

学位論文

ナノ製剤による有毛細胞保護効果の検討

-ゼブラフィッシュ側線器有毛細胞障害モデルを用いて-

竹本洋介

山口大学大学院医学系研究科

情報解析医学系専攻 耳鼻咽喉科学

(平成 29 年 10 月)

目次

1. 要旨	3
2. 緒言	4
3. 実験材料と方法	5
4. 結果	8
5. 考察	10
6. 結語	13
7. 参考文献	14
8. 図表	18
9. 図表の説明	25

1. 要旨

【目的】有毛細胞障害の原因は、フリーラジカルによる酸化ストレスである。特に、有毛細胞はアミノグリコシドに対して非常に感受性が高い。抗酸化剤は、フリーラジカルの生成を減少させることが知られている。様々な抗酸化剤が市販されており、同じ薬剤でも異なる剤形が開発されている。ゼブラフィッシュの側線器を用いて、ネオマイシンに対するアスタキサンチンの有毛細胞保護効果を検討した。

【方法】ゼブラフィッシュの稚魚をアスタキサンチンナノ製剤または原末製剤懸濁液に1時間暴露した。その後、ネオマイシンに暴露した。残存した有毛細胞数を蛍光顕微鏡でカウントした。

【結果】アスタキサンチン原末製剤の懸濁液に暴露した群では、ネオマイシンに対する有毛細胞保護効果は認めなかった。一方、ナノアスタキサンチン群では有毛細胞におけるネオマイシンに対して用量依存的に保護していた。

【結論】本研究では、ゼブラフィッシュ側線器有毛細胞を用いて、ナノアスタキサンチンのネオマイシンに対する感覚毛細胞の保護効果を明らかにした。

2. 緒言

難聴の原因として内耳感覚上皮の有毛細胞の変性が広く知られている。有毛細胞は、薬剤暴露および騒音誘発性外傷、老化によって障害される。近年、有毛細胞障害の原因がフリーラジカルによる酸化ストレスであると報告されている。特に、有毛細胞はアミノグリコシドに対して非常に感受性が高い[1]。抗酸化剤は、フリーラジカルの産生を減少させる。種々の抗酸化剤が市販されており、各薬剤について異なる剤形が開発されている。

アスタキサンチンは強力な抗酸化物質として注目されており、海洋細菌、貝類、藻類、魚類に分布する海洋性カロテノイドである[2]。アスタキサンチンはラットにおいて、ルテイン、 β -カロテンと同様にフリーラジカルから保護する[3]。アスタキサンチンの抗酸化活性は、ルテイン、カンタキサンチンおよび β -カロテンの10倍であることが示されている。しかしながら、アスタキサンチンは脂溶性であり、腸管および皮膚からの吸収性に乏しい[4]。近年、より安定しており、より吸収性の良いアスタキサンチンのナノ製剤(ナノアスタキサンチン)が開発された[4]。今回我々は、ゼブラフィッシュの側線系有毛細胞を用いて、ネオマイシン誘導性有毛細胞死に対するアスタキサンチンの保護効果について検討した。

3. 実験材料と方法

3. 1. 動物

野生型のゼブラフィッシュを対合させ胚を作成した。胚は100mm²のpetri dishあたり50の密度で胚培地(1 mM MgSO₄、 120 μ M KH₂PO₄、 74 μ M Na₂HPO₄、 1 mM CaCl₂、 500 μ M KCl、 15 μ M NaCl、 and 500 μ M NaHCO₃ in dH₂O)にて維持した。水温を28.5°Cで維持し、採卵後5日目に実験を行った。本研究は、山口大学医学部動物実験倫理委員会で検討され、医学的指針(第105号)及び日本政府告示第6号に従って実施された。

3. 2. 薬物

10 mg/mLの濃度のネオマイシン硫酸溶液をSigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)から得た。アスタキサンチンのナノ製剤は、FUJIFILM Co. (Kanagawa, Japan)から入手した。アスタキサンチン原末製剤は、Sigma Chemical Co.から入手したアスタキサンチン粉末を用いて調製した。

