

学位論文

アスタキサンチンナノ製剤の有毛細胞保護効果の検討

氏名 小林 由貴

所属 山口大学大学院医学系研究科
耳鼻咽喉科学講座

令和5年6月

目次

(1) 要約	P1
(2) はじめに	P2
(3) 方法	P3-P8
(4) 結果	P9-11
(5) 考察	P12-P13
(6) 参考文献	P14-P17
(7) 図表	P18-23
(8) 図表の説明	P24-26

(1) 要約

アミノグリコシド系抗菌薬は有害反応として聴覚障害をきたすことがあり、蝸牛基底回転の外有毛細胞が障害されやすいことが知られている。本研究では、ネオマイシンの有毛細胞障害に対するアスタキサンチンナノ製剤の保護効果を検討した。ネオマイシンを加えた CBA/N マウスの卵形囊培養に対し、培養液にアスタキサンチンナノ製剤を投与した群では有毛細胞の減少および酸化ストレスが有意に抑制された。

さらに、アスタキサンチンナノ製剤の鼓室内投与を行い音響曝露前後の聴性脳幹反応 (ABR) 閾値の変化、有毛細胞減少率を評価した。アスタキサンチン投与群では音響曝露後の ABR 閾値変化、有毛細胞減少率が抑制される傾向が見られた。血液内耳関門の存在により、鼓室内投与に適した薬剤は限られるが、アスタキサンチンナノ製剤の形態は正円窓膜を浸透する可能性があり、内耳障害抑制の効果を有する可能性が示唆された。

(2) はじめに

アミノグリコシド系薬剤により誘発される内耳有毛細胞死は、活性酸素種（ROS）やストレスキナーゼの生成と関連していることが知られており¹⁾、これに対しビタミンEやコエンザイムQ10等の様々な物質による有毛細胞保護効果が報告されている²⁾³⁾。

アスタキサンチンはカロテノイドの一種で強力な抗酸化作用を有しており、アスタキサンチンを含有した栄養補助食品や化粧品が多くの国で製造されている。油溶性物質であるため従来は生体組織への移行が困難であったが、フジフィルム社（日本）でアスタキサンチンナノ乳化物が開発され、血中移行することが報告されている⁴⁾。

本研究では、ネオマイシンの内耳毒性および音響障害に対するアスタキサンチンナノ製剤の内耳有毛細胞保護効果を評価した。

(3) 方法

本研究ではアスタキサンチンナノ製剤（富士フイルム社、東京、日本）を使用した。吸光度測定用に、それぞれ 100 nM~1 mM の濃度の 3 種類のアスタキサンチン溶液を調製した。アスタキサンチンナノ製剤を溶媒、DMSO に溶解した溶液、アスタキサンチン粉末（Sigma Chemical Co.、ミズーリ州セントルイス）を無水エタノールに溶解した溶液の 3 種類を調整した。上記 3 種類の溶液を 10mM から 1nM に 10 倍に希釈）のそれぞれの 480nm での吸光度を測定した。各サンプルのアスタキサンチン濃度は、吸光度から計算した。対象は正常なプライエル反射と鼓膜を有している CBA/N マウス（九州動物会社、熊本、日本、4~6 週齢、雄）とした。ペントバルビタールで深麻酔を行い速やかに断頭した。側頭骨を摘出し、卵形嚢を Earle 溶液（Invitrogen）とイーグル培地（Invitrogen, Carlsbad, CA）混合培地（2:1）の中で摘出した。分離した卵形嚢を 5%ウシ胎仔血清（Invitrogen）を添加したイーグル培地に移し、5%CO₂ および 37°C の条件で 12 または 24 時間培養した。有毛細胞死を誘導するため、ネオマイシン溶液（10 mg / mL;Sigma, St. Louis, MO）を培地に加え、最終濃度を 1.0 mM に調整した。その後、卵形嚢を室温で 1 時間、4%パラホルムアルデヒド（PFA）を用いて固定した。耳石は 28G 針とシリンジを用いてリン酸緩衝生理食塩水（PBS）を流して卵形嚢から除去した。アスタキサンチンナノ製剤溶液はそれぞれ 1 μM、10 μM、100 μM に調整し、培養開始前に培地に溶解した。

