

研究概要報告書【サウンド技術振興部門】

(/)

研究題目	下咽頭神経切除後の音声回復に関わる生理機構の解明	報告書作成者	古山 貴文
研究従事者	古山 貴文		
研究目的	<p>音声はヒトを含む多くの動物にとって、他者とコミュニケーションをとり、社会性を維持するために重要である。音声の発声には、肺からの呼気や咽頭筋による声帯の開閉、舌や唇の動きの連動が必要である。特に、声帯の開閉は、下咽頭神経により制御されており、この神経は甲状腺腫瘍摘出などの手術により損傷を受け、嗄声を引き起こす原因になる。さらに、下咽頭神経切除は、声帯の開閉に影響を及ぼすため、飲食物が気管につまる誤飲が生じる。また、下咽頭神経による嗄声からの回復は、音声によるコミュニケーションを取り戻し、普段の生活に早く復帰するために重要となる。過去のヒトの研究では、咽頭手術により嗄声になり、1年後には発声音声が手術前までの音声に戻ることがわかっている(Sulica 2008)。また動物を用いた実験では、下咽頭神経を切除による音声変化に着目した研究が多い(例えば、Jürgens et al. 1978)。さらに、マウスやラットの音声は、20kHz 以上の音声であり、低周波音声の回復過程においてはヒトと異なる可能性がある。そのため、下咽頭神経切除による嗄声から音声がどのように変化し、なぜ回復するのか、その生理機構については未だに不明な点が多い。</p> <p>そこで本研究では、スナネズミを研究対象とした。スナネズミは、げっ歯類の中で比較的ヒトと可聴領域が似ているなどの理由から聴覚系の研究のモデル動物として多く用いられている(Ryan, 1976; Otto and Jurgen, 2012)。さらに、ヒトの可聴領域の周波数から超音波周波数領域の音声(5kHz から 40kHz)を用いて他個体とコミュニケーションしている。本研究は、ヒトの下咽頭神経切除による嗄声からどのように回復するかを明らかにすることを目的とし、実験対象動物としてスナネズミを用いた。</p>		

研究内容	<p>実験1 下喉頭神経切除後の神経回復の検証</p> <p>末梢神経は、損傷した後に一定期間後に回復することがある。そのため、下喉頭神経切除後に神経回復が行われているかを確認するために実験を行った。6ヶ月齢のスナネズミを対象に実験を行った。スナネズミにイソフルラン麻酔をかけ、下喉頭神経を切除した。手術後1ヶ月後に神経切除した部分を確認した。</p> <p>その結果、下喉頭神経の回復が観測された。しかし、切除後の神経が回復した後、その機能自体が手術前まで戻っているかは未だに不明であり、今後の実験として進めていく。</p> <p>実験2 電気刺激による発声に関わる脳部位の同定</p> <p>下喉頭神経切除による嗄声は、発声訓練をすることで回復期間を短くすることができることがわかっている。そこで申請者は、発声制御の脳部位の一つである中脳水道灰白質を電気刺激し、発声を誘発できるかを検証した。3～6ヶ月例のスナネズミを被験体として使用した。麻酔したスナネズミの中脳水道灰白質(Lambda から AP:0.0、ML: 1.2、VL:3.9mm)を電気刺激し、電気刺激のタイミング、強度を変化させ、音声が発声されるかを検証した。</p> <p>その結果、中脳水道灰白質を刺激することで、発声を誘発することに成功した。誘発された音声のほとんどは、低周波音声であった。今回刺激した脳部位は、低周波音声を発声するために必要な脳部位であることがわかった。</p> <p>実験3 低周波音声の発声に関わる神経回路の同定</p> <p>中脳水道灰白質は脳幹に近いため、電気刺激する際には、発声だけではなく呼吸の抑制や顎の動きなども観測されるため、発声以外の行動がでる可能性がある。そこで実験3では、実験2で観測された音声に関わる神経回路を同定し、発声に特化した脳部位を探索するために、神経トレーサーとアデノ随伴ウイルス(AAV)を用いた実験を行った。スナネズミの中脳水道灰白質に、逆行性トレーサーおよび AAVrg-mCherry を用いて、中脳水道灰白質に神経投射している脳部位の同定を行った。</p> <p>その結果、前帯状皮質(ACC)から、中脳水道灰白質に投射していることが明らかになった。今後は、ACCを電気刺激し、発声を誘発できるかを明らかにしていく。</p>
------	--