3. 3. 薬物暴露

3. 3. 1. ネオマイシンの用量反応試験

ゼブラフィッシュを、0、10、50、100、200、400 μ Mの濃度で1時間ネオマイシンに暴露した。

3. 3. 2. アスタキサンチンによる有毛細胞保護効果

ゼブラフィッシュ(n = 10)をナノアスタキサンチン(0.01、0.1、1、10 μ M)または原末製剤に1時間暴露した。続いて、ネオマイシン(200 mM)に1時間暴露した。

3. 4. 免疫染色

ゼブラフィッシュを胚培地で洗浄し、次いでMS222(0.5 mM 3-アミノ安息香酸エチルエステル)で1分間麻酔した。4%パラホルムアルデヒド中で固定した後、ゼブラフィッシュをPBSで3回リンスし、次いでブロッキング溶液(1% Triton-X、5%正常ヤギ血清(NGS) PBS溶液)に室温で2時間暴露した。次いで、400倍抗パルブアルブミン抗体(Sigma Chemical Co.)、1% Triton-X、1% NGS、PBS溶液で4℃にて一晩インキュベートし、1% Triton PBS溶液(PBS-T)で洗浄した。さらに、500倍Alexa594ヤギ抗マウス蛍光抗体、1% Triton-X、1% NGS、PBS溶液で3~4時間インキュベートした。二次抗体標識後、PBSで3回、PBS-Tで3回リンスし、蛍光顕微鏡(XF-EHD2; Nikon、Tokyo、

Japan)で有毛細胞を直接測定した。supraorbital line 1 (SO1)、supraorbital line 2 (SO2)、orbital line 1 (O1)、occipital line 1 (OC1)の神経小丘に存在する有毛細胞を測定した(Fig.1)。Fig.2はこれらの実験に使用したプロトコールである。有毛細胞残存数の平均をコントロール群に対する割合を計算した。

3. 5. 抗酸化能力の定量化

ナノアスタキサンチンに暴露されたゼブラフィッシュの抗酸化能力を定量化するために、OXY吸着試験(FREE Carpe Diem; Diacron International, Grosseto, Italy)を行った。OXY吸着試験は酸化剤溶液(HClO)を不活性化する各サンプルの抗酸化能を評価し、数値化する試験である。30匹のゼブラフィッシュをナノアスタキサンチンに2時間暴露し、次いで胚培地中で3回洗浄した。ゼブラフィッシュをマイクロチューブに入れ、ホモジナイズし5分間遠心分離した。上澄液を試料としてOXY吸着試験を行った。すべてのサンプルは、分析前に1:30に希釈した。10 μ Lのサンプルを1mLのHClO溶液に添加し、続いて10分間のインキュベーション後に10 μ LのN,N-ジエチル-p-フェニレンジアミン[6]を添加した。このアミンは残存したHClOによって酸化され、反応はピンク色の生成物を生成し、直ちに520nmで測定することができる[6]。抗酸化能を間接的に、サンプル1 mL (μ M HClO / mL) [6]で消費されるHClOの量で示した。

3. 6. H2DCFDAを用いた酸化ストレス実験

膜透過性蛍光色素であるH2DCFDA ((2,7,-dichlorodihydrofluorescein diacetate, Molecular probes, D-399)を用いて活性酸素種(ROS) (急に出てきているが説明が必要では？ROSって？)生成を測定した。E3培地に5分間溶解した0.1 μ g/ mLの4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール(DAPI) (Sigma D-9542)と共にインキュベートすることによって有毛細胞を標識した。ゼブラフィッシュを200mM硫酸ネオマイシン(Sigma, N-1876)で処理した。処理後、稚魚をMS222で麻酔し、蛍光顕微鏡下で観察した。

3. 7. 統計

すべての値を平均 \pm 標準誤差(SE)として示した。GraphPad Prismソフトウェア(バージョン6.0e; GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)を統計的比較に使用した。一元配置ANOVAを使用し、ポストホック分析をTukeyの多重比較試験を用いて行った。p < 0.05であれば統計学的に有意であるとみなした。