残存有毛細胞数の評価

固定した卵形嚢をブロッキング溶液（1%ウシ血清アルブミン、0.4%正常ヤギ血清、0.4%正常馬血清、0.4%Triton X-100 in PBS）で4°Cで一晩培養した。有毛細胞を標識するため、カルモジュリンに対するモノクローナル抗体（Sigma）およびカルビンジンに対するポリクローナル抗体（Chemicon、Temecula、CA）を使用した。サンプルを一次抗体溶液（ブロッキング溶液中のカルモジュリン1：150またはカルビンジン1：250）中4°Cで一晩培養した。ブロッキング溶液で洗浄後、検体をブロッキング溶液で希釈した二次抗体で培養した（ブロッキング抗体：ビオチン化ウマ抗マウスIgG（1：100; Vector Laboratories、Burlingame、CA）またはAlexa 488共役ヤギ抗マウスIgG（1：500;分子プローブ、ユージーン、オレゴン州）、Alexa 594コンジュゲートヤギ抗ウサギIgG（1：500;分子プローブ））ブロッキング溶液ですすいだ後、卵形嚢をVectashield®（Vector Laboratories）にマウントし、カバースリップをかけた。有毛細胞生存数評価のため、蛍光顕微鏡（XF-EHD2、Nikon、Tokyo、Japan）で卵形嚢を観察した。カルビンジン陽性細胞およびカルモジュリン陽性細胞は、それぞれ線条体領域および線条体外領域の有毛細胞としてカウントした。標識した有毛細胞は20 μ m²の範囲でカウントし、各卵形嚢でランダムに決定した。8つの検体の外有毛細胞数を平均し、外有毛細胞密度を算出した。各条件で少なくとも6個の卵形嚢を検査した。すべてのデータは平均±標準誤差で示し、Macintosh用のStatViewバージョン5.0Jで分析した。有毛細胞密度をMann-WhitneyのU検定を用いて、有意差を決定し、P < 0.05を統計的に有意であるとした。

4-HNE免疫組織染色

ROSの生成評価のため、4-ヒドロキシ-2-ノネナール（4-HNE）の免疫組織染色を行った。解剖後サンプルを4%PFAで固定し、1：100に希釈した抗-4-HNEマウスモノクローナル抗体（OXIS International, Inc., Portland, OR, USA）にて、冷蔵庫（4° C）で一晩インキュベートした。サンプルをブロッキング溶液ですすいだ後、Alexa488結合ヤギ抗マウスIgGおよびTexasred結合ファロイジン（1：100、Sigma）と室温で4時間インキュベートした。免疫組織化学的染色の蛍光強度は、画像解析ソフトウェアImageJを使用して評価した。培養卵形嚢は、対照群（通常の培地を使用）、ネオマイシン群およびネオマイシン+アスタキサンチン群の3つのグループに分けた。各群に6つのサンプルを使用し、対照群の蛍光強度の平均を20と定義し他の群の強度を相対値で示した。

聴力評価

4週齢以降のプライエル反射良好な白色モルモットを対象に、メデトミジン(0.3mg/0.3ml/kg)、ミダゾラム(4mg/0.8ml/kg)、ブトルファノール(5mg/1ml/kg)、生理食塩水(2.9ml/kg)混合液を腹腔内投与して全身麻酔を行い、一方にアスタキサンチンナノ製剤、他方に溶媒のみの鼓室内投与を行った。薬剤投与前、薬剤投与翌日、音響曝露後となる薬剤投与7日後に聴性脳幹反応（auditory brain stem response, ABR）検査を行い聴力評価を行った。ABR

検査は動物の皮下に白金針電極を刺入し、検査側を陰極、対側を陽極、体幹皮下を接地電極として反応を記録した。チューブをイヤホンに接続して外耳道に挿入し、4、8、16、32 kHz のトーンバースト0.2秒間隔の0.8秒、合計音刺激500回に設定した刺激音に曝露して信号プロセッサで記録した。ABR 記録装置は、signal processor (Synax 1100; NEC, Tokyo, Japan)を用いた。3-5波間の波形の最も低い刺激で測定可能であった値を閾値とした。

薬剤鼓室内投与

両側中耳骨胞を開放し、薬剤投与前に1%ヒアルロン酸(10mg/ml)を10分間正円窓膜(Round Window Membrane: 以下RWM)上に投与し、可及的に除去した。その後アスタキサンチン乳化物(粒径60nm ナノ製剤、含有量0.76wt%)をRWM上に留置し、骨胞と創部を閉鎖した。対側も同様にヒアルロン酸を10分間留置した後に可及的に除去し、溶媒(粒径55nm ナノ製剤)のみRWM上に留置し閉鎖した。蝸牛内への製剤移行を確認するため、薬剤を投与した翌日に正円層膜経由で蝸牛内から外リンパを採取し、Nano Drop(サーモフィッシュャーサイエンティフィック株式会社、日本)にて4つのサンプルでスペクトルを測定して480nmにおける吸光度を算出した。10mMから1nMまで10倍ずつ希釈した8種類の濃度のアスタキサンチンナノ製剤の480nmにおける吸光度を測定し、エタノール溶液、DMSA溶液にも同様にアスタキサンチンを溶解し、吸光度からアスタキサンチン濃度を算出した。

音響障害法

前述のように麻酔を行ったモルモットを固定し、無響室にて頭部中央上10 cmの位置にスピーカーを設置した。両側外耳道の高さでsound-level meter (NA-60, Rion, Tokyo, Japan)を用いflat modeで音圧を測定し、強大音響(130 dB SPL, 4 kHz に中心を持つオクターブバンドノイズ)に3時間曝露した。

