

学位論文（博士）

ノビレチンのネオマイシンに対する  
有毛細胞保護効果の検討

氏名 眞崎 達也

所属 山口大学大学院医学系研究科

医学専攻 耳鼻咽喉科学

令和6年1月

## 目 次

1. 要旨	1
2. 研究の背景	3
3. 目的	5
4. 方法	6
5. 結果	14
6. 考察	18
7. 結語	23
8. 研究資金	24
9. 謝辞	25
10. 参考文献	26
11. 図表	33
12. 図表の説明	40

## 1. 要旨

背景：前庭有毛細胞は、感染症、虚血、アミノグリコシド系抗菌薬や抗悪性腫瘍剤であるシスプラチン等の特定の治療薬など、さまざまな刺激によって損傷を受けやすい。また、哺乳類では、前庭有毛細胞の損傷は永続的である。

目的：本研究では、成体マウスから採取した卵形嚢を用いて、アミノグリコシド誘発性有毛細胞死に対するノビレチン（NOB）の保護効果を評価した。

方法：CBA/N マウスから摘出した卵形嚢を、NOB の投与量とネオマイシンの投与の有無によって 8 群に分けた。卵形嚢の有毛細胞は、カルモジュリンとカルビンディンによる二重標識で計測した。また、NOB の卵形嚢の有毛細胞保護に対する作用機序を評価するため、4-ヒドロキシ-2-ノネナールおよび 3-ニトロチロシンの産生量を測定した。

結果：ネオマイシンに曝露された卵形嚢の有毛細胞死は、NOB 投与によって抑制された。NOB の投与によって過酸化脂質アルデヒドの最終生成物である 4-ヒドロキシ-2-ノネナールの産生が抑制された一方で、タンパク質の酸化のマーカである 3-ニトロチロシンの産生には影響を与えなかった。

結論：NOB はネオマイシン誘発性有毛細胞死を抑制した。卵形嚢の有毛細胞に対する NOB の保護作用は、活性酸素種の形成阻害に起因する可能性が示唆された。

## 2. 研究の背景

前庭有毛細胞は、感染症[1,2]、虚血[3,4]、アミノグリコシド系抗菌薬[5]や抗悪性腫瘍剤シスプラチン[6,7]などの特定の治療薬等、様々な刺激によって損傷を受けやすいため、有毛細胞保護の発見は重要な課題の一つである。形態学および分子学的指標に基づく様々な研究により、耳毒性薬剤による有毛細胞死はアポトーシスによって引き起こされることが証明されている[8-10]。この理論を裏付ける最も有力な根拠は、シスプラチンおよびアミノグリコシドによる有毛細胞死が、広範なカスパーゼ阻害剤によって抑制されることである[8,10]。アミノグリコシド系抗菌薬や抗悪性腫瘍薬であるシスプラチンなどの耳毒性薬剤は、活性酸素種（ROS）やフリーラジカルを増加させることによって内耳障害を引き起こす[11,12]。そして、我々のグループは抗酸化物質の有毛細胞保護作用に着目し報告を行ってきた[13-17]。

柑橘類には、アスコルビン酸をはじめとする抗酸化作用を有する化合物が含まれている[18,19]。柑橘類の一種であるシークワサーには、ノビレチン（NOB）（5,6,7,8,3',4'-ヘキサメトキシフラボン）が多く含まれ

ている[20]。NOB は、抗炎症作用、抗腫瘍作用、抗酸化作用など様々な薬理作用を有し、脳機能を改善する[21,22]。

### 3. 目的

本研究では、NOB の抗酸化能を評価し、その抗酸化活性を検証した。そして、成体マウス卵形囊におけるネオマイシン (NEO) 誘発有毛細胞死に対する NOB の保護効果を *in vitro* で検討した。また、NEO 誘発有毛細胞死の抑制と NOB 濃度との相関についても検討した。

#### 4. 方法

##### 実験動物

CBA/N マウスは日本エスエルシー（静岡県浜松市）から入手した。すべてのマウス（4-6 週齢）は雄で、正常な Preyer 反射を有していた。すべての実験プロトコールは山口大学動物使用委員会（動物実験プロトコール番号：43-004）の審査と承認を受け、動物は山口大学総合科学実験センター生命科学実験施設で適切に飼育管理された。

##### OXY 吸着試験分析装置を用いた NOB および NEO の抗酸化能の測定

FREE Carrio Duo（ウイスマー、東京都文京区）を用いて OXY 吸着試験を行い、NOB（富士フイルム和光純薬、大阪府大阪市）および NEO（シグマアルドリッチジャパン、東京都目黒区）の抗酸化能を測定した。コントロールとして生理食塩水を用いた。試料 10  $\mu$ L を蒸留水 1mL (1:100 希釈) を入れたチューブに混合して処理した。次に、希釈した試料 10  $\mu$ L を 1mL の HClO に加えて混合し、37°C で 10 分間インキュベートした。HClO は酸化剤として作用し、その吸着量はサンプルの抗酸化能に依存



する。次に、 $10\ \mu\text{L}$  の発色剤（芳香族化合物）を加えて混合し、光度計で吸光度を測定した。吸光度の比較差から試料の酸化吸着能を定量し、抗酸化力を評価した。結果は  $1\text{mL}$  あたりの  $\text{HClO}$  除去量 ( $\mu\text{M HClO}/\text{mL}$ ) で表した。抗酸化能の正常値は、OXY 吸着試験の説明書に  $350\ \mu\text{M}/\text{mL}$  以上と記載されている[23]。NOB、NEO、生理食塩水について各 2 検体を調製し、平均値を算出した。

#### 卵形嚢の器官培養と有毛細胞死の誘導

すべての動物を頸椎脱臼により安楽死させ、直ちに断頭した。側頭骨を無菌的操作で速やかに摘出し、個々の前庭器官を Earle's balanced salt solution（Invitrogen, Carlsbad, CA, USA）を添加した Eagle's medium（Invitrogen, Carlsbad, CA, USA）（2:1、v/v）中で解離させた。卵形嚢は直ちに 5%ウシ胎児血清（コスモ・バイオ、東京都江東区）を添加した培養液に移した。卵形嚢は、NOB の投与量および NEO の投与の有無により、コントロール群（NOB、NEO とともに無投与）、NOB 群（1-、10-、 $100\ \mu\text{M}$  の 3 種類の濃度の NOB）、NEO 群（ $2\text{mM}$  の NEO）、NEO+NOB