4. 結果

4. 1. ネオマイシンの用量反応試験

ネオマイシンで処理すると、ゼブラフィッシュの側線器において用量依存性に有毛細胞が消失した (Fig.3)。

4. 2. ネオマイシンに暴露された有毛細胞に対するアスタキサンチンの影響

コントロール群と比較して、ネオマイシン群の有毛細胞は有意に減少した。有毛細胞は、アスタキサンチン懸濁液およびネオマイシンで処理した群では保護されなかった。

ナノアスタキサンチンは、ゼブラフィッシュ側線器における有毛細胞死に対して、用量依存性の保護効果を認め、 $1\mu\text{M}$ と $10\mu\text{M}$ のサブグループ間で有意差を認めた ($p < 0.05$)。 Fig.4、 Fig.5)。

4. 3. OXY 吸着試験

コントロール群と $10\mu\text{M}$ のナノアスタキサンチンで処理した群との間で抗酸化能に有意差を認めた。(コントロール群: $88.80 \pm 5.054\mu\text{mol HClO} / \text{mL}$ 、ナノアスタキサンチン群: $126.8 \pm 8.357\mu\text{mol HClO} / \text{mL}$; $p < 0.05$) (Fig.6)

4. 4. H2DCFDA を用いた免疫組織化学

コントロール群と比較して、ネオマイシン暴露群において蛍光強度の増加が観察された。しかし、ナノアスタキサンチン群では変化は認められなかった (Fig7)。これらの結果は、ナノアスタキサンチンの投与が酸化生成物の産生を抑制することを示唆している。

5. 考察

酸化ストレスは酸化還元不均衡、すなわちフリーラジカルの増加と抗酸化能の減少に起因する。過酸化水素、スーパーオキシドアニオン、ヒドロキシルラジカル、および一重項酸素のような反応性酸素種(ROS)を含む多くフリーラジカルが存在する。ROSは生体内で重要な役割を果たし、疾患や老化の主要な要因となる[7]。ROSはアポトーシスを誘導し、生理学的および病理学的に生物学的経路に参与している[7]。1991年に、ROSの一種である過酸化水素がアポトーシス反応を誘発し、この反応がカタラーゼによって防止されることが示された[8]。

有毛細胞死については幅広く報告されている。アミノグリコシド、音響外傷、抗生剤、抗癌剤は有毛細胞死を引き起こす[9]。それらの有毛細胞死はROSによる障害が原因である。フリーラジカル酸素の生産は、多くの生体で、病理学的および発生過程における細胞死における細胞変性のカスケードに関連することが知られている[10]。

アミノグリコシドは一般的な抗生剤である。一方でアミノグリコシドが内耳と腎臓に有害であることも知られている。有毛細胞中にアミノグリコシドが存在することで、ROSやフリーラジカルが増加する[11]。その反応のメカニズムはフェントン反応である[12]。



アミコグリコシドと鉄イオンが結合することで ROS の形成が促進される[1]。

最近の研究では有毛細胞死を引き起こす酸化ストレスを軽減するために様々な抗酸化剤が検討されている。Sugaharaらはマウスにおいて、coenzymeQ10 が有毛細胞を保護したと報告している。また、Seidman は抗酸化剤であるビタミン C、ビタミン E、メラトニンがラットの有毛細胞を保護することを報告している[14]

カロテノイドは優れた抗酸化剤として多くの文献で報告されている。カロテノイドは一重項酸素を減少させ、脂質過酸化反応を抑制する優れた能力を有する。この高い抗酸化活性は、分子の二重結合によりフリーラジカルを中和することによる。[15]。

アスタキサンチンは海洋性カロテノイドであり、それらは海洋細菌、藻、甲殻類、魚に分布する。アスタキサンチンは抗炎症、抗 DM、抗肥満作用をもつ抗酸化物質である。アスタキサンチンはルテインや B カロテンの抗酸化能を上回る。それはアスタキサンチンのケト基、水酸基の存在する特有の構造のためである。アスタキサンチンの抗酸化能はルテインやカロテンの10倍程度である。そのため、アスタキサンチンの抗酸化能力は様々の分野で注目されている。例えばアスタキサンチンは脳梗塞の脳ダメージを軽減する[17]。