蝸牛の組織学的検査

メデトミジン(0.3mg/0.3ml/kg)、ミダゾラム(4mg/0.8ml/kg)、ブトルファノール(5mg/1ml/kg)、生理食塩水(2.9ml/kg)混合液を腹腔内投与する深麻酔により安楽死させた後、速やかに断頭して側頭骨を摘出した。側頭骨から蝸牛を摘出し4%パラホルムアルデヒドにて24時間室温で固定した。コルチ器を摘出し0.3% Triton X-100で10分間浸透させ、fluorescein isothiocyanate-conjugated phalloidin (Sigma, St. Louis, MO, USA : 1 µg/ml PBS)で1時間染色した。PBSで洗浄後DAPIで核染色し、蛍光顕微鏡下で観察した。蝸牛頂点からの基底回転までの外有毛細胞を観察し、最も外有毛細胞の数が少ない箇所を評価した。

統計学的解析

統計的解析はExcel Stat4 for Windows (Microsoft, Tokyo, Japan) Mann-WhitneyのU検

定を用いて行い、 $P < 0.05$ を有意とした。全てのデータは平均値±標準誤差で示した。

すべての実験は山口大学生命科学実験施設の許可を得た実施計画に基づいて行い、動物の

愛護法、動物管理使用規則を遵守した。

(4) 結果

吸光度測定

アスタキサンチンをエタノール、溶媒に溶解し、吸光度より算出した濃度、溶解した濃度の相関を示した (Fig.1)。エタノール、DMSA 溶液と比較して、ナノ粒子の溶媒ではアスタキサンチンナノ製剤を溶解させた濃度に比例して吸光度から算出される濃度の上昇が見られた。

卵形囊培養

2mM のネオマイシンを加え卵形囊器官培養を行った群と比較して、培養液にアスタキサンチンナノ製剤をそれぞれ 1 μ M、10 μ M、100 μ M 投与した群では有毛細胞の減少が有意に抑制された (Fig.2a-e)。

培養有毛細胞の密度においても、ネオマイシンのみを投与した群と比較してアスタキサンチン投与群で有毛細胞の減少が抑制され、アスタキサンチンを 100 μ M 投与した群では有意に抑制された (Fig. 2f)。

4-HNE 免疫組織染色

ヒドロキシラジカルの生成を検出するために、ヒドロキシラジカルの代謝産物である 4-HNE に対する抗体を使用して免疫組織化学を行った (Fig3a-f)。ネオマイシン群では曝露後 24 時間で有毛細胞の減少が見られたため、12 時間培養した卵形囊を使用した。 β -アクチンは、有毛細胞層を示すためにテキサスレッドと結合したファロイジンで標識した。

蛍光顕微鏡を使用して有毛細胞層を観察した。ネオマイシン群で培養した卵形嚢では4・HNEを含む有毛細胞が多数見られたが、ネオマイシン+アスタキサンチン群で12時間培養した卵形嚢では観察されなかった。これらの結果からアスタキサンチンがネオマイシン曝露後のヒドロキシラジカルの生成を抑制したことが示唆された。

薬剤の蝸牛への移行性

アスタキサンチン投与24時間後にモルモットの蝸牛を摘出し、内リンパの色調を観察した。アスタキサンチン投与群では、特に蝸牛の基底層にアスタキサンチンに類似した赤色が観察された。溶媒のみを投与した対照群では、色調の変化は観察されなかった

(Fig.4)。アスタキサンチン試料の480 nmにおける平均スペクトルは0.6425であり、292.05 μM の濃度に相当する (Fig.1)。また、アスタキサンチンとコントロールの差の平均スペクトルは0.233であり、106.045 μM に相当することがわかった。

音響曝露前後のABR閾値

4kHz、8kHz、16kHz、32kHzの刺激で閾値の変化を測定した (Fig.5)。縦軸は音響曝露前後の音圧レベル (dBSPL) のデシベル (dB) で測定した閾値を表す。アスタキサンチン群と対照群の音響曝露前後の閾値の推移を比較した。4kHz、8kHz、32kHzでは有意差はなかった。アスタキサンチン群では16 kHzのABR閾値変化が抑制される傾向にあったが、音響曝露7日後では両群間に有意差はなかった。

有毛細胞減少の定量化

音響曝露7日後の内毛細胞および外毛細胞3列を示す (Fig.6a,b)。アスタキサンチン投与群では対照群に比べ残存有毛細胞が多く見られた。また、蝸牛の2回転中間部においてアスタキサンチン群では有毛細胞減少率が低い傾向があった (Fig.6c-e)。一方内毛細胞は両群ともほとんど減少しておらず内毛細胞損失率に有意差はなかった。

(5) 考察

活性酸素種の生成が内耳障害に強く関与していると多数の報告がなされている¹⁾。ネオマイシンなどのアミノ配糖体は、活性酸素種、ストレスキナーゼの活性化を起こし有毛細胞障害を引き起こすとされている一方で、フリーラジカルスカベンジャーが存在することで細胞障害が軽減されると報告されている⁵⁾。今回使用したアスタキサンチンは、活性酸素の中でも特に毒性の強い一重項酸素の酸化反応と過酸化脂質の生成を抑える抗酸化作用を有しており、酸化ストレスや細胞死を減少させる⁶⁾⁷⁾。臨床的には糖尿病の合併症や眼疾患の減少、癌予防、抗疲労作用などが報告されている⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾。

