

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09696

研究課題名（和文）機能性食品による抗酸化、免疫賦活化作用を介した聴覚障害予防の試み

研究課題名（英文）Attempts to prevent hearing impairment by antioxidant and immunostimulatory effects of functional foods

研究代表者

小川 洋（Ogawa, Hiroshi）

福島県立医科大学・公私立大学の部局等・教授

研究者番号：70264554

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：マウスを用いて、聴覚障害に対する機能性食品の効能を解析した。Lactococcus lactis 1119B1、Lactobacillus acidophilus、Lactobacillus delbrueckii bulgaricus、Bifidobacterium lactisの乳酸菌がマウスの加齢性難聴を予防することができるか評価した。今回用いた乳酸菌4種の死菌には加齢性難聴の発症を予防する効果は認められないと考える。しかしながら、ABRおよび蝸牛組織においては軽減効果が確認できることから、生菌であれば免疫賦活化作用が加わることで老人性難聴の発症予防効果が期待できるものと思われる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢化社会において聴覚障害は社会活動の低下を招く大きな要因の一つであり、その予防法、対策方法が求められている。われわれが今回行った食品による聴覚障害予防効果とその作用機序を抗酸化、免疫賦活化、腸内細菌叢改善などの視点から解析し、老人性難聴の病態生理の解明ならびに予防法を提案することは老人性難聴の新たな予防法の開発につながり、難聴に伴う社会活動低下を軽減できる点で大きく貢献できるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：We analyzed the effects of functional foods on hearing impairment using mice. We evaluated whether Lactococcus lactis 1119B1, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus delbrueckii bulgaricus, and Bifidobacterium lactis can prevent age-related hearing loss in mice. We believe that the four killed lactic acid bacteria used in this study have no effect in preventing the onset of age-related hearing loss. However, since a mitigating effect was confirmed in ABR and cochlear tissue, it is expected that viable bacteria can be expected to prevent the onset of presbycusis by adding an immunostimulatory effect

研究分野：耳科学

キーワード：老人性難聴 難聴予防 機能性食品 抗酸化作用 腸内細菌叢

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

老人性難聴の原因の一つに炎症や肥満などによる酸化ストレスが有毛細胞や蝸牛らせん神経節の神経細胞を傷害することが報告されている。一方われわれは今までの先天性サイトメガロウイルス感染による聴覚障害の研究から、感染によって形成されるインフラマソームの活動が有毛細胞のミオシンVIを消失させることが聴覚障害に関係することを明らかにしてきた。これらの研究の共通点として、酸化ストレスや免疫の異常が聴覚障害の背景に存在することを示すものである。この共通点に着目し、乳酸菌の抗酸化、免疫賦活化作用によって聴覚障害の予防・改善が可能か否かをマウスの先天性サイトメガロウイルス感染系、老人性難聴の系を使って解析し、その作用機序、ひいては疾患の病態生理を明らかにすることで、広く聴覚障害の予防法となりうるのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

本研究は、ウイルス感染と老化という全く異なる病因の難聴に着目し、その共通点から乳酸菌などの機能性食品を用いた聴覚障害の予防を目指すものである。その成果を社会に還元しやすい身近な食品を取り上げ、聴覚障害の予防をアウトカムに、酸化ストレス軽減と免疫脳活性化を両立する食品をマウスの実験系で証明する。その一例として、ヨーグルトやチーズの発酵に用いられている *Lactococcus lactis* について研究を進める。このような乳酸菌などの食品の聴覚障害予防効果とその作用機序を抗酸化、免疫賦活化、腸内細菌叢改善などの視点から解析し、先天性CMV感染や老人性難聴の病態生理の解明ならびに予防法を提案することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 使用動物

48匹の24週齢雌性C57BL/6Jマウスを24週齢対照群(24w Con)、48週齢対照群(48w Con)、*L. lactis* 1119B1群(B1)、*L. acidophilus*群(acid)、*L. bulgaricus*群(bulgaricus)、*B. lactis*群(*B. lactis*)の計6群、8匹ずつに分けて飼育した。飼育期間は24週齢から48週齢までの6か月間とした。対照群飼料はCE-2を使用し、乳酸菌特殊飼料はCE-2に0.05%死菌粉末を混ぜて作製した。