群 (1-, 10-, 100  $\mu$  M の NOB+2mM の NEO) の 8 群 (各群 n=6) に割り付けた (表 1)。各卵形嚢を 24 ウェル組織培養プレートに入れ、37°C、5%CO<sub>2</sub>、95%空気環境 (ワケンホールディングス、京都府京都市) で 24 時間培養 (培養液に浸漬させるが、接着させない) した。NEO 溶液は最終濃度 2.0 mM で培養ウェルに添加し、NOB 溶液は NOB 群と NOB+NEO 群ともに最終濃度 1-, 10-, 100  $\mu$  M で培養ウェルに添加した。培養期間終了後、卵形嚢を 4%パラホルムアルデヒド中、25°Cで 2 時間固定した。28G の針と注射器を用いてリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を流して、固定した卵形嚢から耳石を静かに除去した。マウスの耳石は Cunningham の記述に従って処理した[24]。

#### 有毛細胞標識の免疫組織化学

固定後、卵形嚢を 0.4 M PBS で洗浄した。その後、ブロッキング液 (1% ウシ血清アルブミン (シグマアルドリッチジャパン、東京都目黒区)、0.4% ノーマルヤギ血清 (コスモ・バイオ、東京都江東区)、0.4% ノーマルウマ血清 (コスモ・バイオ、東京都江東区)、0.4% トリトン X-100 (片

山化学工業、大阪府大阪市)、PBS) 中で 4°C、8 時間インキュベートした。有毛細胞測定のため、卵形嚢をカルモジュリンに対するマウスモノクローナル抗体 (C3545-.2ML、シグマアルドリッチジャパン、東京都目黒区) とカルビンディンに対するウサギポリクローナル抗体 (ABN2192-100UL、メルク、東京都目黒区) で全層標識した。この二重標識免疫組織化学プロトコールにより、**extrastriolar** (分水嶺外) 領域 (カルモジュリン陽性、カルビンディン陰性) および **striolar** (分水嶺) 領域 (カルモジュリン陽性、カルビンディン陽性) の有毛細胞を分けて計測することが可能となる[8,24]。カルモジュリンとカルビンディンを用いた二重標識法については、Cunningham らにより詳述されている[8]。一次抗体溶液 (カルモジュリン 1:1000、カルビンディン 1:500 のブロッキング溶液) 中に 4°Cで一晩インキュベートした。ブロッキング液で洗浄後、ブロッキング液で希釈した二次抗体で以下のようにインキュベートした：

Alexa 594 ヤギ抗ウサギ IgG (1:1000 ; サーモフィッシュャーサイエンティフィックジャパングループ、東京都港区) および Alexa 488 ヤギ抗マウス IgG (1:500 ; サーモフィッシュャーサイエンティフィックジャパングル

ープ、東京都港区)。卵形嚢を蛍光二次抗体でインキュベートし、ブロッキング液で洗浄後、Fluoromount-G (コスモ・バイオ、東京都江東区) にマウントした。本研究で使用した抗体はすべてマウスに感受性を認めた。

#### 有毛細胞数の測定

卵形嚢を蛍光顕微鏡 (キーエンス、大阪府大阪市) で観察し、有毛細胞の生存率を評価した。マウスでは、I 型および II 型有毛細胞は卵形嚢に一様に分布している [25]。カルモジュリン陽性およびカルビンディン陽性細胞を striolar 領域の有毛細胞として計測し、カルモジュリン陽性およびカルビンディン陰性細胞を extrastriolar 領域の有毛細胞として計測した。標識有毛細胞は、各卵形嚢から無作為に選んだ 8 つの領域 (各卵形嚢の一辺が  $20\ \mu\text{m}$  の正方形) でそれぞれ計測した。4 箇所 striolar 領域の有毛細胞数と 4 箇所 extrastriolar 領域の有毛細胞数を平均して、各卵形嚢の striolar 領域および extrastriolar 領域の外有毛細胞密度を算出した。各実験条件について 6 個の卵形嚢で計測を行った。

有毛細胞における 4-HNE 産生に対する NOB の影響の評価

活性酸素種産生を評価するため、産生された 4-ヒドロキシ-2-ノネナール (4-HNE) の量を測定した。抗 4-HNE モノクローナル抗体 (マウス、MHN-100P、25  $\mu$ g/mL、日研ザイル、東京都文京区) を用いた免疫組織化学を行い、4-HNE の産生と蓄積の程度を調べた。4-HNE は過酸化脂質アルデヒドの最終生成物である。卵形嚢を NOB および NEO の投与の有無により、コントロール群 (NOB、NEO ともに無投与)、NOB 群 (NOB 100  $\mu$ M 投与)、NEO 群 (NEO 2mM 投与)、NEO+NOB 群 (NOB 100  $\mu$ M+NEO 2mM 投与) の 4 群に分けた (表 2)。一次抗体として抗 4-HNE 抗体を使用した。二次抗体には Alexa 488 ヤギ抗マウス IgG (1:500) を使用した。各実験条件について 3 個の卵形嚢を調べた。オープンソースの画像解析ソフトウェアである ImageJ (バージョン 1.53k、National Institutes of Health, Bethesda, Maryland) を用いて、各卵形嚢から無作為に選んだ 6 つの領域 (一辺が 20  $\mu$ m の正方形) の蛍光強度を測定した。ImageJ では、蛍光強度を 0 から 255 までの 256 段階の整数値で表し、値

が大きいほど蛍光強度が高いことを示す。特定の単位はない。測定した各領域の蛍光強度の平均値を算出し、コントロール群のサンプルの平均値を他の群の相対値の算出に用いた。そして算出した相対値を用いて統計解析を行った。

#### 有毛細胞における 3-NT 産生に対する NOB の影響の評価

活性窒素種 (RNS) の産生を評価するため、3-ニトロチロシン (3-NT) の産生量を測定した。抗 3-NT モノクローナル抗体を用いた免疫組織化学を行い、3-NT の産生と蓄積の程度を調べた。3-NT は、ペルオキシナイトライトによるタンパク質のニトロ化の主要な修飾であり、タンパク質の酸化のマーカーである。方法は「有毛細胞における 4-HNE 産生に対する NOB の影響の評価」の項で定義したとおりであるが、以下の点で異なる。一次抗体として抗 3-NT 抗体 (マウス、7A12AF6、1 mg/mL, Abcam plc.、東京都中央区) を使用した。二次抗体として Alexa Fluor 594 ヤギ抗ウサギ IgG (1:1000) および 488Phalloidin (1:1000, ab176753, Abcam plc.、東京都中央区) を使用した。

## 統計解析

すべての統計解析は、R (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, version 4.2.1) のグラフィカル・ユーザー・インターフェースである EZR (XQuartz 2.8.2; xorg-server 1.20.14、自治医科大学附属さいたま医療センター、埼玉県さいたま市) を用いて行った。EZR は R コマンドを改良したもので、生物統計学で頻繁に使用される統計関数を追加するように設計されている。Kruskal-Wallis 検定と Steel-Dwass 法を用いて、以下の評価を行った。