以前当教室で行ったゼブラフィッシュにおける研究では、アスタキサンチンナノ製剤を経口的に投与した場合、ネオマイシン単独投与群と比較して側線器の有毛細胞残存率がされることを報告した¹²⁾。今回のマウスにおける卵形嚢培養では、ネオマイシン単独群と比較してアスタキサンチンナノ製剤が存在することで有毛細胞減少率が有意に抑制される結果となり、アスタキサンチンがネオマイシンの哺乳動物感覚有毛細胞誘発死を抑制することが示唆された。

内耳への投与に関しては、血液内耳関門が存在すること、内耳を循環する血流量が少なく薬物が到達しにくいことなどから薬剤透過性が問題となるが、過去の検討では乳酸グリコール酸共重合体などのナノ粒子は正円窓膜(RWM)を通過することが明らかになっており¹³⁾、アスタキサンチンナノ製剤はRWMを透過することが期待される。今回はナノ製剤を使用して局所投与を行った。今回使用したナノ製剤の剤型は正円窓膜を透過しやすく正円窓を介し

た局所投与に適していると考えられ、さらに正円窓を透過しやすくするためにヒアルロン酸にて前処理を行った¹⁴⁾。

今回の検討では鼓室内投与後に内リンパの色調に変化が見られたことから薬剤投与のアプローチとしては有用と考えられるが、鼓室内での滞留性、薬剤の徐放効果が必要となるため¹⁵⁾さらに薬剤の効果を得るためには、今後も投与形態を検討する必要があると考える。

(6) 参考文献

- 1) Priuska EM, and Schacht J. 1995. Formation of free radicals by gentamicin and iron and evidence for an iron/gentamicin complex. *Biochem Pharmacol* 50:1749-1752.
10.1016/0006-2952(95)02160-4
- 2) Sugahara K, Hirose Y, Mikuriya T, Hashimoto M, Kanagawa E, Hara H, Shimogori H, and Yamashita H. 2014. Coenzyme Q10 protects hair cells against aminoglycoside. *PLoS One* 9:e108280. 10.1371/journal.pone.0108280
- 3) Hirose Y, Sugahara K, Kanagawa E, Takemoto Y, Hashimoto M, and Yamashita H. 2016. Quercetin protects against hair cell loss in the zebrafish lateral line and guinea pig cochlea. *Hear Res* 342:80-85. 10.1016/j.heares.2016.10.001
- 4) Harada F, Morikawa T, Lennikov A, Mukwaya A, Schaupper M, Uehara O, Takai R, Yoshida K, Sato J, Horie Y, Sakaguchi H, Wu CZ, Abiko Y, Lagali N, and Kitaichi N. 2017. Protective Effects of Oral Astaxanthin Nanopowder against Ultraviolet-Induced Photokeratitis in Mice. *Oxid Med Cell Longev* 2017:1956104. 10.1155/2017/1956104
- 5) Thomas C, Mackey MM, Diaz AA, and Cox DP. 2009. Hydroxyl radical is produced via the Fenton reaction in submitochondrial particles under oxidative stress: implications

for diseases associated with iron accumulation. *Redox Rep* 14:102-108.

10.1179/135100009x392566

- 6) Goto S, Kogure K, Abe K, Kimata Y, Kitahama K, Yamashita E, and Terada H. 2001. Efficient radical trapping at the surface and inside the phospholipid membrane is responsible for highly potent antiperoxidative activity of the carotenoid astaxanthin. *Biochim Biophys Acta* 1512:251-258. 10.1016/s0005-2736(01)00326-1

- 7) Lakey-Beitia J, Kumar DJ, Hegde ML, and Rao KS. 2019. Carotenoids as Novel Therapeutic Molecules Against Neurodegenerative Disorders: Chemistry and Molecular Docking Analysis. *Int J Mol Sci* 20. 10.3390/ijms20225553

- 8) Zhou X, Zhang F, Hu X, Chen J, Wen X, Sun Y, Liu Y, Tang R, Zheng K, and Song Y. 2015. Inhibition of inflammation by astaxanthin alleviates cognition deficits in diabetic mice. *Physiol Behav* 151:412-420. 10.1016/j.physbeh.2015.08.015

- 9) Dong LY, Jin J, Lu G, and Kang XL. 2013. Astaxanthin attenuates the apoptosis of retinal ganglion cells in db/db mice by inhibition of oxidative stress. *Mar Drugs* 11:960-974. 10.3390/md11030960

