

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25861535

研究課題名(和文)難聴モデルマウスを用いた聴覚野周波数マップ可塑性の研究

研究課題名(英文)Study of auditory cortex function and frequency map in mice using flavoprotein fluorescence imaging

研究代表者

窪田 和(KUBOTA, Yamato)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：40547593

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：マウスの大脳聴覚野機能を研究した。M字迷路による行動実験では、野生型マウスはペアリング学習した図形を音のキュー提示のみで選択可能であった。マウスが音・図形連想記憶を獲得可能であることを行動実験によって証明した。さらにフラビン蛋白蛍光イメージング法を用いて音・図形連想記憶を獲得したマウスに学習に用いた音のみを聞かせると聴覚野背側領域が活動することを見出した。

健聴者を対象に、ヘッドフォン及びスピーカーからの雑音で疑似耳鳴をマスキングする効果の違いについて検討した。その結果、耳から遠方に音源定位するスピーカーからの雑音の方が、有意に小さい音圧で疑似耳鳴を抑制することが確認出来た。

研究成果の概要(英文)：1)We studied mouse cerebral auditory cortex function by flavin protein fluorescence imaging method. In behavior experiments with the M shaped maze, the wild type mice were able to select pairing learned figures only by presenting sound cues. Behavioral experiment proved that the mouse can acquire sound / figure associative memory. In addition, we found out in the mouse which acquired the association memory of sound / figure, that the auditory cortex dorsal area was active when only stimulated by the sound used for associative memory learning using the flavoprotein fluorescence imaging method.

2)We examined the difference in effect of masking pseudo tinnitus by white noise from headphones and speakers for normal hearing human. As a result, it was confirmed that the noise from the speaker that localizes the sound source far from the ear suppresses the pseudo tinnitus with a significantly small sound pressure.

研究分野：医歯薬学

キーワード：聴覚医学 聴覚中枢 耳鳴

### 1. 研究開始当初の背景

内耳障害の結果生じる中枢性耳鳴をはじめ、難聴による語音弁別能の低下など様々な事象に、大脳聴覚野における刺激応答性の変化が関与していると推測されているが、大脳聴覚野の詳細な機能は未だに解明されていない部分が多く存在する。聴覚野の詳細な機能を評価するため、マウス聴覚野を用いた光学的イメージングを行っている。

脳活動の計測法として使用したフラビン蛋白蛍光法は自家蛍光を用いた低侵襲な計測方法である。神経細胞内のミトコンドリアに存在する電子伝達系にはフラビン蛋白が介在し、神経活動の亢進により電子伝達系が活性化する際に還元型から酸化型へと変化する。この際に青色の励起光を照射することで緑色の自家蛍光を発する。また、マウスの頭蓋骨は非常に薄く透明度が高いため、開頭せず蛍光を捉えて神経活動のイメージングを行うことが可能であり、低侵襲な実験デザインが可能である。

大脳聴覚野には音の周波数に対応するように応答する細胞が連続して配列されるマップ構造が存在する。また、聴覚野内には機能が異なる複数の領域が存在しており、互いに情報伝達を行いながら総合的な情報処理を行っている。我々はこれまでの研究から、一定の環境音下で飼育したマウスでは曝露された音の周波数における聴覚野の反応が増強すること、前聴覚野は音の立ち上がり鋭敏に反応すること、前聴覚野を抑制すると一次聴覚野の反応が低下することから、皮質間での情報伝達に方向優位性があること、二音を報酬の有無で件付けを行ったマウスでは報酬のある音に対しては聴覚野反応は変化せず、報酬が無い音に対する反応が低下するなどの結果を得ている。