ゼブラフィッシュはスクリーニング動物として確立された実験動物である。ゼブラフィッ

シユには水流を感知するために、神経小丘からなる側線器を有する。ゼブラフィッシュの側線器有毛細胞は哺乳類のそれと構造的、機能的に類似している。ゼブラフィッシュの稚魚の側線器は単純な構造をしており、成魚と同等の機能を生後5日目には有するようになる。ゼブラフィッシュの稚魚はその透明性により、in vivo での有毛細胞の評価が蛍光顕微鏡を用いて迅速に検査できるようになった。アミノグリコシド、シスプラチンの有毛細胞障害について報告した文献が多数認められる。

ゼブラフィッシュを用いて、有毛細胞保護効果を検討した論文も散見される。廣瀬らは抗酸化剤である、ケルセチンの有毛細胞保護効果について報告した。今回我々は、抗酸化能力の高いアスタキサンチンで、ゼブラフィッシュにおける有毛細胞保護効果について検討したが、原末製剤では明らかな保護効果は認められなかった。一方でナノアスタキサンチンを投与した群では、有毛細胞保護効果を認めた。カロテノイドは脂溶性であり、体内に吸収されにくいことが報告されている。そのため、吸収性を改善させるために水分散性のカロテノイドが開発された[18]。カロテノイドと同様に、抗酸化剤であるコエンザイム Q10 も脂溶性である。Nukui らは、水溶性コエンザイム Q10 が従来の脂溶性のものに比べ吸収性が高いと結論づけた[19]。内耳治療においてもナノ製剤の有用性が注目されている。Tamura は、PLGA ナノパーティクルを用いた全身投

与、局所投与後に内耳で薬剤の存在を確認し、内耳に対するナノ製剤の有用性を示した[20]。本研究の結果では、ゼブラフィッシュ有毛細胞において、より粒子径の小さいナノアスタキサンチンが、粒子径の大きい原末製剤よりも有毛細胞保護効果が高かった。この結果は、これまでの報告に矛盾しない結果であった。

OXY 吸着試験は検体の全抗酸可能を調べる事が可能である。サンプルが HClO に暴露され反応した際に、残存した HClO を測定することで抗酸化能力を計算する。今回、ナノアスタキサンチン 10 μ M を投与した群で有意差が得られた。これはナノアスタキサンチンがゼブラフィッシュに吸収され、抗酸化能力が上昇したことを示唆する。

有毛細胞においてナノアスタキサンチンがネオマイシンによる酸化ストレスを抑制するかどうかを調べるために、H2DCFDA を用いた実験を行った。その結果、ナノアスタキサンチンは有毛細胞の酸化ストレスを減少させることが示唆された。

6. 結語

本研究では、ゼブラフィッシュ側線の有毛細胞を用いて、ナノアスタキサンチンのネオマイシンに対する感覚毛細胞の保護効果を明らかにした。これにより、ナノアスタキサンチンが原末製剤のアスタキサンチンより体内でより効率的に吸収され、内耳の保護薬として有用であることが示唆された。

7. 参考文献

- [1] Huth ME、Ricci AJ、Cheng AG. Mechanisms of aminoglycoside ototoxicity and targets of hair cell protection. *International journal of otolaryngology*. 2011;2011:937861.
- [2] Maoka T、Tokuda H、Suzuki N、Kato H、Etoh H. Anti-oxidative、anti-tumor-promoting、and anti-carcinogenesis activities of nitroastaxanthin and nitrolutein、the reaction products of astaxanthin and lutein with peroxynitrite. *Mar Drugs*. 2012;10(6):1391-9.
- [3] Ranga Rao A、Raghunath Reddy RL、Baskaran V、Sarada R、Ravishankar GA. Characterization of microalgal carotenoids by mass spectrometry and their bioavailability and antioxidant properties elucidated in rat model. *J Agric Food Chem*. 2010;58(15):8553-9.
- [4] Anarjan N、Nehdi IA、Sbihi HM、Al-Resayes SI、Malmiri HJ、Tan CP. Preparation of astaxanthin nanodispersions using gelatin-based stabilizer systems. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2014;19(9):14257-65.
- [5] Raible DW、Kruse GJ. Organization of the lateral line system in embryonic

zebrafish. *The Journal of Comparative Neurology*. 2000;421(2):189-98.