- 10) Cicero AFG, Allkanjari O, Busetto GM, Cai T, Larganà G, Magri V, Perletti G, Robustelli Della Cuna FS, Russo GI, Stamatiou K, Trinchieri A, and Vitalone A. 2019. Nutraceutical treatment and prevention of benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Arch Ital Urol Androl* 91. 10.4081/aiua.2019.3.139
- 11) Imai A, Oda Y, Ito N, Seki S, Nakagawa K, Miyazawa T, and Ueda F. 2018. Effects of Dietary Supplementation of Astaxanthin and Sesamin on Daily Fatigue: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Two-Way Crossover Study. *Nutrients* 10. 10.3390/nu10030281
- 12) Takemoto Y, Hirose Y, Sugahara K, Hashimoto M, Hara H, and Yamashita H. 2018. Protective effect of an astaxanthin nanoemulsion against neomycin-induced hair-cell damage in zebrafish. *Auris·Nasus·Larynx* 45:20-25. 10.1016/j.anl.2017.02.001
- 13) Zhang L, Xu Y, Cao W, Xie S, Wen L, and Chen G. 2018. Understanding the translocation mechanism of PLGA nanoparticles across round window membrane into the inner ear: a guideline for inner ear drug delivery based on nanomedicine. *Int J Nanomedicine* 13:479-492. 10.2147/ijn.S154968

- 14) Inagaki Y, Fujioka M, Kanzaki S, Watanabe K, Oishi N, Itakura G, Yasuda A, Shibata S, Nakamura M, Okano HJ, Okano H, and Ogawa K. 2016. Sustained Effect of Hyaluronic Acid in Subcutaneous Administration to the Cochlear Spiral Ganglion. *PLoS One* 11:e0153957. 10.1371/journal.pone.0153957
- 15) Horiike O, Shimogori H, and Yamashita H. 2004. Effect of edaravone on streptomycin-induced vestibulotoxicity in the Guinea pig. *Laryngoscope* 114:1630-1632. 10.1097/00005537-200409000-00023

この論文は PeerJ に掲載予定の **Protective effect of astaxanthin nanoemulsion on mammalian inner ear hair cells** から引用したものである。