- ・ striolar 領域および extrastriolar 領域における群間での有毛細胞数の有

意差

- ・ 免疫組織化学における 4-HNE 産生に起因する蛍光強度の群間の有意

差

- ・ 免疫組織化学における 3-NT 産生に起因する蛍光強度の群間の有意差

## 5. 結果

### NOB の抗酸化能

フリーラジカル分析装置 FREE Carrio Duo を用いて OXY 吸着試験を行い、NOB と NEO の抗酸化力を評価した。試料は各 2 種類ずつ用意し、平均値を算出した。その結果、NOB には抗酸化能が認められたが、NEO 及び生理食塩水には認められなかった（表 3）。

### 有毛細胞の生存に対する NOB の影響

NOB の有毛細胞への障害の有無を評価するため、有毛細胞をコントロール群と NOB 群（1-、10-、100  $\mu$ M の NOB）に割り付けた。各群を 24 時間培養し、卵形嚢を固定し、カルモジュリンとカルビンディンの二重標識を用いて有毛細胞を計測した。代表的な結果を図 1 と 2 に示す。NOB 群ではコントロール群と比較して有毛細胞数の有意な減少は見られなかった（図 1A、1B、1C、1D、2A、2B、2C、2D）。

### NEO 誘発性有毛細胞死に対する NOB の有毛細胞保護効果



NEO 誘発性有毛細胞死に対する NOB の保護効果を評価するために、細胞を中用量の NEO (2 mM) と様々な用量の NOB (1-, 10-, 100  $\mu$ M の NOB) と共に 24 時間インキュベートした。卵形嚢を固定し、カルモジュリンとカルビンディンの二重標識を用いて有毛細胞数の計測を行った (図 1 及び 2)。extrastriolar 領域では、NEO への曝露は有毛細胞数の減少を引き起こしたが (図 2E)、NOB への曝露では有毛細胞数の減少を引き起こさなかった (図 2B、2C、2D)。また、NEO + NOB 群では、いずれの NOB 濃度でも有毛細胞数の有意な減少は認められなかった (図 2F、2G、2H)。striolar 領域においては、コントロール群と比較して、NEO 群では有毛細胞数の有意な減少が認められた (p 値は 0.0003)。一方、NEO + NOB 群では有毛細胞数の有意な減少は認められなかった (図 1G および 1H)。NEO による有毛細胞死を抑制する効果のあった NOB 濃度は、1-, 10-, 100  $\mu$ M のうち、それぞれ 10  $\mu$ M と 100  $\mu$ M であった。NEO + NOB 群では、NOB 濃度 10  $\mu$ M と 100  $\mu$ M の間では有毛細胞数に有意差はなかった。Kruskal-Wallis 検定および Steel-Dwass 法による統計解析結果を図 1I および図 2I に示す。Kruskal-Wallis 検定では、striolar 領

域、*extrastriolar* 領域ともに  $p < 0.01$  であった。

#### NOB 投与による 4-HNE 産生の抑制

フリーラジカル産生を検出するため、4-HNE に対する抗体を用いて、フリーラジカル代謝産物である 4-HNE の産生量を免疫組織化学的に測定した。代表的な結果を図 3 に示す。NOB 濃度  $100 \mu\text{M}$  で培養したグループでは、4-HNE 量の増加は見られなかった (図 3B)。NEO 濃度  $2 \text{ mM}$  で培養した卵形嚢では 4-HNE を含む有毛細胞を認めたが (図 3C)、NEO 及び NOB を含む培地で培養した卵形嚢では 4-HNE の減少が見られた (図 3D)。各群について 4-HNE の蛍光強度を測定し、コントロール群に対する相対値を算出した。これらの相対値を用いた統計解析を図 4E に示す。この結果は、NEO に曝露された卵形嚢において、NOB がフリーラジカルの形成を阻害したことを示している。4-HNE 由来の蛍光強度は、NEO を含まない培地でインキュベートした卵形嚢よりも、NEO を含む培地でインキュベートした卵形嚢で有意に強かった ( $p$  値は  $0.0002$ )。

## 有毛細胞における 3-NT 産生

RNS の産生を検出するため、タンパク質の酸化マーカーである 3-NT に対する抗体を用いて、免疫組織化学的に 3-NT の産生量を調べた。代表的な結果を図 4 に示す。100  $\mu$ M NOB 及び 2 mM NEO のいずれかもしくは両方を含む培地で培養した群において、3-NT 量の増加は見られなかった (図 4B、4C、4D)。各群について、3-NT 由来の蛍光強度を測定し、コントロール群の蛍光強度との相対値を算出した。これらの相対値を用いた統計解析を図 4E に示す。3-NT に由来する蛍光強度は、コントロール群と比較して、各群間に大きな差はなかった。したがって、NEO または NOB による RNS 産生は確認できなかった。

## 6. 考察

本実験において、NOB が NEO 誘発性有毛細胞死を抑制することを示した。まず OXY 吸着試験を行い、NOB の抗酸化力を測定した。その結果、NOB の抗酸化力は  $722 \mu\text{M}/\text{mL}$  であり、通常の値よりもはるかに高いことを確認した。この結果は NOB に抗酸化力が有していることを示しており、この結果をもとに、NOB を含む培地での卵形嚢器官培養を行い、NOB が有毛細胞に障害を与えるのか、あるいは NEO による酸化ストレスから有毛細胞を保護するのかを評価した。マウス卵形嚢培養を用いる利点は以下の通りである：(1) 有毛細胞がヒトと前庭が類似する哺乳類由来であること、(2)有毛細胞を含む組織を比較的簡便な手技で安定的に培養できること、(3)有毛細胞を培養液に溶解することにより、評価対象の薬剤に直接曝露できること[24]。そこで、NOB を培養液に溶解し、有毛細胞を曝露することにより、NOB の有毛細胞に対する保護効果を確認することとした。検討した濃度では、NOB は有毛細胞を障害しなかった。一方、NOB 濃度が  $1 \mu\text{M}$  から  $100 \mu\text{M}$  (NEO の投与なし) に上昇すると、有意差はないものの、I 型有毛細胞密度が低下する傾向が見られ

た。NEO を投与していない NOB 群のうち、NOB100 群はエラーバーが広がったが、有毛細胞密度の分布はコントロール群と同等であった。一方、卵形嚢を NEO を含む NOB で培養した場合、NOB はアミノグリコシド誘発の有毛細胞死に対して有毛細胞の保護効果を示した。striolar 領域では、 $1\mu\text{M}$  の NOB では明らかな保護効果は認められなかったが、 $10\mu\text{M}$  と  $100\mu\text{M}$  の NOB では保護効果が認められた。このことは、I 型有毛細胞に対する保護効果は濃度依存的であったが、高濃度の NOB は I 型有毛細胞にダメージを与える可能性を示唆している。したがって、I 型有毛細胞を最適な濃度で NOB に曝露することが重要である。しかし、 $10\mu\text{M}$  と  $100\mu\text{M}$  の NOB の間に有意差は見られなかったことから、至適濃度はまだ特定されていない。extrastriolar 領域では、NEO と NOB で培養した群と NEO のみで培養した群の間に有意差は見られなかった。しかし、NEO 群ではコントロール群と比較して有意な減少が認められた (p 値 0.016) が、NEO と NOB で培養した群では有意な差は認められなかった。このことは、II 型有毛細胞に対する NOB の保護効果の傾向を示唆している。この結果からは、NOB の最適濃度は  $100\mu\text{M}$  以上である