### 2. 研究の目的

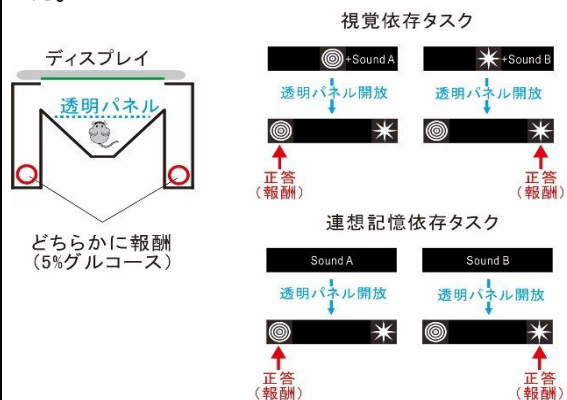
内耳性難聴に伴う聴覚入力減少による中枢性耳鳴、難聴患者における語音弁別能低下、聴覚過敏などの現象は、内耳はもとより中枢での情報処理の変化により生じていると推定される。聴覚処理の中枢である聴覚野において、難聴によりどのような変化が生じているのかを知るために、聴覚野のイメージング解析を行う。大脳聴覚野でのマップの可塑的变化との関連を中心に解析し、また基礎的な聴覚野機能や可塑的变化の生じるメカニズムについても研究する。

また、実臨床では耳鳴を主訴とする患者は多く、治療として補聴器や耳鳴治療器 (TCI) を用いた TRT 療法が広く行われているが、治療効果が乏しい症例や機器の装着そのものがうまくいかず治療に難渋する症例も多い。TCI からの雑音よりも環境雑音下の方が耳鳴が緩和されるという経験をしており、また文献的に耳鳴の音源定位はほとんどが耳か頭内と言われているため、耳鳴の抑制には耳に近接した音源よりも、距離の離れた音の

方がより効果があるのではないかとという着想に至った。これに対する基礎的な検証として、疑似耳鳴音と、音源定位の異なる雑音を用いて、音源距離の違いとマスキング効果の関連を検討する。

### 3. 研究の方法

(1) ヒトは学習によって特定の音から特定の図形 (音源の対象) を連想することが可能である。例えば電話で知人の声を聴くと、相手の顔が思い浮かべることができる。これを音・図形連想記憶とよぶ。我々はタブレット端末に任意の図形を表示させ、形状認知機能をテストできる M 字型迷路を開発した。この迷路にスピーカーを組み合わせて視覚依存タスクと連想記憶依存タスクという 2 つの課題をマウスに行わせた。さらにフラビン蛋白蛍光イメージング法を用いて音・図形連想記憶を獲得したマウスに連想記憶学習に用いた音のみを聞かせ、大脳皮質の反応を計測した。

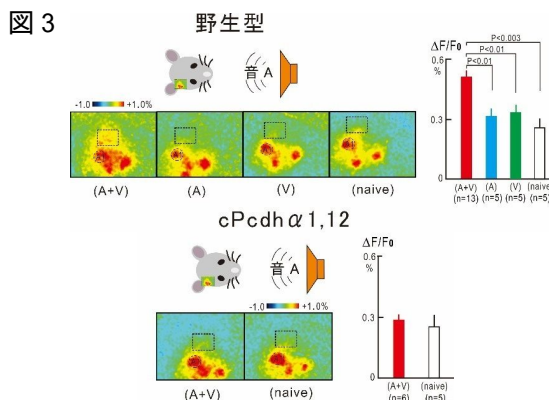
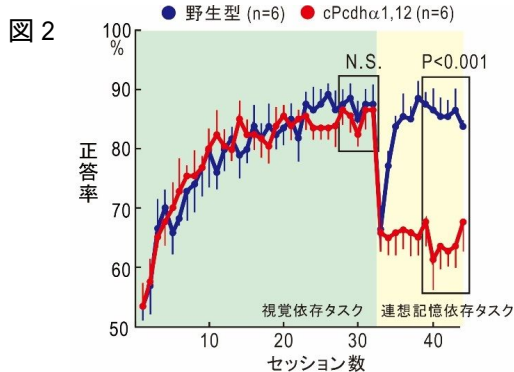