(7) 図表

Figure 1

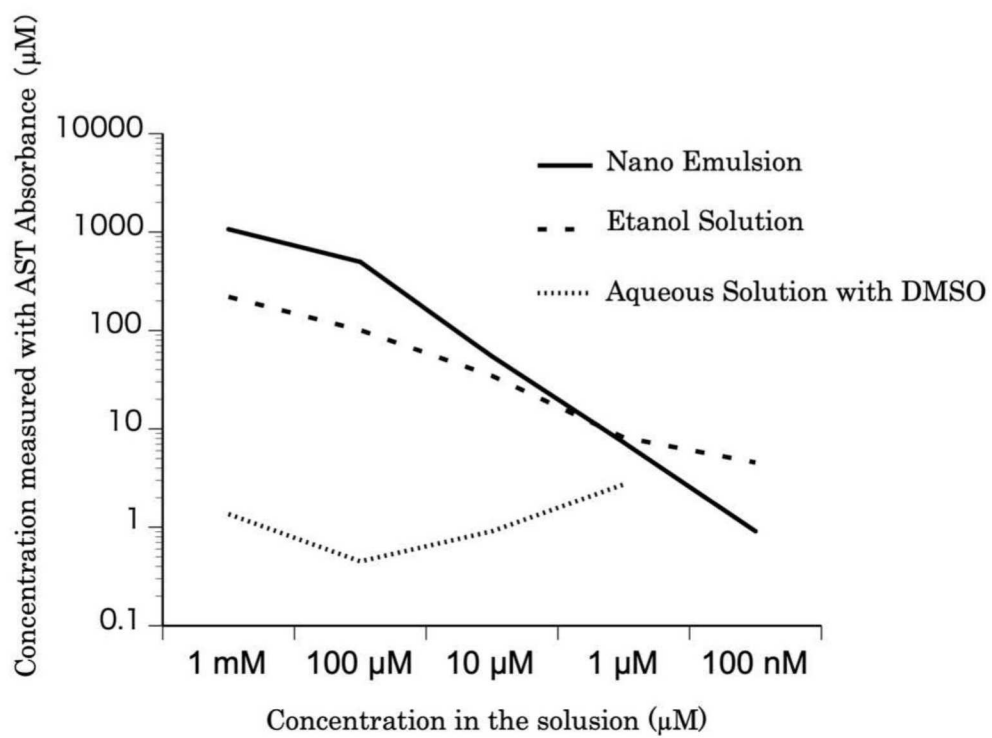


Figure 2

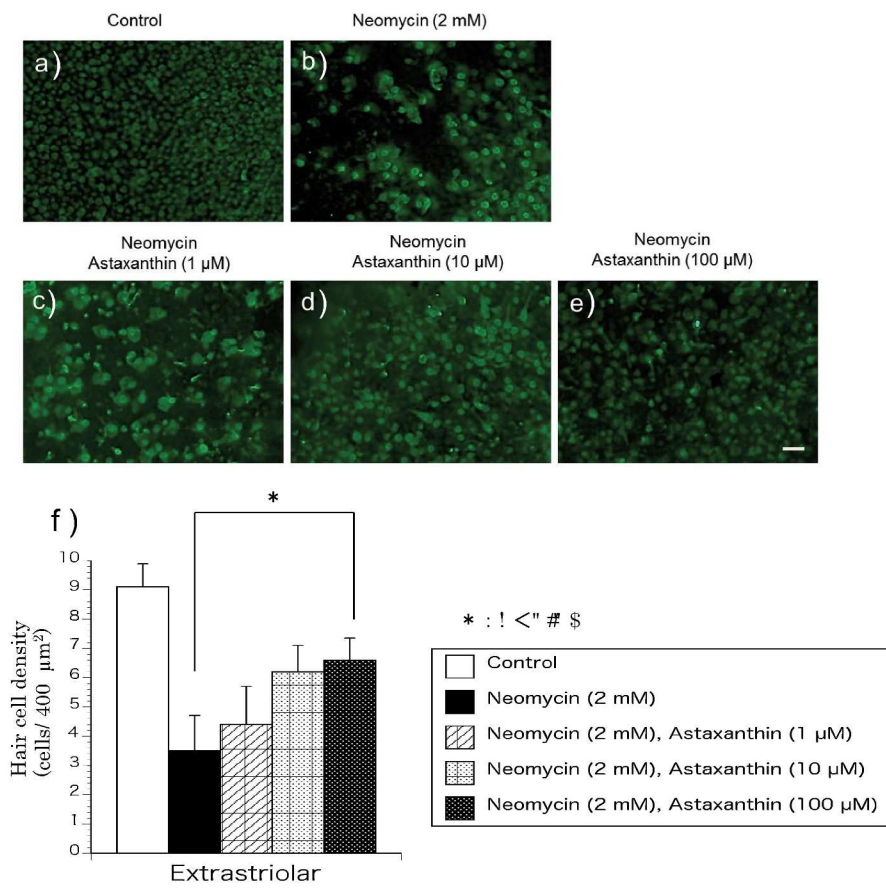


Figure 3

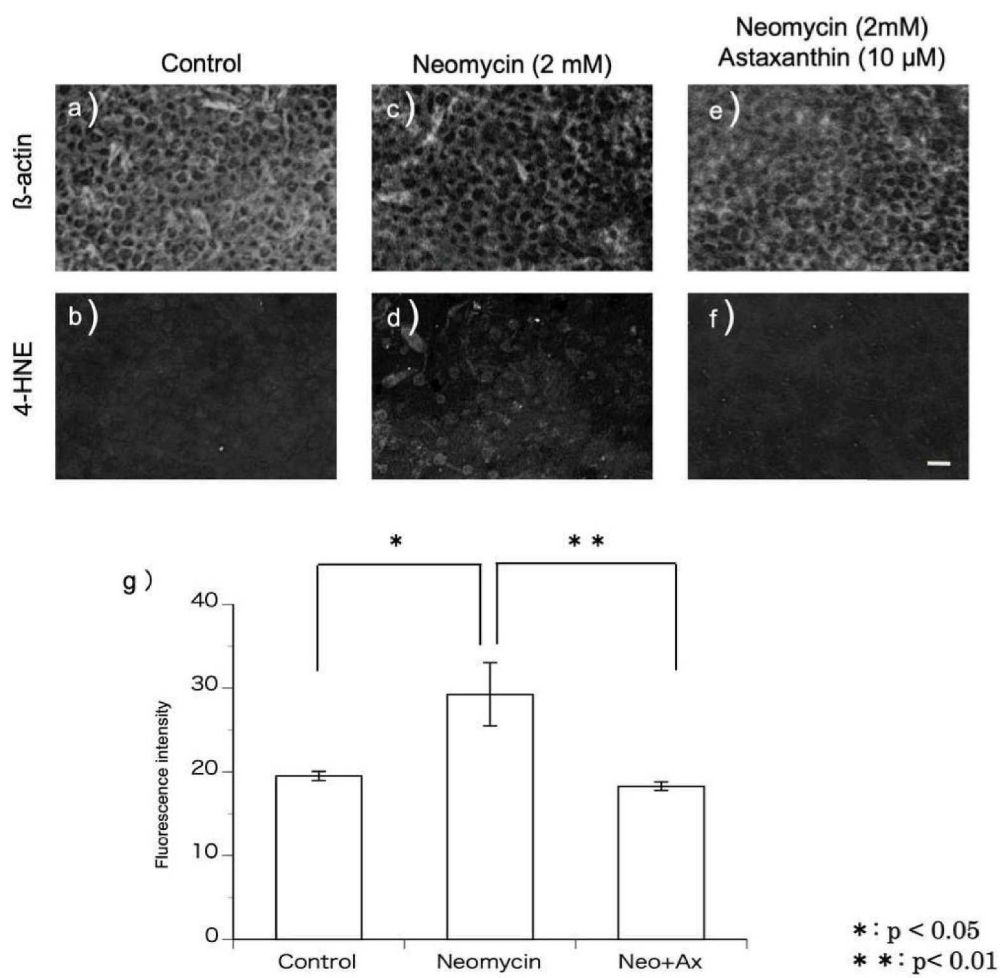


Figure 4