[6] Vassalle C, Pratali L, Boni C, Mercuri A, Ndreu R. An oxidative stress score as a combined measure of the pro-oxidant and anti-oxidant counterparts in patients with coronary artery disease. *Clin Biochem*. 2008;41(14-15):1162-7.

[7] Seifried HE, Anderson DE, Fisher EI, Milner JA. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J Nutr Biochem*. 2007;18(9):567-79.

[8] Pierce GB, Parchment RE, Lewellyn AL. Hydrogen peroxide as a mediator of programmed cell death in the blastocyst. *Differentiation*. 1991;46(3):181-6.

[9] Olivari FA, Hernandez PP, Allende ML. Acute copper exposure induces oxidative stress and cell death in lateral line hair cells of zebrafish larvae. *Brain Res*. 2008;1244:1-12.

[10] Hirose K, Hockenbery DM, Rubel EW. Reactive oxygen species in chick hair cells after gentamicin exposure in vitro. *Hearing Research*. 1997;104(1-2):1-14.

[11] Priuska EM, Schacht J. Formation of free radicals by gentamicin and iron

and evidence for an iron/gentamicin complex. *Biochemical pharmacology*. 1995;50(11):1749-52.

[12] Thomas C, Mackey MM, Diaz AA, Cox DP. Hydroxyl radical is produced via the Fenton reaction in submitochondrial particles under oxidative stress: implications for diseases associated with iron accumulation. *Redox report : communications in free radical research*. 2009;14(3):102-8.

[13] Sugahara K, Hirose Y, Mikuriya T, Hashimoto M, Kanagawa E, Hara H, et al. Coenzyme Q10 protects hair cells against aminoglycoside. *PLoS One*. 2014;9(9):e108280.

[14] Seidman MD. Effects of dietary restriction and antioxidants on presbycusis. *Laryngoscope*. 2000;110(5 Pt 1):727-38.

[15] Rutz JK, Borges CD, Zambiasi RC, da Rosa CG, da Silva MM. Elaboration of microparticles of carotenoids from natural and synthetic sources for applications in food. *Food Chem*. 2016;202:324-33.

[16]. Matsuno T, Miki W. Biological Functions and Activities of Animal Carotenoids. *Chemistry and biology*. 1990;28(4):219-27.

- [17]. Shen H, Kuo CC, Chou J, Delvolve A, Jackson SN, Post J, et al. Astaxanthin reduces ischemic brain injury in adult rats. *Faseb j.* 2009;23(6):1958-68.
- [18] Fetoni AR, Piacentini R, Fiorita A, Paludetti G, Troiani D. 2009, Coenzyme Q10 formulation (Q-ter) promotes outer hair cell survival in a guinea pig model of noise induced hearing loss (NIHL). *Brain Res.* 2009;1257:108-16.
- [19] Nukui K, Yamagishi T, Miyawaki H, Kettawan A, Okamoto T, Belardinelli R, et al. Blood CoQ10 levels and safety profile after single-dose or chronic administration of PureSorb-Q40: animal and human studies. *Biofactors.* 2008;32(1-4):209-19.
- [20] Tamura T, Kita T, Nakagawa T, Endo T, Kim TS, Ishihara T, et al. Drug delivery to the cochlea using PLGA nanoparticles. *Laryngoscope.* 2005;115(11):2000-5.

