に注目し、これまで研究を行ってきた。フラビン蛋白は還元型と酸化型が存在し、青

色励起光を照射すると酸化型のみ緑色蛍光を発するという性質を持つ。神経活動により細胞内の酸素代謝が亢進すると、フラビン蛋白が還元型から酸化型へと変化し、緑色自家蛍光の上昇が起こる。これを記録することにより神経活動をイメージとして同定するのがフラビン蛋白蛍光イメージングである。マウスは頭蓋骨が非常に薄く、本法で用いる励起光、蛍光を十分に通過させることができる。そのため、頭蓋骨越しに侵襲なく、大脳聴覚野機能を研究することが可能である。

大脳聴覚野の神経細胞は個々に反応しやすい特定の音の高さがあり、その周波数を特徴周波数と呼ぶ。大脳聴覚野内の特徴周波数は規則的に配列をなしており、特徴周波数マップと呼ばれる。このマップは、ある一定の音環境下で育成すると、その周波数に対する反応が特異的に増強されるという現象や、報酬を伴った音弁別トレーニングをすると、報酬が得られない音に対する反応が抑制されるという結果を得た。すなわち大脳聴覚野の周波数マップはたえず変化しているということ、その変化は条件により増強される方向にも抑制される方向にも変化しえるということ、そして単純な情報ではなく複雑な音情報を処理していることを示した。このような大脳におけるダイナミックな可塑性は、ヒトが言語理解するための学習、記憶と関連すると考えており非常に重要な意味を持つと思われる。

2. 研究の目的

これまでの研究の成果から大脳聴覚野は複雑な音に対する処理を行っていることがわかった。また自然界には周波数が一定の純音のような音よりも、周波数が変調する周波数変調音 (FM音) が多くあふれている。例として狼の遠吠えなど、動物の鳴き声はFM音であることが多く、お互いのコミュニケーションツールとしても重要な位置を占める。そこで主にFM音を用い、その処理メカニズムを研究することにより、大脳聴覚野における複雑な音の処理機能の解明を目的とした。本研究により、複雑な音処理がどのように大脳聴覚野で処理されているかだけでなく、動物におけるコミュニケーション、ヒトにおける言語認識機能の解明、難聴患者の新たな視点からの治療法へと発展していくことを最終的な目標としている。

3. 研究の方法

(1) イメージング法

ウレタン腹腔内投与によって麻酔した C57BL/6N 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。経頭蓋的に青色励起光 (450-490 nm) を脳表に照射し、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。反応は通常 1 秒あたり 9 フレームの頻度で撮影するが、時間的変化を詳細に検討する場合は撮影頻度を増加させる。撮影頻度を増やした場合、1 回あたりの反応が小さくなることが予想されるが、試行回数を増やすなどし、平均加算をすることで、画質の向上を図る。通常、右大脳聴覚野より記録をとるが、左右差の比較を行う場合、同一個体から左大脳聴覚野の反応も適宜測定する。

(2) 音刺激

これまでは刺激直前の無音状態のフレームを基準とし、音提示後の蛍光変化を見てきたが、本刺激の前に別の刺激を行うことにより、音の特定成分のみの反応が捉えられると考えられる差分イメージング法も適宜用いる。差分イメージング法を用いることで、音のある特定の特徴のみを強調することができ、その反応をみる。さらに、本刺激を行う前に、ある程度の長さの音を曝露しておくことで、大脳聴覚野を馴化させ、本刺激に対する反応性の変化を観察した。

(3) 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、音と連動して給水口をなめると、報酬となるサッカリン含有水が出るように作成したトレーニング室へ移動させる。そこで、ある音 A 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 B では給水口をなめても水が出ないという 2 音弁別学習を行わせる。マウスはこれを繰り返すと、2 音の違いを学習、弁別できるようになる。音 A と音 B を有意に弁別できるようにトレーニングされたマウスを、前述のようにフラビン蛋白蛍光イメージングを用い、それぞれの音に対する大脳聴覚野の反応をみる。

4. 研究成果

(1) 2 音弁別学習と学習後の大脳聴覚野の可塑性

報酬を伴った 2 音弁別トレーニングを行い、約 3 日間のトレーニングでマウスは 2 音を弁別できるようになった。2 音弁別学習が成立したマウスの大脳聴覚野をフラビン蛋白蛍光イメージングにより観察すると、報酬と関連付けた音に対する反応は変化がなかったのに対し、報酬と関連付けられていない音に対する反応が抑制されるという結果を得た。しかも、大脳聴覚野におけるこのような変化は純音のような簡単な音では起きず