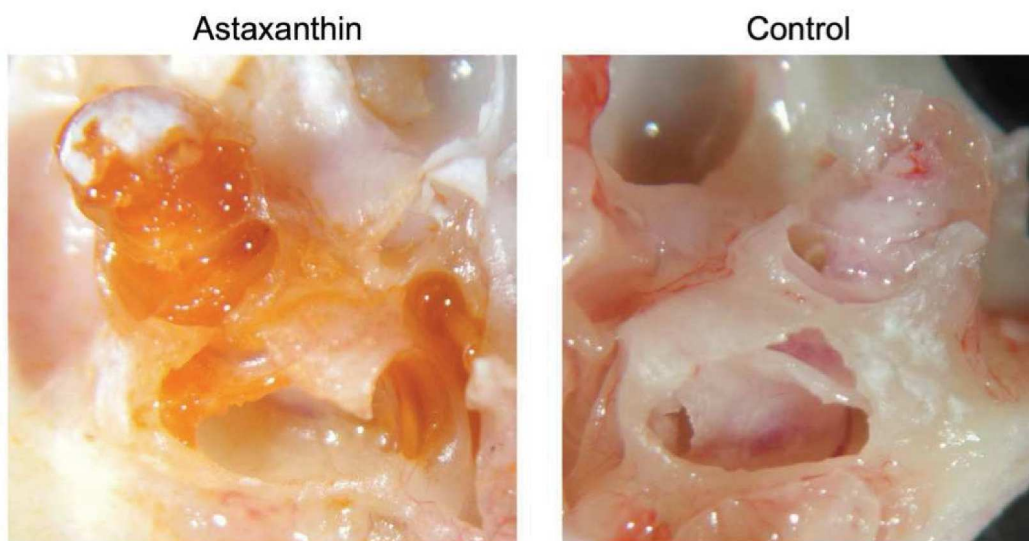


Figure 5

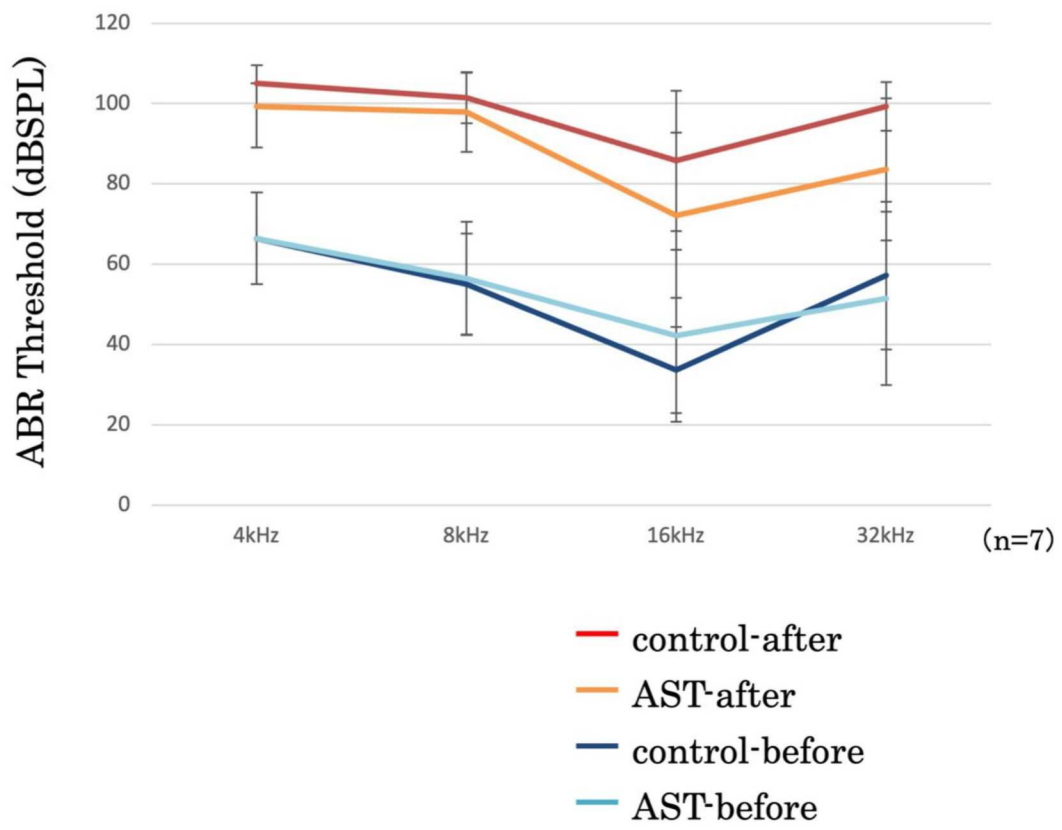
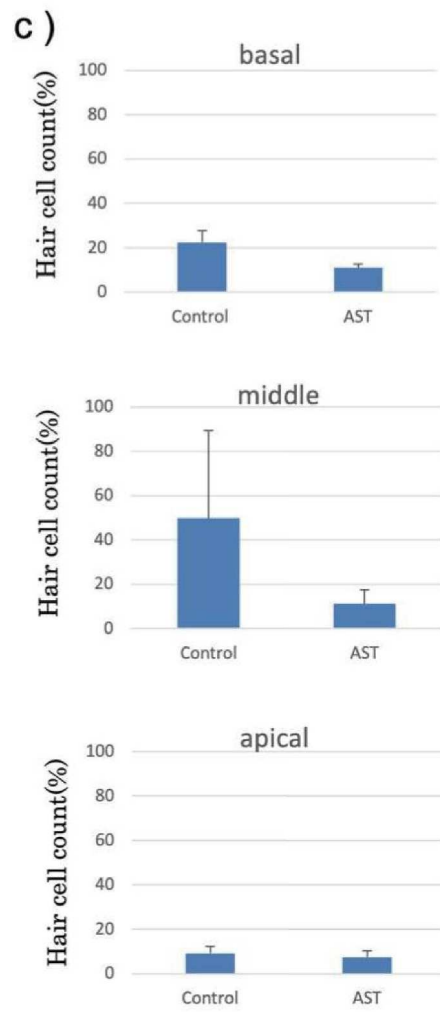
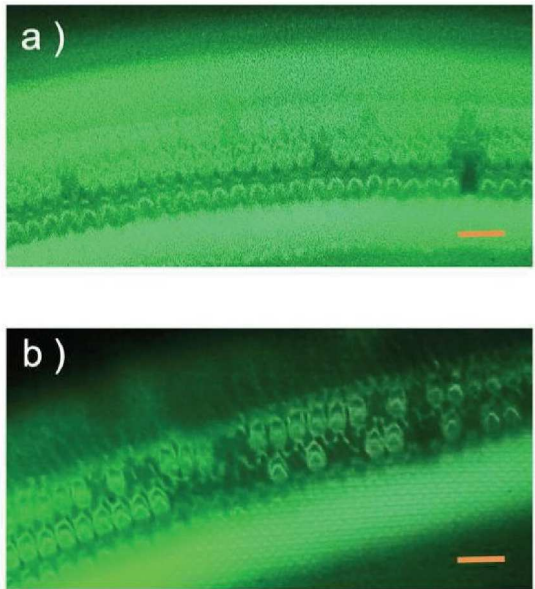