<p>研究のポイント</p>	<ul style="list-style-type: none"> ・下喉頭神経を切除したスナネズミは、発声に影響が出るが、その後、発声音声の回復が観測される。 ・下喉頭神経切除後、一定期間後に神経が再生している可能性があり、それにより音声が発声している可能性がある。 ・音声の発声を誘発するために必要な神経回路を同定した。
<p>研究結果</p>	<ul style="list-style-type: none"> ・下喉頭神経を切除し、手術後1ヶ月後に神経切除した部分を確認した結果、下喉頭神経の回復が観測された。しかし、切除後の神経が回復した後、その機能自体が手術前まで戻っているかは未だに不明であり、今後の実験として進めていく。 ・発声制御の脳部位の一つである中脳水道灰白質を電気刺激し、発声を誘発できるかを検証した。麻酔したスナネズミの中脳水道灰白質を電気刺激し、電気刺激のタイミング、強度を変化させ、音声が発声されるかを検証した。その結果、中脳水道灰白質を刺激することで、発声を誘発することに成功した。誘発された音声のほとんどは、低周波音声であったため、今回刺激した脳部位は、低周波音声を発声するために必要な脳部位であることが明らかになった。 ・上記で観測された音声に関わる神経回路を同定し、発声に特化した脳部位を探索するために、神経トレーサーとアデノ随伴ウイルス(AAV)を用いた実験を行った。その結果、前帯状皮質(ACC)から、中脳水道灰白質に投射していることが明らかになった。今後は、ACCを電気刺激し、発声を誘発できるかを明らかにしていく。
<p>今後の課題</p>	<p>本研究の課題中に、スナネズミの飼育環境が変化した。その影響により、スナネズミの繁殖がうまくいかず、個体数が増えない状態が続いた。そのため本研究では、十分数の個体数で検証ができていないため、個体数を増やしていき、下喉頭神経の回復過程の研究を進めていく。</p> <p>また、発声音声に関わる神経回路については、他のげっ歯類と類似の結果を得ているため、その脳部位を断続的に刺激することで、神経回復や発声回復が早まるかを検証していきたいと考えている。</p>

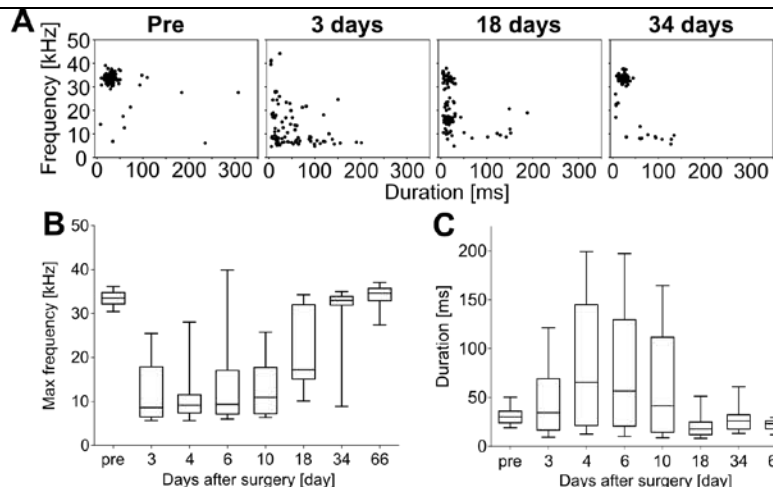


図1 下咽頭神経切除による発声音声の特徴変化。手術3日後では、高周波音声が減少するが、18日後には回復傾向が見られ、34日後には完全に回復している。A: 下咽頭神経切除前後による時間一周波数変化の分布。B: 手術前後における音声の最大周波数変化。C: 手術前後における音声時間長の変化。