可能性が示唆された。I型有毛細胞とII型有毛細胞で、NOBの有毛細胞保護効果の程度が異なる理由として、NEOに対する各細胞の感受性の違いが考えられる。I型有毛細胞はII型有毛細胞よりも、アミノグリコシド系抗生物質などの耳毒性物質による損傷を受けやすい。これは、I型有毛細胞はII型有毛細胞と比較して、投与後に優先的に薬剤を取り込むためである[26]。本研究では、I型有毛細胞がII型有毛細胞よりもNEOによって強く損傷されたことで、striolar領域の有毛細胞とextrastriolar領域の有毛細胞に対するNOBの保護効果に差が生じたと考えられる。

次に、NOBの抗酸化作用のメカニズムを解明するため、フリーラジカル代謝産物である4-HNEに対する抗体を用いて免疫組織化学を行った。4-HNEは、リノール酸やアラキドン酸などのn-6系不飽和脂肪酸から生成され、脂質過酸化反応の最終生成物である。4-HNEはタンパク質や核酸との反応性が高く、細胞毒性が強いため、酸化ストレスに伴う組織損傷の主な原因物質のひとつと考えられている[27,28]。アミノグリコシド系抗菌薬に曝露した有毛細胞では、4-HNEの濃度が上昇していることが確認されており、4-HNEの除去がアミノグリコシド系抗菌薬による細胞死

から有毛細胞を保護していることが示唆されている[15,17]。本研究では、アミノグリコシド系抗菌薬に曝露した卵形嚢では、4-HNE に由来する強い蛍光反応が認められたが、100  $\mu$  M の NOB で培養した群では、4-HNE の増加は認められなかった。さらに、NEO 及び NOB で培養した卵形嚢では、4-HNE の減少が観察された。これらの結果は、NEO に曝露した卵形嚢において、NOB は活性酸素の産生を促進せず、抑制したことを示している。また、3-NT は、スーパーオキシドと一酸化窒素 (NO) が反応してペルオキシナイトライトを生成し、このペルオキシナイトライトがタンパク質のチロシン残基をニトロソ化することで酸化ストレスが生じる[29,30]。そこで、タンパク質のニトロソ化修飾である抗 3-NT 抗体を用いて免疫組織化学を行い、RNS の産生を評価した。本研究において、3-NT に由来する蛍光強度は、コントロール群と比較して群間で有意差は認めなかった。したがって、NEO または NOB による NO 産生を確認することはできなかった。

活性酸素の産生は、アミノグリコシドによって誘発される有毛細胞障害の重要なメディエーターである[31]。本研究でも同様に、有毛細胞を NEO

に曝露することで活性酸素が産生された。一方、NEO とともに NOB を投与すると、活性酸素の産生が抑制された。以上よりアミノグリコシド誘発性有毛細胞死からの有毛細胞の保護は、NOB による活性酸素産生の抑制に起因すると考えられる。

これらのデータは、NOB の抗酸化作用が有毛細胞保護に有用であることを示し、有毛細胞死の予防や回復のための治療法開発の可能性を高めた。一方、NOB を含む培地での卵形嚢器官培養は、生理的な NOB の投与経路とは異なることから、これが本研究の限界といえる。したがって、本研究の結果を検証するためには、*in vivo* での実験が不可欠である。皮膚に対する NOB の有効性を評価する臨床試験はすでに始まっている（UMIN000031265：シークワサー由来のノビレチン高純度エキスの肌への有効性確認予備検討試験）。投与方法や投与期間、投与量、内耳移行性などを *in vivo* で評価することで、有毛細胞保護の臨床応用につながる可能性がある。



## 7. 結語

本研究の結果は、NOB が NEO 誘発性有毛細胞死を抑制するという仮説を支持するものである。アミノグリコシド誘発性有毛細胞死からの有毛細胞保護の原理は、NEO に曝露された卵形嚢における活性酸素の産生を NOB が阻害すると考えられた。また、NOB の有毛細胞に対する保護効果は濃度依存的である可能性が示唆された。内耳における NOB の有効性に関する今後の *in vivo* 実験では、NOB の内耳への移行能力や、全身的な副作用の有無を評価する必要がある。

## 8. 研究資金

本研究は、文部科学省科学研究費補助金（20K09733）の支援を受けて行われた。

## 9. 謝辞

本研究を行うにあたり丁寧に御指導いただきました山口大学大学院医学系研究科耳鼻咽喉科学教授山下裕司先生に深謝いたします。

## 10. 参考文献

- [1] Tsuprun, V., Keskin, N., Schleiss, M.R., Schachern, P. and Cureoglu, S.: Cytomegalovirus-induced pathology in human temporal bones with congenital and acquired infection. *Am J Otolaryngol*, **40**: 102270, 2019.
- [2] Hızlı, Ö., Hızlı, P., Kaya, S., Monsanto Rda, C., Paparella, M.M. and Cureoglu, S.: Histopathologic ear findings of syphilis: a temporal bone study. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, **273**: 2443-2449, 2016.
- [3] Sasaki, A., Matsubara, A., Tabuchi, K., Hara, A., Namba, A., Yamamoto, Y. and Shinkawa, H.: Immunoelectron microscopic analysis of neurotoxic effect of glutamate in the vestibular end organs during ischemia. *Acta Otolaryngol*, **132**: 686-692, 2012.
- [4] Mizutani, K., Fujioka, M., Nakagawa, S., Fujii, M., Ogawa, K. and Matsunaga, T.: Balance dysfunction resulting from acute inner ear energy failure is caused primarily by vestibular hair cell damage. *J Neurosci Res*, **88**: 1262-1272, 2010.