(2) ヒトを対象にした耳鳴のマスキング効果に関する検討も行った。耳疾患がなく、自覚的耳鳴のない 12 名のボランティアを対象とした。男性 9 名、女性 3 名で、年齢は 26 歳から 43 歳 (平均 36.3 歳) 各々事前に純音聴力検査で聴力閾値を確認した。被験者に対し、疑似耳鳴音を右耳の開放型イヤホン (耳定位) で提示した状態で、近接マスキング音 (開放型ヘッドホン)、遠方定位マスキング音 (スピーカー) を提示し、それぞれのマスキングに必要な音圧を測定した。疑似耳鳴音は 4kHz の純音とし、提示音圧は各々の右耳 4kHz の純音聴力閾値を基準に +15dB、+20dB、+25dB の 3 種類とした。マスキング音はホワイトノイズを用い、右側ヘッドホンと被験者の右耳から 1.8m の距離に設置したスピーカーから提示した (図 1)。マスキングレベルは疑似耳鳴音を提示した状態でヘッドホンまたはスピーカーのマスキング音の音圧を徐々に上げてゆき、十分にマスキングされた後に徐々に音圧を下げ、疑似耳鳴音を認知した時点での音圧とした。マスキング音圧の測定には、被験者と同条件に設置したダミーヘッド内蔵マイクを用いた。



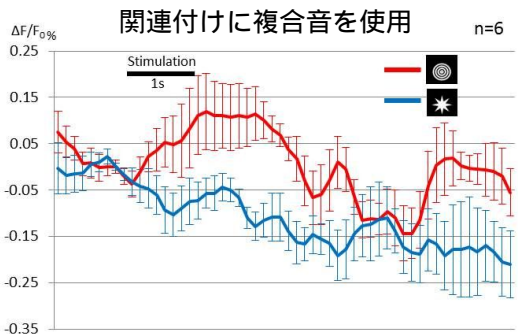
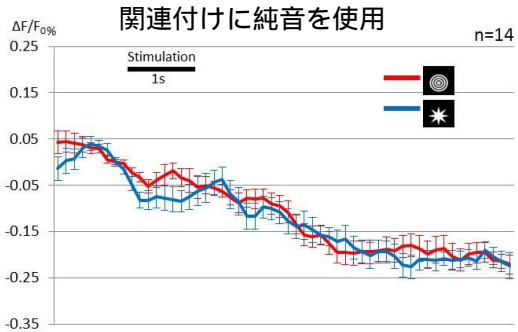
#### 4. 研究成果

(1) M字迷路による行動実験では、野生型マウスはペアリング学習した図形を音のキュー提示のみで選択可能であった。マウスが音・図形連想記憶を獲得可能であることを行動実験によって証明した。さらにフラビン蛋白蛍光イメージング法を用いて音・図形連想記憶を獲得したマウスに連想記憶学習に用いた音のみを聞かせると聴覚野背側領域（視覚野との境界部）が活動することを見出した。また異なるモダリティ間の感覚統合機能や短期記憶に障害のある遺伝子改変マウス（プロトカドヘリン 1, 12 マウス）に同様に行動実験とイメージング実験をおこなったところ、野生型マウスと比較して音図形連想記憶に障害があり（図2）、聴覚野背側領域の活動も認められなかった（図3）。以上の結果から、聴覚野背側領域は視覚情報と聴覚情報の連合野もしくは形状認知を担う高次視覚野の一部と考えた。



さらに、上記の連想記憶を構築するための条件を探るために、呈示音源を 5kHz の純音と、人工的に合成した複合音（3k、4k、5k、6k、7kHz+下降 FM 音）の 2 パターンで追加実験を行った。その結果、単純な純音学習した

マウスでは視覚刺激による聴覚野の応答野は認められず、複合音で学習したマウスでは視覚刺激により聴覚野に反応が認められるという結果が得られた。



(2) 被験者の 3 分法平均聴力は、平均で右 11.4dB、左 9.7dB であった。右耳 4kHz の聴力閾値は -5dB から 20dB で、平均 7.5dB であった。疑似耳鳴音の各音圧におけるマスキング音圧はそれぞれ以下の通りであった。  
 閾値+15dB (n=6) ヘッドホン：平均 48.0dB、スピーカー：平均 46.4dB (p<0.05)  
 閾値+20dB (n=12) ヘッドホン：平均 47.1dB、スピーカー：平均 43.9dB (p<0.01)  
 閾値+25dB (n=12) ヘッドホン：平均 51.2dB、スピーカー：平均 50.3dB (N.S.)  
 (表 1)

表1 疑似耳鳴音のマスキングに要した音圧

疑似耳鳴音: 閾値+15dB	疑似耳鳴音: 閾値+20dB	疑似耳鳴音: 閾値+25dB
ヘッドホン: 45-55 dB(A)	ヘッドホン: 40-50 dB(A)	ヘッドホン: 45-55 dB(A)
スピーカー: 45-55 dB(A)	スピーカー: 35-45 dB(A)	スピーカー: 40-50 dB(A)