電気刺激パラメータ、パルス幅: 500 μ s、刺激周波数: 100 Hz、刺激強度: 10 - 500 μ A、刺激時間: 1 s
刺激間時間間隔: 3 s

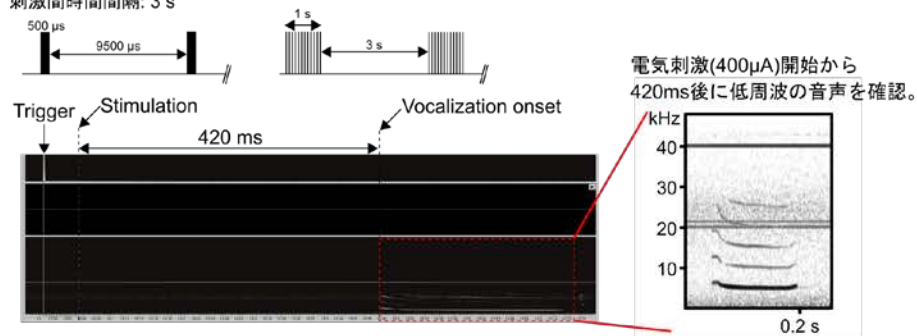
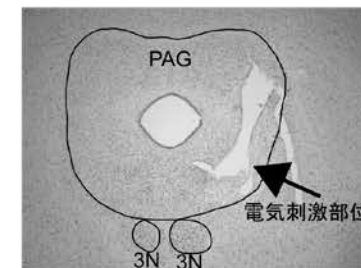
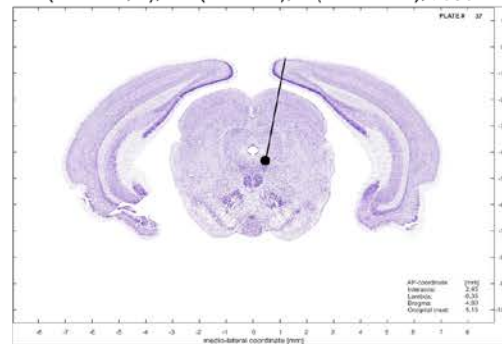


図3 電気刺激による発声音声。電気刺激後、420ms後に低周波音声を確認した。



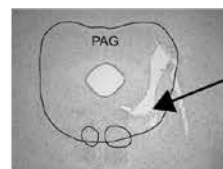
BregmaとLambdaを同じ高さにする

AP (Lambda, 0), ML (-1.1~1.3), Z (-3.6 ~ -3.9), 角度10°

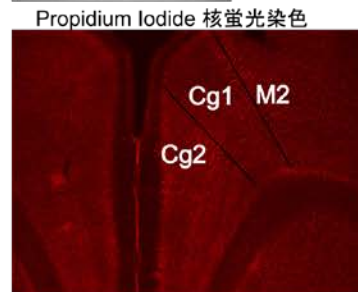


PAG: 中脳水道灰白質, 3N: 第三脳神経核

図2 電気刺激部位。発音を確認した部位に直流電流をかけ、電極部位を同定した。



PAGに逆行性トレーサーであるAAVrg-CAG-mCheryを400nl注入
3週間後に灌流固定



逆行性トレーサーにて標識された細胞

Cg1: Cingulate cortex area1
Cg2: Cingulate cortex area2
M2: Secondary motor cortex

ACCに逆行性トレーサーで標識された細胞を確認。
ACC-PAGの神経回路を同定。

図4 発音に必要な神経回路の染色。中脳水道灰白質にAAVrg-CAG-mCheryを注入し、免疫染色を行った。ACCに逆行性に標識された細胞を同定した。