- [5] Duckert, L.G. and Rubel, E.W.: Morphological correlates of functional recovery in the chicken inner ear after gentamycin treatment. *J Comp Neurol*, **331**: 75-96, 1993.
- [6] Baker, T.G., Roy, S., Brandon, C.S., Kramarenko, I.K., Francis, S.P., Taleb, M., Marshall, K.M., Schwendener, R., Lee, F.S. and Cunningham, L.L.: Heat shock protein-mediated protection against Cisplatin-induced hair cell death. *J Assoc Res Otolaryngol*, **16**: 67-80, 2015.
- [7] Callejo, A., Durochat, A., Bressieux, S., Saleur, A., Chabbert, C., Domènech Juan, I., Llorens, J. and Gaboyard-Niay, S.: Dose-dependent cochlear and vestibular toxicity of trans-tympanic cisplatin in the rat. *Neurotoxicology*, **60**: 1-9, 2017.
- [8] Cunningham, L.L., Cheng, A.G. and Rubel, E.W.: Caspase activation in hair cells of the mouse utricle exposed to neomycin. *J Neurosci*, **22**: 8532-8540, 2002.

- [9] Lang, H. and Liu, C.: Apoptosis and hair cell degeneration in the vestibular sensory epithelia of the guinea pig following a gentamicin insult. *Hear Res*, **111**: 177-184, 1997.
- [10] Matsui, J.I., Ogilvie, J.M. and Warchol, M.E.: Inhibition of caspases prevents ototoxic and ongoing hair cell death. *J Neurosci*, **22**: 1218-1227, 2002.
- [11] Henderson, D., Bielefeld, E.C., Harris, K.C. and Hu, B.H.: The role of oxidative stress in noise-induced hearing loss. *Ear Hear*, **27**: 1-19, 2006.
- [12] Rybak, L.P., Whitworth, C.A., Mukherjea, D. and Ramkumar, V.: Mechanisms of cisplatin-induced ototoxicity and prevention. *Hear Res*, **226**: 157-167, 2007.
- [13] Takemoto, T., Sugahara, K., Okuda, T., Shimogori, H. and Yamashita, H.: The clinical free radical scavenger, edaravone, protects cochlear hair cells from acoustic trauma. *Eur J Pharmacol*, **487**: 113-116, 2004.
- [14] Arai, T., Sugahara, K., Mikuriya, T., Miyauchi, Y., Hirose, Y., Hashimoto, M., Shimogori, H. and Yamashita, H.: The free radical scavenger edaravone protects hair cells against aminoglycoside toxicity. *Bull Yamaguchi Med School*, **55**: 15-20, 2008.

- [15] Sugahara, K., Hirose, Y., Mikuriya, T., Hashimoto, M., Kanagawa, E., Hara, H., Shimogori, H. and Yamashita, H.: Coenzyme Q10 protects hair cells against aminoglycoside. *PLoS One*, **9**: e108280, 2014.
- [16] Hirose, Y., Sugahara, K., Kanagawa, E., Takemoto, Y., Hashimoto, M. and Yamashita, H.: Quercetin protects against hair cell loss in the zebrafish lateral line and guinea pig cochlea. *Hear Res*, **342**: 80-85, 2016.
- [17] Kobayashi, Y., Sugahara, K., Takemoto, Y., Tsuda, J., Hirose, Y., Hashimoto, M. and Yamashita, H.: Protective effect of astaxanthin nanoemulsion on mammalian inner ear hair cells. *PeerJ*, **11**: e15562, 2023.
- [18] Zou, Z., Xi, W., Hu, Y., Nie, C. and Zhou, Z.: Antioxidant activity of Citrus fruits. *Food Chem*, **196**: 885-896, 2016.
- [19] Wang, Y., Liu, X.J., Chen, J.B., Cao, J.P., Li, X. and Sun, C.D.: Citrus flavonoids and their antioxidant evaluation. *Crit Rev Food Sci Nutr*, **62**: 3833-3854, 2022.
- [20] Kawaii, S., Tomono, Y., Katase, E., Ogawa, K. and Yano, M.: Quantitation of flavonoid constituents in citrus fruits. *J Agric Food Chem*, **47**: 3565-3571, 1999.

- [21] Murakami, A., Nakamura, Y., Torikai, K., Tanaka, T., Koshiba, T., Koshimizu, K., Kuwahara, S., Takahashi, Y., Ogawa, K., Yano, M., Tokuda, H., Nishino, H., Mimaki, Y., Sashida, Y., Kitanaka, S. and Ohigashi, H.: Inhibitory effect of citrus nobiletin on phorbol ester-induced skin inflammation, oxidative stress, and tumor promotion in mice. *Cancer Res*, **60**: 5059-5066, 2000.
- [22] Nakajima, A., Aoyama, Y., Nguyen, T.T.L., Shin, E.J., Kim, H.C., Yamada, S., Nakai, T., Nagai, T., Yokosuka, A., Mimaki, Y., Ohizumi, Y. and Yamada, K.: Nobiletin, a citrus flavonoid, ameliorates cognitive impairment, oxidative burden, and hyperphosphorylation of tau in senescence-accelerated mouse. *Behav Brain Res*, **250**: 351-360, 2013.
- [23] Trotti, R., Carratelli, M., Barbieri, M., Micieli, G., Bosone, D., Rondanelli, M. and Bo, P.: Oxidative stress and a thrombophilic condition in alcoholics without severe liver disease. *Haematologica*, **86**: 85-91, 2001.
- [24] Cunningham, L.L.: The adult mouse utricle as an in vitro preparation for studies of ototoxic-drug-induced sensory hair cell death. *Brain Res*, **1091**: 277-281, 2006.