(図1)、FM音のような複雑な音で生じた(図2)。すなわち、純音のような単純な音は、大脳聴覚野よりも下位の神経核で処理されること、FM音のような複雑な音は大脳聴覚野レベルで処理されることが示唆された。

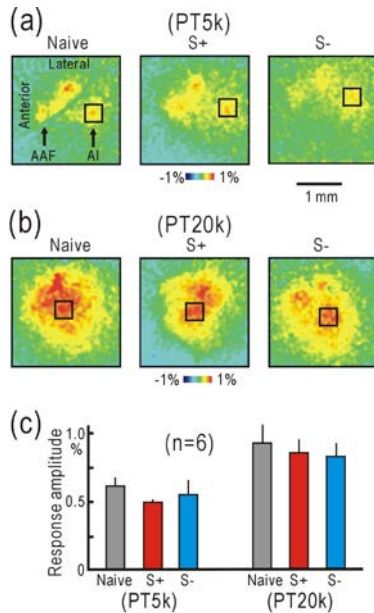


図1：純音同士の2音弁別トレーニング後の大脳聴覚野の変化
Naive: トレーニングしていないマウス、S+: 報酬音としてトレーニングした場合、S-: 非報酬音としてトレーニングした場合、PT: 純音
(a) 純音 5kHz、(b) 純音 20 kHz の反応。Naive と比較し、2音弁別トレーニングを行っても、大脳聴覚野で大きな変化は起きていない。

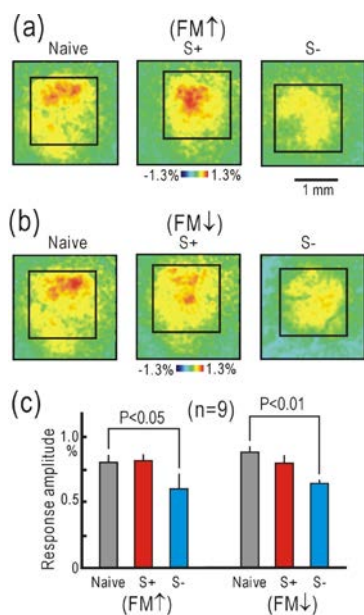


図2：FM音同士の2音弁別トレーニング後の大脳聴覚野の変化

FM↑: 周波数が連続的に上昇する周波数変調音、FM↓: 周波数が連続的に下降する周波数変調音

(a) 上昇 FM 音、(b) 下降 FM 音の反応。報酬音としてトレーニングした音(S+)に対する反応は Naive と比較し変化がみられないが、非報酬音としてトレーニングした音(S-)に対する反応は有意に小さくなっている。

ここでみられたような2音弁別後のFMに対する反応低下は、右大脳聴覚野で観察することができたが、同様の実験で左大脳聴覚野ではみられなかった。このことは大脳内で左右の機能分化があり、2音弁別学習で生じる脳の可塑性は右脳に特化された機能であることが示唆された。今後も右脳、左脳の機能分化に注目し、研究を続けていく。

(2) FM 音方向選択性を司る大脳聴覚野内の新たな領域

大脳聴覚野内には組織学的、機能的に分化されたいくつかの亜領域が存在する。そのうち一次聴覚野(AI)と前聴覚野(AAF)には反応しやすい音の周波数ごとに並ぶ周波数マップが存在する。しかし、その他の周辺領域の機能はまだまだわかっていない。そこで周波数が持続的に上昇または下降するFM音を用いて、大脳聴覚野内の反応を調べた。結果は、無音状態から急にFM音を発した場合、聴覚野内全体が反応し、周波数マップに沿った反応はみられなかった。また、これまで実験に用いてきた周波数が固定された音である純音、振幅変調音(AM音)では、AI、AAFに反応がみられたのに対し、FM音の場合は、AI、AAF以外の周辺領域を含む全体が反応することが分かった。そこで、FMの方向を上昇方向から下降方向へ急に変化させ、その前後での変化を差分イメージング法を用いて試みた。その結果、AIでもAAFでもない新たな2領域を中心に反応が起きていることがわかった(図3)。この領域は以前まで、超音波領域(UF領域)、後背側領域(DP領域)と呼ばれていた部位であるが、これまでその機能は謎のままであった。本研究により、はじめてこの2領域がFM音方向選択性に関与しているということが示唆された。今後もこの2領域がどのような連結をし、機能を持つのかについて研究を続けていきたいと考えている。