Fig 1

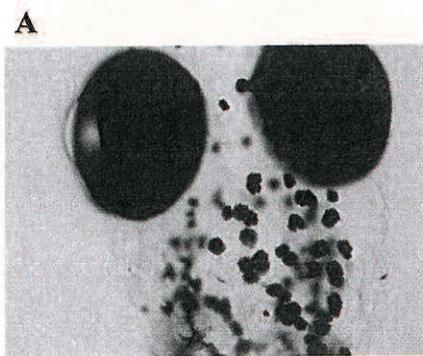


Fig 2

Protocol

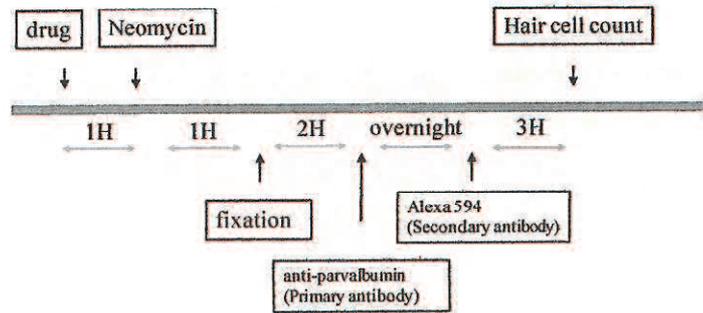


Fig 3

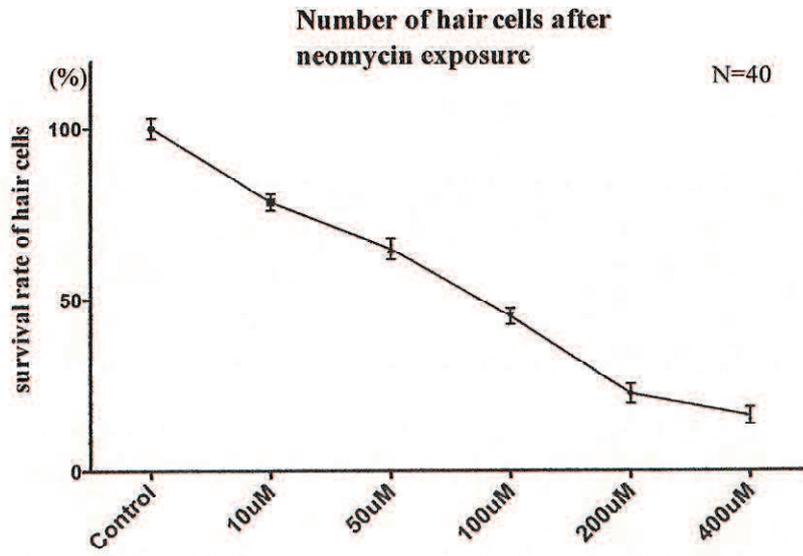
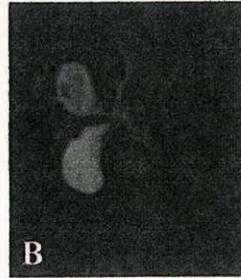