#### (2) 聴性脳幹反応検査(ABR検査)

24、36、48週齢時点で右耳の聴覚閾値をABR検査によって評価した。ABR検査は麻酔下で行い、8、16、24kHzの各周波数のトーンバースト音を100dBから20dBまで5dBずつ音圧を下げていき、波が消失した直前の音圧をその周波数での聴覚閾値とした。

#### (3) フローサイトメトリーによる免疫老化の評価

48週齢でのABR測定後に、脾臓およびパイエル板を摘出し、シングルセル懸濁液を調製しフローサイトメトリーを用いて免疫老化を評価した。抗体はCD4-FITC、CD8-Pacific Blue、CD62L-APC、CD44-PEを使用してナイーブT細胞(CD62L high、CD44 low)と活性化メモリーT細胞(CD62L low、CD44 high)の割合を測定した。制御性T細胞はCD4-FITC、CD25-PE、FoxP3-APC抗体を用いて評価した。

#### (4) 蝸牛の病理学的検討

蝸牛標本にHE染色および免疫組織化学染色を行い、残存らせん神経節数の比較を行った。免疫組織化学染色では、TUBB3抗体を使用して神経細胞を染色した。

### 4. 研究成果

#### (1) マウスの体重、組織重量、摂餌量への影響

24、36、48週齢における体重および摂餌量には、群間に差は見られなかった。組織重量では、24週齢と48週齢で比較すると体重当たりの胸腺重量割合は低下し、加齢に伴う胸腺萎縮が確認できた。胸腺萎縮に対する乳酸菌飼料摂取の影響は見られなかった(図1)。

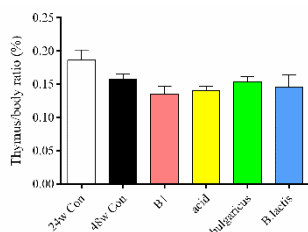


図1 各群における体重当たりの胸腺重量割合

(2) 聴覚閾値上昇への影響

24、36、48 週齢において各周波数（8、16、24 kHz）の聴覚閾値を評価した（図 2）。24 から 48 週齢にかけて各周波数で聴覚閾値の上昇が確認できた。乳酸菌飼料摂取によって、16 kHz では有意に聴覚閾値の上昇が抑制され、8、24 kHz では有意差はないものの聴覚閾値の上昇が軽減していた。しかしながら、菌種による差は見られなかった。

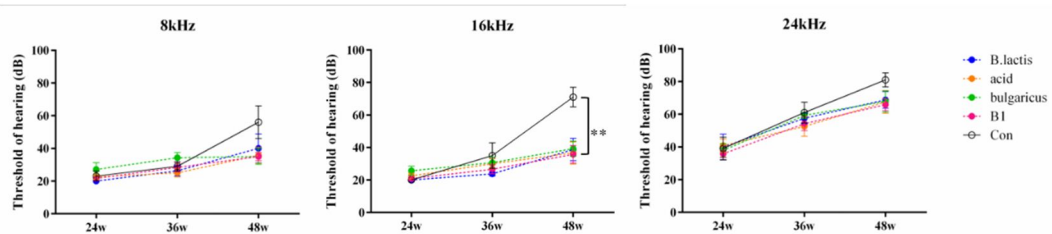


図 2 乳酸菌飼料摂取による聴覚閾値上昇への影響

(3) T細胞サブセットへの影響

24 から 48 週齢にかけて免疫老化の指標となるナイーブ T 細胞の減少とメモリー T 細胞の増加が確認できた（図 3）。48 週齢においてナイーブおよびメモリー T 細胞の変動は乳酸菌摂取による影響を受けなかった。一方で、制御性 T 細胞においては 24 から 48 週齢にかけて増加がみられたが、B1 群、bulgaricus 群、B. lactis 群では対照群とは逆に減少しており、acid 群では対照群よりも増加していた。

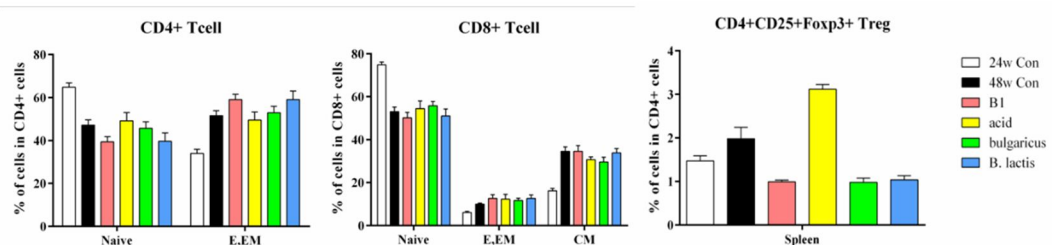


図 3 乳酸菌飼料摂取による T 細胞サブセットへの影響

(4) 蝸牛らせん神経節への影響

聴覚閾値上昇に相関して（8 kHz=頂回転、16 kHz=中回転、24 kHz=基底回転）24 から 48 週齢にかけて蝸牛らせん神経節の脱落が確認できた（図 4）。乳酸菌飼料摂取によって中、頂回転ではらせん神経節の脱落が軽減していることが確認できた。

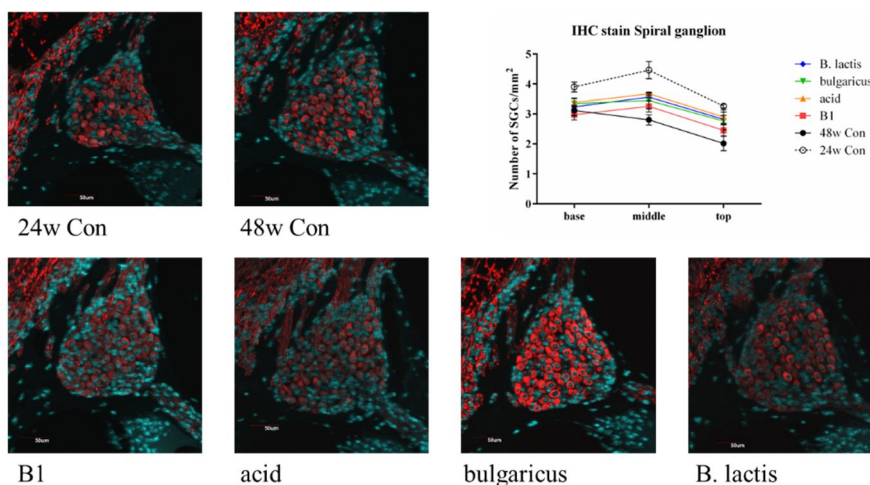


図 4 乳酸菌飼料摂取による蝸牛らせん神経節への影響

考察

本研究では、C57BL/6J マウスを使用して老人性難聴の発生を乳酸菌飼料摂取によって予防できるか明らかにし、その機序を検討した。今回明らかになったことは、ABR 測定によって、16 kHz の聴覚閾値の上昇を乳酸菌飼料摂取によって有意に抑制できることが明らかになった。他の周波数では有意な効果は認められなかった。乳酸菌飼料は免疫老化の進行を抑

制できなかったが、制御性 T 細胞に影響を及ぼし、その発現を制御することが示唆された。

蝸牛らせん神経節の脱落は乳酸菌摂取によって軽減したが、その差は有意ではなかった。

これらの結果から、今回用いた乳酸菌 4 種の死菌には加齢性難聴の発症を予防する効果は認められないと考える。しかしながら、ABR および蝸牛組織においては軽減効果が確認できることから、生菌であれば免疫賦活化作用が加わることで老人性難聴の発症予防効果が期待できるものと思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                        | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                  | 備考 |
|-------|--|--|----|
| 研究分担者 | 錫谷 達夫<br><br>(Suzutani Tatsuo)<br><br>(40196895) | 福島県立医科大学・医学部・教授<br><br><br><br>(21601) |    |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|         |         |