Figure 6



(8) 図表の説明

Figure 1 : 吸光度から測定したアスタキサンチンナノ製剤の濃度

アスタキサンチン製剤 10mM から 1nM まで 10 倍ずつ希釈した 8 種類の濃度の溶液で、480nm における吸光度を測定した。エタノール溶液、DMSA 溶液にも同様にアスタキサンチン製剤を溶解し、吸光度からアスタキサンチン濃度を算出した。

Figure 2 : 卵形嚢培養

コントロール群と比較してネオマイシンのみを投与し卵形嚢培養を行った群では有毛細胞密度の減少が見られた。培養液にアスタキサンチンナノ製剤をそれぞれ 1 μ M、10 μ M、100 μ M 投与し、100 μ M 投与した群では有毛細胞の減少が有意に抑制された(* $p < 0.05$)。

Scale bar = 10 μ m

Figure3 : 4-HNE免疫組織染色

ネオマイシン+アスタキサンチン群と比較してネオマイシン群で培養した卵形嚢では 4-HNE の蛍光強度が強く見られ(** $p < 0.01$)、酸化ストレスに対するアスタキサンチンの保護効果が示唆された。Scale bar = 10 μ m

Figure4 : 薬剤の蝸牛への移行性

アスタキサンチン投与群では蝸牛の基底層にアスタキサンチンに類似した赤色が観察され、対照群では色調の変化は観察されなかった

Figure 5 : ABR閾値

音響曝露前後にABR閾値変化を示す。縦軸に閾値（dB SPL）、横軸に周波数（dB）を示し、それぞれの群で音響負荷前と音響負荷後の閾値変化（平均±標準偏差）を比較した。n=7。4kHz、8kHz、32kHzでは有意差はなかった。アスタキサンチン群では16 kHzのABR閾値変化が抑制される傾向にあったが、音響曝露7日後では両群間に有意差はなかった。

Figure6 : 音響曝露後の内毛細胞と外毛細胞

(a) アスタキサンチン投与群、(b) 溶媒投与群

蛍光顕微鏡観察下での外毛細胞と内毛細胞を示す。アスタキサンチン投与群の外毛細胞と内毛細胞は音響曝露から7日後ではほぼ減少が見られなかった。

(c) 音響曝露による外毛細胞の損失に対するアスタキサンチンの保護効果

音響曝露7日後の内毛細胞および外毛細胞3列を示す。アスタキサンチン群では音響曝露群に比べ残存有毛細胞が多く見られた。蝸牛第2回転目中間部においてアスタキサンチン群では音響曝露群と比較し有毛細胞減少率が低い傾向があった。Scale bar = 20 μm .