Fig 4



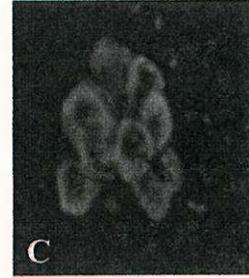
A

Control



B

Neomycin 200 μ M



C

Nano Astaxanthin 10 μ M
+
Neomycin 200 μ M

Fig 5

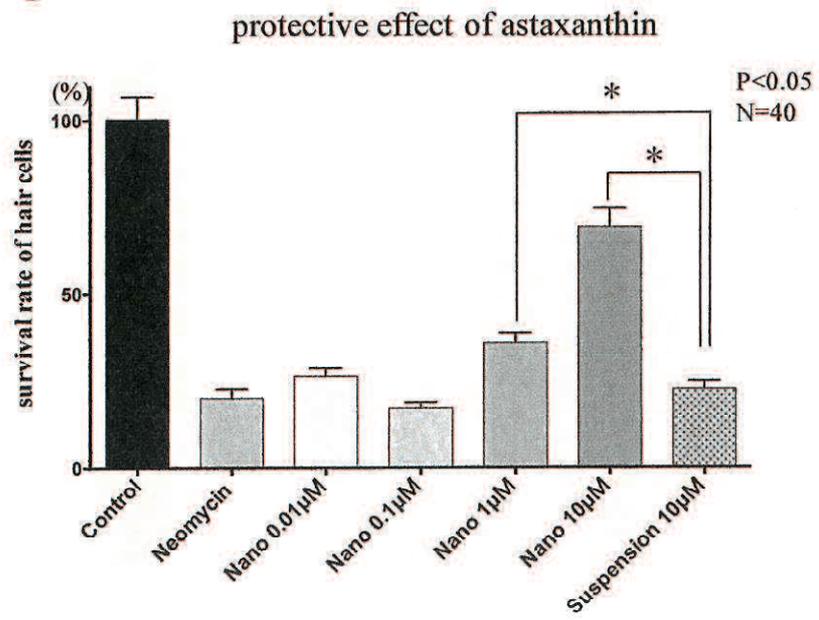


Fig 6

OXY-adsorbent test

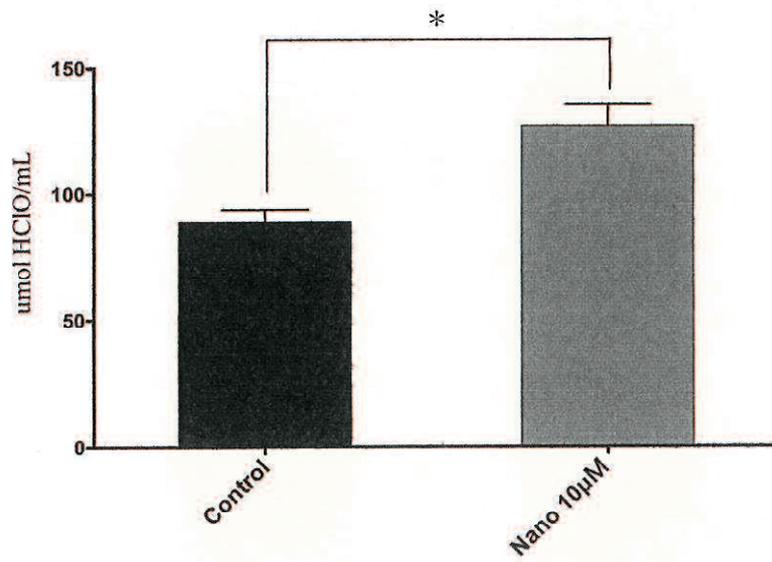


Fig 7 Evaluation of oxidative stress

Control

Neomycin

Nano astaxanthin



9. 図表の説明

Fig.1 (A) ゼブラフィッシュ稚魚 (B) ゼブラフィッシュ側線器神経小丘の蛍光顕微鏡画像、眼窩上部1 (SO1)、眼窩上部2 (SO2)、眼窩1 (O1) および後頭部 (OC1) の有毛細胞をカウントした

Fig. 2. 有毛細胞カウントのプロトコール

Fig. 3. ネオマイシンの暴露により、濃度依存性に有毛細胞は減少していた。

Fig. 4. 抗パルブアルブミン抗体で標識されたゼブラフィッシュの側線器有毛細胞の蛍光顕微鏡画像。(A)コントロール群、(B)ネオマイシンにより有毛細胞が消失、減少している。(C)ナノアスタキサンチンにより有毛細胞死が抑制されている。

Fig. 5. 4 つの神経小丘 (SO1、SO2、O1、C1) において有毛細胞をカウントした。有毛細胞の生存率をコントロール群の割合として示している。200 μ M ネオマイシンで処理したゼブラフィッシュ群は、有毛細胞の生存率を低下させている。ナノアスタキサンチンとネオマイシンに暴露された群では有毛細胞障害が軽減されている ($n = 40$, $p < 0.05$).

Fig. 6. OXY 吸着剤試験は、HClO 溶液に添加された試料の全抗酸化能を評価する。全抗酸化能は、1ml のサンプル (μ mol HClO / mL) が消費する HClO (μ mol) 換算で

表される。抗酸化能は、 $10\ \mu\text{M}$ ナノアスタキサンチンに暴露した群で増加している ($n = 5, p < 0.05$)。

Fig.7. 蛍光強度はネオマイシン群有毛細胞ではコントロール群よりも強く、酸化ストレスを反映している。一方でナノアスタキサンチン群では蛍光強度は減弱している。