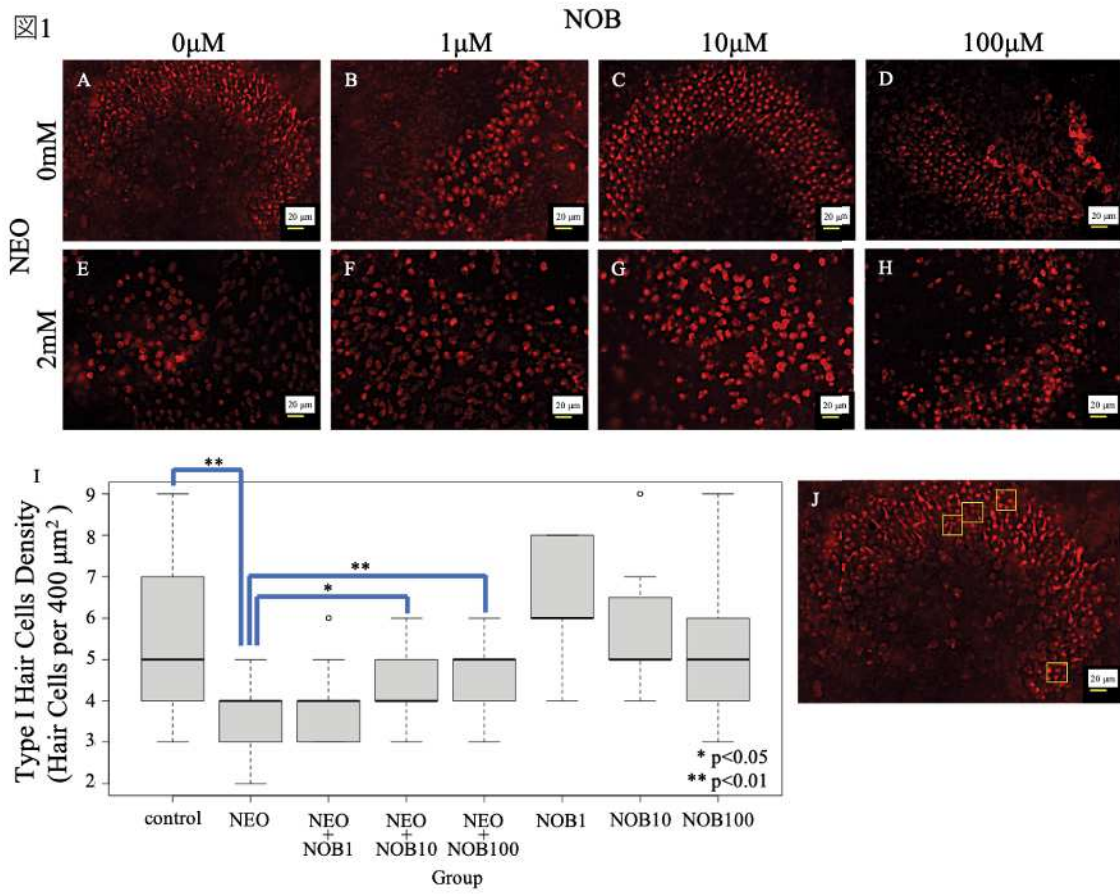


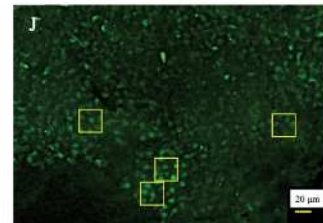
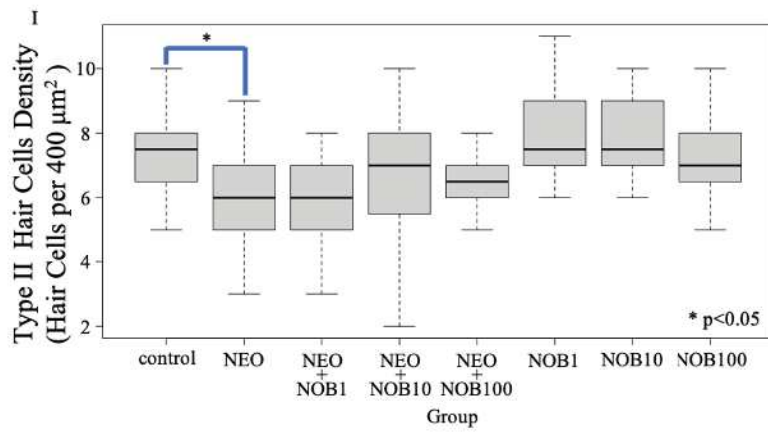
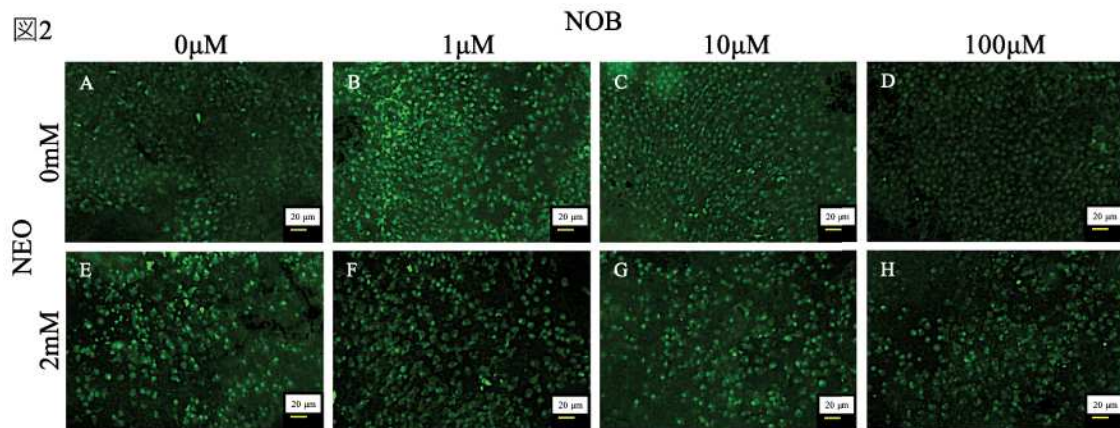
- [25] Desai, S.S., Zeh, C. and Lysakowski, A.: Comparative morphology of rodent vestibular periphery. I. Saccular and utricular maculae. *J Neurophysiol*, **93**: 251-266, 2005.
- [26] Lopez, I., Honrubia, V., Lee, S.C., Schoeman, G. and Beykirch, K.: Quantification of the process of hair cell loss and recovery in the chinchilla crista ampullaris after gentamicin treatment. *Int J Dev Neurosci*, **15**: 447-461, 1997.
- [27] Chen, Q., Cai, Y., Zhu, X., Wang, J., Gao, F., Yang, M., Mao, L., Zhang, Z. and Sun, B.: Edaravone dexborneol treatment attenuates neuronal apoptosis and improves neurological function by suppressing 4-HNE-associated oxidative stress after subarachnoid hemorrhage. *Front Pharmacol*, **13**: 848529, 2022.
- [28] Valentovic, M.A., Ball, J.G., Brown, J.M., Terneus, M.V., McQuade, E., Van Meter, S., Hedrick, H.M., Roy, A.A. and Williams, T.: Resveratrol attenuates cisplatin renal cortical cytotoxicity by modifying oxidative stress. *Toxicol. In Vitro*, **28**: 248-257, 2014.

- [29] Bandoowala, M. and Sengupta, P.: 3-Nitrotyrosine: a versatile oxidative stress biomarker for major neurodegenerative diseases. *Int. J. Neurosci.*, **130**: 1047-1062, 2020.
- [30] Jomova, K., Vondrakova, D., Lawson, M. and Valko, M.: Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Mol Cell Biochem*, **345**: 91-104, 2010.
- [31] Hirose, K., Hockenbery, D.M. and Rubel, E.W.: Reactive oxygen species in chick hair cells after gentamicin exposure in vitro. *Hear Res*, **104**: 1-14, 1997.

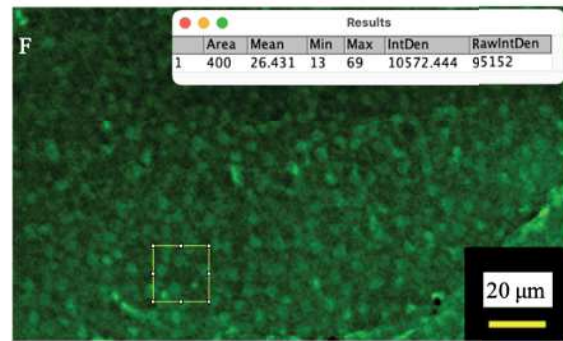
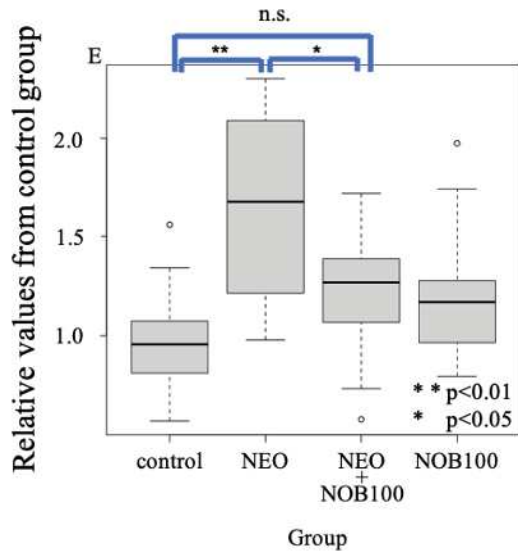
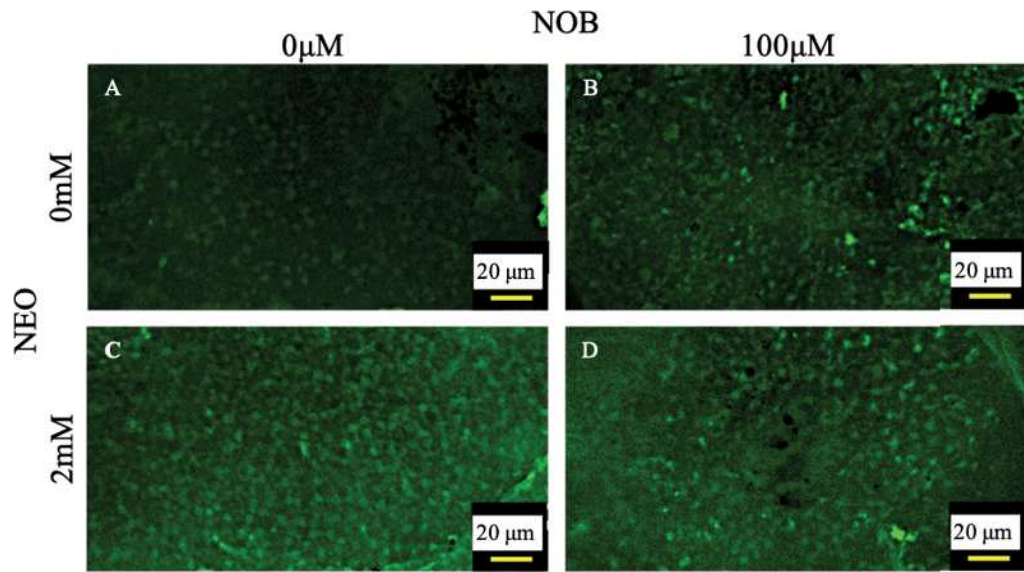
この論文は *Medical Science & Innovation* に掲載予定の *Nobiletin Protects Hair Cells against Neomycin-induced Vestibular Hair Cell Death* から引用したものである。

11. 図表

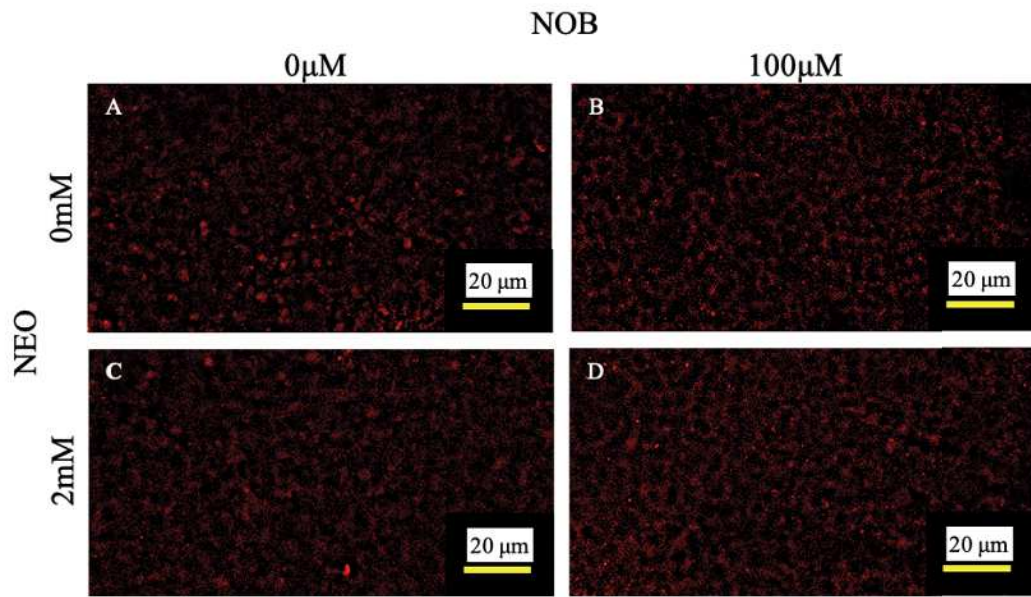




3



☒4



Relative values from control group

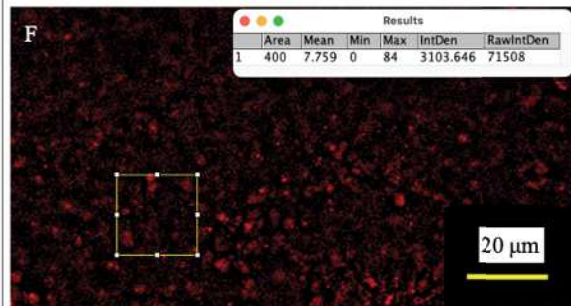
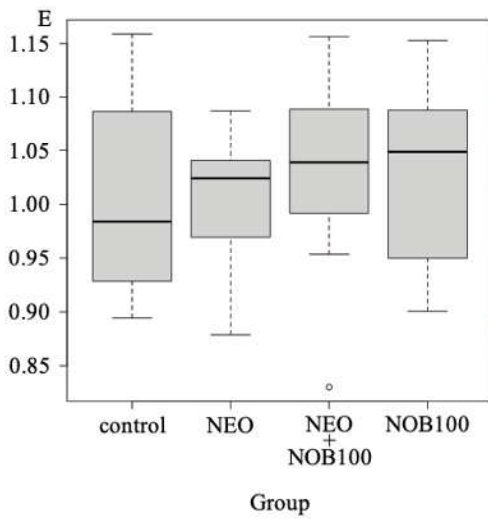


表1

		NOB			
		0M	1 $\mu$ M	10 $\mu$ M	100 $\mu$ M
NEO	0M	Control group	NOB 1 $\mu$ M group	NOB 10 $\mu$ M group	NOB 100 $\mu$ M group
	2mM	NEO group	NEO + NOB 1 $\mu$ M group	NEO + NOB 10 $\mu$ M group	NEO + NOB 100 $\mu$ M group

表2

		NOB	
		0M	100 $\mu$ M
NEO	0M	Control group	NOB 100 $\mu$ M group
	2mM	NEO group	NEO + NOB 100 $\mu$ M group



表3

( $\mu\text{M}/\text{mL}$ )	sample1	sample2	Average antioxidant capacity
saline	-35	-43	-39
NOB	722	722	722
NEO	145	182	163.5

## 12. 図表の説明

図 1. カルビンディンに対するモノクローナル抗体を用いた免疫染色の顕微鏡所見及び統計解析結果。

有毛細胞をコントロール群 (A : NOB 及び NEO とともに投与なし) 、NOB 群 (NOB のみ投与、B :  $1 \mu\text{mol}$ 、C :  $10 \mu\text{mol}$ 、D :  $100 \mu\text{mol}$ ) 、NEO 群 (E :  $2\text{mM}$  の NEO を投与) 、NEO+NOB 群 ( $2\text{mM}$  の NEO に加えて F : NOB を  $1 \mu\text{M}$ 、G : NOB を  $10 \mu\text{M}$ 、H : NOB を  $100 \mu\text{M}$  投与) で処理し、24 時間培養した。パネル I は統計解析の結果である ( $n=24$ 、各群 6 つの卵形嚢から 4 領域を抽出) 。細胞を抗カルビンディン抗体 (赤色) で標識し、striolar 領域を評価した。各卵形嚢から無作為に選んだ領域 (一辺が  $20 \mu\text{m}$  の正方形) で、標識有毛細胞を計測した (J) 。 NEO への曝露は striolar 領域の有毛細胞の減少を引き起こしたが、NOB への曝露では認めなかった。NEO+NOB 群では、NEO 群と比較して有毛細胞数の減少に有意差が認められた。NEO+NOB 群では、NOB 濃度  $10 \mu\text{M}$  と  $100 \mu\text{M}$  の間で有毛細胞数に有意差はなかった。スケールバーは  $20 \mu\text{m}$ 。アスタリスクは統計的有意性を示す (Kruskal-Wallis 検定  $*p<0.05$ ) 。

図 2. カルモジュリンに対するモノクローナル抗体を用いた免疫染色の顕微鏡所見及び統計解析結果。

有毛細胞をコントロール群 (A : NOB 及び NEO とともに投与なし) 、NOB 群 (NOB のみ投与、 B :  $1 \mu\text{mol}$ 、 C :  $10 \mu\text{mol}$ 、 D :  $100 \mu\text{mol}$ ) 、 NEO 群 (E :  $2\text{mM}$  の NEO を投与) 、 NEO+NOB 群 ( $2\text{mM}$  の NEO に加えて F : NOB を  $1 \mu\text{M}$ 、 G : NOB を  $10 \mu\text{M}$ 、 H : NOB を  $100 \mu\text{M}$  投与) で処理し、 24 時間培養した。パネル I は統計解析の結果である (n=24、各群 6 つの卵形嚢から 4 領域を抽出) 。これらの細胞を抗カルモジュリン抗体 (緑色) で標識し、 **extrastriolar** 領域を評価した。各卵形嚢から無作為に選んだ領域 (一辺が  $20 \mu\text{m}$  の正方形) で、標識有毛細胞を計測した (J) 。

NEO への曝露は有毛細胞の **extrastriolar** 領域の減少を引き起こす一方で、 NOB への曝露では認めなかった。また、 NEO+NOB 群では、いずれの NOB 濃度でも有毛細胞数の有意な減少は観察されなかった。スケールバーは  $20 \mu\text{m}$ 。アスタリスクは統計的有意性を示す (Kruskal-Wallis 検定 \* $p < 0.05$  および \*\* $p < 0.01$ ) 。

図 3. 4-HNE 産生に伴う蛍光強度の変化とその統計解析。

コントロール群 (A : NOB 及び NEO とともに投与なし) 、NOB 群 (B : 100  $\mu$  M の NOB) 、NEO 群 (C : 2mM の NEO) 、NEO+NOB 群 (D : 100  $\mu$  M の NOB+2mM の NEO) の 4 群に分けた卵形嚢を 12 時間インキュベートした。各群において、4-HNE 由来の蛍光強度を測定してコントロール群に対する相対値を算出し、統計解析を行った (E、n=18、各群 3 つの卵形嚢から 6 領域を抽出) 。有毛細胞の蛍光強度は、各卵形嚢から無作為に選んだ 6 つの領域 (一辺が 20  $\mu$  m の正方形) のそれぞれで評価した (F) 。NEO 群では 4-HNE の増加を認めたが、NEO+NOB 群では 4-HNE の増加は認められなかった。そのため、蛍光強度は NEO+NOB 群の卵形嚢よりも NEO 群の卵形嚢で有意に強かった。スケールバーは 20  $\mu$  m。アスタリスクは統計的有意性を示す (Kruskal-Wallis 検定 \*p<0.05 および\*\*p<0.01) 。

図 4. 3-NT 産生に伴う蛍光強度の変化とその統計解析。

コントロール群 (A : NOB 及び NEO とともに投与なし) 、NOB 群 (B : 100  $\mu$  M の NOB) 、NEO 群 (C : 2mM の NEO) 、NEO+NOB 群 (D : 100  $\mu$  M の NOB+2mM の NEO) の 4 群に分けた卵形嚢を 12 時間インキュベートした。各群において、3-NT 由来の蛍光強度を測定してコントロール群に対する相対値を算出し、統計解析を行った (E、n=18、各群 3 つの卵形嚢から 6 領域を抽出) 。有毛細胞の蛍光強度は、各卵形嚢から無作為に選んだ 6 つの領域 (一辺が 20  $\mu$  m の正方形) のそれぞれで評価した (F) 。3-NT に由来する蛍光強度は、いずれの群もコントロール群と比較して有意差を認めなかった。スケールバーは 20  $\mu$  m (Kruskal-Wallis 検定) 。

表 1. NOB 及び NEO の濃度に応じて卵形嚢を 8 群に振り分けた。

表 2. 有毛細胞における 4-HNE 産生を評価するため、卵形嚢を NOB 及び NEO の投与濃度によって 4 群に振り分けた。

表 3. OXY 吸着試験の結果。正常な抗酸化力は  $350 \mu\text{M/mL}$  以上である

[23]。