疑似耳鳴音が比較的小さい場合、耳に近接したマスキング音（ヘッドホン）よりも、遠方に定位したマスキング音（スピーカー）の方が有意に小さい音でマスキング可能であり、耳鳴のマスキングには、音源の定位が離れた音の方が効果が高いことが確認できた。定位が異なることで、より耳鳴から意識が遠ざかることがその理由ではないかと推察する。スピーカーによるマスキングでは両耳にマスキングノイズが入るため、それが影響している可能性もあるが、統計に含まれない先天性一側聾の 1 例でも同等の結果が得られた

ため、両耳マスキングだけの影響ではないと考える。今回の検討はあくまで健聴者を対象とした疑似耳鳴によるシミュレーションではあるが、環境音を用いた耳鳴治療を説明、推奨する科学的裏付けになると考える。

#### 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)

Tsukano H, Horie M, Ohga S, Takahashi K, Kubota Y, Hishida R, Takebayashi H, Shibuki K. :

Reconsidering Tonotopic Maps in the Auditory Cortex and Lemniscal Auditory Thalamus in Mice.

(Frontiers in neural circuits.2017 11:13

DOI: 10.3389/fncir.2017.00014)

[学会発表](計7件)

窪田和、泉修司、大島伸介、森田由香、高橋邦行、堀井新：耳近接音と遠方定位音による耳鳴マスキング効果の相違に関する検討。(第26回日本耳科学会総会・学術講演会：2016年10月05日～8日：長野県長野市、ホテル国際21)

Tatsuya Yamagishi, Hiroaki Tsukano, Hironori Baba, Yuusuke Honma, Shinsuke Ohshima, Yamato Kubota, Kuniyuki Takahashi, Ryuichi Hishida, Takeshi Yagi, Katsuei Shibuki, Sugata Takahashi : The cortical area dorsally to auditory cortex involved in sound-shape association memory in mice. (The 30th Politzer Society Meeting / 1st World Congress of Otology : 2015年06月30日～07月03日：TOKI MESSE, Niigata)

Hironori Baba, Hiroaki Tsukano, Tatsuya Yamagishi, Yuusuke Honma, Shinsuke Ohshima, Yamato Kubota, Kuniyuki Takahashi, Ryuichi Hishida, Katsuei Shibuki, Sugata Takahashi : OFF responses produced by short-term depression of thalamic inputs to inhibitory neurons in the mouse auditory cortex( The 30th Politzer Society Meeting / 1st World Congress of Otology : 2015年06月30日～07月03日：TOKI MESSE, Niigata)

山岸達也、塚野浩明、馬場洋徳、本間悠介、大島伸介、窪田和、高橋邦行、高橋姿、澁木克栄：マウス聴覚・視覚連想記憶の行動学的解析(第59回日本聴覚医学会総会・学術講演会：2014年11月27日～28日：山口県下関市)

山岸達也、塚野浩明、馬場洋徳、本間悠介、大島伸介、窪田和、高橋邦行、高橋姿、澁木克栄：マウス聴覚・視覚連想記憶のM字迷路による解析。(第91回日本生理学会大会：2014年03月16日～18日：鹿児島県鹿児島市、鹿児島大学)

S.Ohshima, K.Takahashi, T.Yamagishi, H.Baba, Y.Honma, H.Tsukano, Y.Kubota, R.Hishida, K.Shibuki, S.Takahashi : Cortical depression in the mouse auditory cortex after sound discrimination learning.

(The 29<sup>th</sup> Politzer Society Meeting : 2013年11月13日：Susesi Resort - Antalya, Turkey)

K.Takahashi, H.Baba, Y.Honma, S.Ohshima, Y.Kubota, S.Takahashi : Bilateral functional differences in the mouse auditory cortex using flaboprotein autofluorescence imaging( 2nd Meeting of European Academy of ORL-HNS : 2013年4月27日：Nice, France)

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

窪田 和 (KUBOTA, Yamato)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：40547593

##### (2)研究分担者

なし

##### (3)連携研究者

なし

##### (4)研究協力者

なし