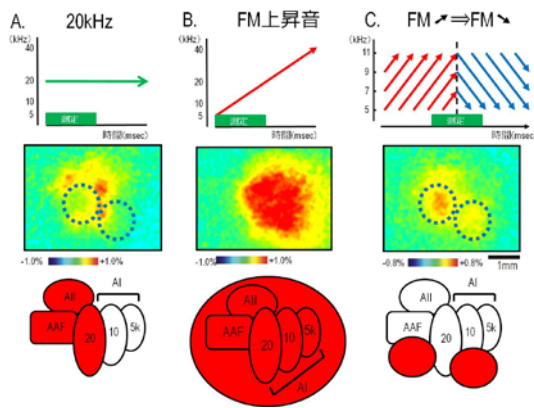


図3：FM音方向選択性領域の実験

A：20kHz 純音に対する反応。B：FM 上昇音に対する反応。C：上昇FM音から下降FM音に急激に変化させたときの反応。

(3) ON、OFF 反応と持続反応の分離の試み

大脳聴覚野の音に対する反応は音の開始時 (ON 反応)、音の終了時 (OFF 反応) と、音が持続してなっているときの反応 (持続反応) があることが言われている。このうち持続反応は容易に馴化することもいわれている。われわれがこれまで行ってきたイメージング法では、この3つの反応が混合したものを観察していると思われるため、測定する本刺激の前に、ある程度の長さの予備刺激を行うことで持続反応を馴化させ、ON、OFF 反応を明確に観察することを試みている。現在、予備刺激として10秒程度の音刺激を行うと、本刺激の際にこれまでと違うON、OFF 反応と思われる反応が観察できることがわかり、研究を続けている。

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)

① 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.* 67: 51-58. 2010. (査読有)

[学会発表] (計7件)

① 馬場洋徳, 塚野浩明, 本間悠介, 大島伸介, 窪田和, 高橋邦行, 菱田竜一, 高橋姿, 澁木克栄: ON and OFF responses in the mouse auditory cortex after exposure to long-lasting tone bursts. (第89回日本生理学会大会: 2012年3月30日、長野県松本文化会館、松本市)

② 本間悠介, 高橋邦行, 塚野浩明, 堀江正男, 馬場洋徳, 大島伸介, 窪田和, 澁木克栄, 高橋姿: マウス大脳聴覚野におけるFM音情報処理領域. (第10回側頭骨疾患研究会: 2012年1月7日、ホテルメトロポリタン仙台、仙台市)

③ 馬場洋徳, 塚野浩明, 本間悠介, 大島伸介, 窪田和, 高橋邦行, 菱田竜一, 高橋姿, 澁木克栄: ON and OFF responses in the mouse auditory cortex disclosed after sound exposure. (第16回聴覚研究フォーラム: 2011年12月3日、同志社びわこリトリートセンター、大津市)

④ 本間悠介, 高橋邦行, 大島伸介, 窪田和, 澁木克栄, 高橋姿: マウス大脳聴覚野のFM音方向選択性領域 (第9回側頭骨疾患研究会: 2011年1月8日、新潟グランドホテル、新潟市)

⑤ 本間悠介, 高橋邦行, 大島伸介, 窪田和, 澁木克栄, 高橋姿: マウス大脳聴覚野のFM音方向選択性領域. (第55回日本聴覚医学会総会・学術講演会: 2010年11月11日、奈良県新公会堂、奈良市)

⑥ 大島伸介, 高橋邦行, 本間悠介, 窪田和, 澁木克栄, 山本裕, 高橋姿: 周波数変調音に対するマウス聴覚野反応のフラビン蛋白蛍光イメージング. (第20回日本耳科学会総会・学術講演会: 2010年10月9日、ひめぎんホール、松山市)

⑦ 本間悠介, 塚野浩明, 大島伸介, 任海学, 窪田和, 高橋邦行, 菱田竜一, 高橋姿, 澁木克栄: FM音選択的マウス聴皮質の差分イメージング. (第33回日本神経科学大会: 2010年9月3日、神戸コンベンションセンター、神戸市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 邦行 (TAKAHASHI KUNIYUKI)
新潟大学・医歯学系・助教
研究者番号: 40452057

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし