

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 17 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462548

研究課題名(和文) エッセンシャルオイルの耳科領域応用への基礎的研究

研究課題名(英文) Application of Essential Oils for middle ear and inner ear diseases.

## 研究代表者

榎尾 明憲 (Kashio, Akinori)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20451809

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：内耳障害および中耳炎に対するエッセンシャルオイルの有用性について基礎的な研究を行った。内耳培養系においてアミノ配糖体を用いた内耳障害モデルを作成し、クローブ・オルガノ・ゼラニウムの有毛細胞障害軽減について検討したところ、硫酸カナマイシンによる短期間での障害モデルでは効果を認めただが、ゲンタマイシンによる長期間障害モデルでは効果は認められなかった。マウス音響外傷モデルに対してローズマリー・シトラスの含有するUVLockを投与したところ有意に音響外傷の抑制を認め細胞の障害も軽減することができた。PMAを用いた中耳炎症モデルに対してオルガノを投与したところ炎症性血球成分の遊走軽減を確認できた。

研究成果の概要(英文)：We have investigated the possibility to apply the Essential oil as a therapeutic drug for inner ear diseases or middle ear diseases. Using the cochlear organotypic cultures, we have shown that Clove, Organo and Geranium prevent hair cell loss caused by kanamycin sulfate in a short term. However, we could not find any protective effect when we apply Gentamicin sulfate for long term. We have also shown that Uvlock, which includes Rosemary and Citrus, prevented the mice from noise induced hearing loss and hair cell damage. Next we made otitis media model with PMA and investigated if Organo could prevent middle ear inflammation. The ear which was give Organo showed less inflammation blood cell components compared to the control. These results suggests that Essential oil can be a promising drug for inner and middle ear disease.

研究分野：耳科学

キーワード：エッセンシャルオイル アミノ配糖体 音響外傷 内耳障害 中耳炎

## 1. 研究開始当初の背景

「エッセンシャル・オイル」は植物に含まれる揮発性の有機化合物の総称である。一般的には、アロマテラピーに用いられることで知られるが、近年では科学的な研究アプローチから多剤耐性菌を含めた抗菌・抗真菌作用(Martinez MJ et al 1996, Khan MS et al 2011, Elaissi A et al 2012)、バイオフィーム形成予防作用(Khan MS et al 2012)といった報告が認められるようになってきた。さらには、神経保護作用(Amantea D, Corasaniti MT et al 2007)、紫外線による活性酸素に対するスカベンジャー作用(Jeong JB et al 2009)、腫瘍細胞に対するアポトーシス亢進作用(Pathania AS 2013 et al)なども報告され、エッセンシャル・オイルの生物に対する強力な生理作用が明らかにされつつある。これら生理学的作用は耳科領域疾患への応用が可能と考えられるが、これまで、エッセンシャル・オイルの耳科領域への応用はほとんどない。耳科領域の中心的疾患である慢性中耳炎・外耳炎に対する局所投与薬剤で、処方可能なものは現在数種類と極めて限られており、近年は薬剤耐性菌の増加も伴い、加療に苦慮する難治症例が数多く発生してきている。そのため、ブロー氏液・ゲンチアナバイオレット(ピオクタニン)など古来の薬剤の有用性が近年再認識されるに至り、新たな治療法の開発が急務となっている。また、突発性難聴、騒音性難聴や老人性難聴などの内耳疾患は、近年の研究で活性酸素の発生に伴う蝸牛有毛細胞やらせん神経節細胞のアポトーシスが中心的な役割を果たしていることが分かってきており、解明された作用機序をもとに薬剤の発掘がなされている段階である

## 2. 研究の目的

1. エッセンシャルオイルの抗酸化作用に着目し、アミノ配糖体または音響外傷に伴う内耳障害の予防効果を検討する。

エッセンシャルオイルクローブ・ゼラニウム・オルガノを用いて内耳有毛細胞培養系においてアミノ配糖体による有毛細胞障害の予防が可能かを検討する。In vivoで騒音曝露に対してシトラス/ローズマリー含有のUVlockの難聴予防について検討する。

2. エッセンシャルオイルによる中耳炎症の予防効果について検討する。

エッセンシャルオイルにおいて抗炎症作用を有するクローブ・ゼラニウム・オルガノを用いてPMAによる中耳障害の予防効果を検討する。

## 3. 研究の方法

### 1-1. 蝸牛培養実験(短期)

エッセンシャル投与下、内耳有毛細胞のアミノ配糖体に対する傷害性の比較

P2 幼若 ICR マウスを用い蝸牛、コルチ器を摘出培養を行った。コントロール(溶媒のみ)硫酸カナマイシン(KM)+エッセンシャルオイル(クローブ・ゼラニウム・オルガノ)投与群そしてKMのみ投与群の3群に分けて24時間の細胞培養を行った。エッセンシャルオイル投与群では溶媒内のエッセンシャルオイルが下記濃度になるように投与した。エッセンシャルオイルを溶解するためにアセトン(0.5%)を使用した。

クローブ投与群 2ml/l(高用量)

ゼラニウム投与群 0.2ml/l(高用量)

オルガノ投与群 0.4ml/l(高用量)

投与量は0.5%アセトンに可溶できる量を予備実験で検討し決定した。

培養後ホルマリンにて固定、ロダミン・ファロイジンにて染色を行い顕微鏡下に生存有毛細胞をカウントした。

### 1-2. 蝸牛培養実験(長期)

P2 幼若 ICR 蝸牛コルチ器を摘出し、GM・エッセンシャルオイル投与下で72時間培養した場合の効果を検討した。1-1でアセトンの影響が可能性として考えられたため、溶媒をエタノール0.5%に変更した。そのため投与するエッセンシャルオイルも下記のように変更となった。

クローブ投与群 0.05ml/l

ゼラニウム投与群 0.025ml/l

オルガノ投与群 0.05ml/l

蝸牛摘出後16時間上記濃度のエッセン洗車るオイルを添加し、GM(20uM)投与下に72時間培養した。

培養後ホルマリンにて固定、ロダミン・ファロイジンにて染色を行い顕微鏡下に生存有毛細胞をカウントした。

### 1-3. Uvlockの検討

生後2週間のC57BL6マウスにUvlock(Sunsolit社)を90mg/lの水溶液として騒音曝露2日前より投与し、120dB4時間の騒音曝露を行った場合の聴力回復について検討を行った。コントロールは通常水を投与した。聴力はABR2,4,8,16kHzのトーンバーストABRで暴露前、曝露翌日、1週間後、2週間後で評価し閾値変化を検討した。

## 3. 中耳炎予防効果の検討

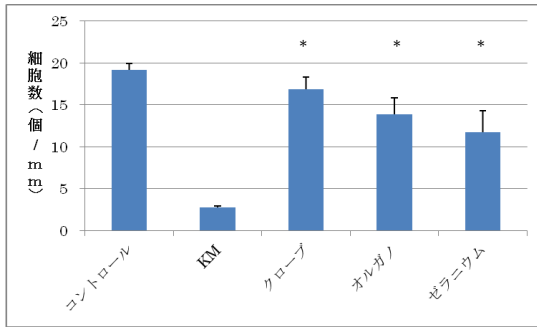
250g雄白色モルモットを使用し中耳骨包小穿孔を加え、PMA(Phorbol 12-Myristate 13-acetate)をアセトンを用いて4%に希釈し、20ul投与した。3時間後に中耳内を洗浄後オルガノ液40ulを投与した。(コントロールは溶媒のアセトン投与)48時間後断頭中耳

の病理組織像を比較した。

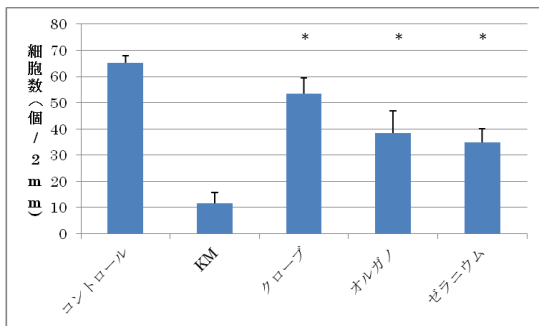
#### 4. 研究成果

##### 1-1. 蝸牛培養実験（短期）

内有毛細胞・外有毛細胞ともに、エッセンシャルオイルの投与により KM による細胞障害の軽減を認めた。一方でウロキナーゼインヒビター（UPAI）を投与した場合は KM による細胞障害の軽減は認められなかった。

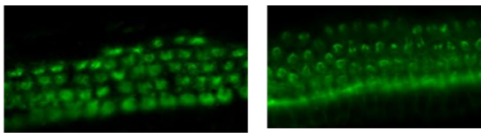


内有毛細胞カウント (\*<p,0.01 対 KM)



外有毛細胞カウント (\*<p,0.01 対 KM)

ただし、もっとも効果的に細胞数の軽減を認めたクローブについても外有毛細胞で特に聴毛の不正を認められていた。長期的な経過作用をみる必要があると考え 1-2 の研究を行った。



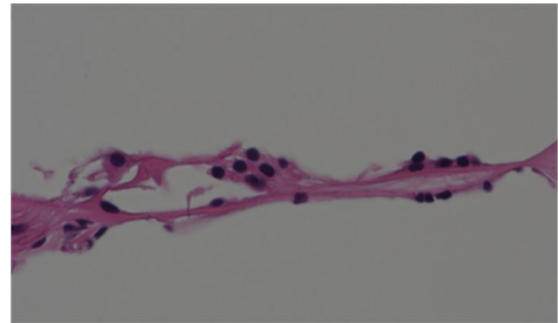
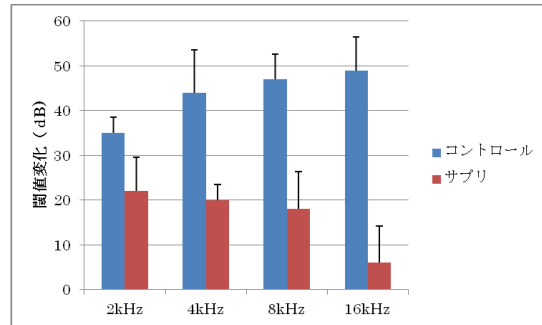
クローブ有毛細胞 コントロール

##### 1-2. 蝸牛培養実験（長期）

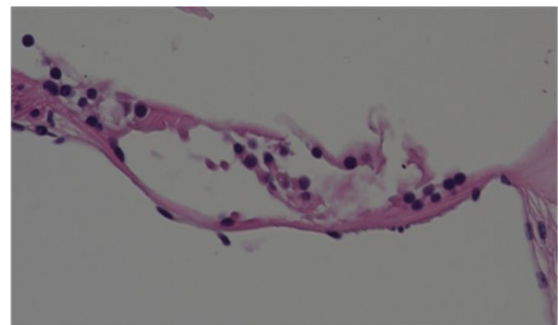
GM 投与群では外有毛細胞の著明な消失と内有毛細胞の部分脱出を認めた。一方エッセンシャルオイル投与群においても同様の結果であり、長期的な培養では有毛細胞障害の予防効果は確認できなかった。今後 GM の投与量またはエッセンシャルオイルの濃度等を変化させることでその効果を再確認してゆく必要がある。

##### 1-3 UVlock の効果

音響曝露後 2 週間後の閾値変化をみるとコントロール群では角周波数 30 dB ~ 50 dB の域値上をきたすのに対してサブリ投与群では 20 dB 程度の閾値上昇に抑えられていた。蝸牛有毛細胞の障害もコントロールと比べて軽度であった。このことはローズマリー・シトラス含有 Uvlock が音響外傷に伴う難聴・有毛細胞障害を予防することを示唆している。



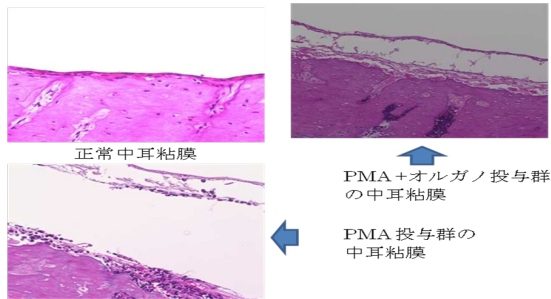
Uvlock 投与群



コントロール群

#### 2. エッセンシャルオイルによる中耳炎予防効果

中耳病理組織でコントロールは上皮粘膜剥脱を認め、血球細胞の浸潤が認められるのに対して、オルガノ投与群では粘膜下層の血球細胞の浸潤が軽減していた。ただし、上皮粘膜はコントロール同様剥奪していた。今回投与後長期経過を追ったがオルガノ投与群においても中耳炎の治癒は認められず、炎症刺激が強すぎた可能性が示唆される。今後その他の中耳炎モデルで検証を行ってゆく予定である。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

1. Koyama, **Kashio A**, Sakata A, Tsutsumiuchi K, Matsumoto Y, Karino S, Kakigi A, Iwasaki S, Yamasoba T. The Hearing Outcomes of Cochlear Implantation in Waardenburg Syndrome. *Biomed Res Int.* 2016;2854736.
2. **Kashio A**, Tejani VD, Scheperle RA, Brown CJ, Abbas PJ. Exploring the Source of Neural Responses of Different Latencies Obtained from Different Recording Electrodes in Cochlear Implant Users. *Audiol Neurootol.* 21(3):141-9, 2016
3. Kamogashira T, Akamatsu Y, **Kashio A**, Ogata E, Karino S, Kakigi A, Iwasaki S, Yamasoba T. Development of auditory skills after cochlear implantation in children with inner ear malformations. *Acta Otolaryngol.* 136(1):78-82, 2016
4. Suzuki M, Sakamoto T, **Kashio A**, Yamasoba T. Age-related morphological changes in the basement membrane in the stria vascularis of C57BL/6 mice. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 273(1):57-62, 2016
5. **Kashio A**, Sakamoto T, Karino S, Kakigi A, Iwasaki S, Yamasoba T. Predicting round window niche visibility via the facial recess using high-resolution computed tomography. *Otol Neurotol.* 2015 Jan;36(1):e18-23.
6. Urata S, **Kashio A**, Sakamoto T, Kakigi A, Yamasoba T. Novel repair of stapedial footplate defect associated with

recurrent meningitis. *Otol Neurotol.* 35(9):1592-5, 2014

7. Sakamoto T, Kikkawa YS, Kikuta S, Kinoshita M, Ueha R, Suzukawa K, **Kashio A**, Kakigi A, Ito K, Suzuki M, Yamasoba T. Favorable prognostic factors for long-term postoperative hearing results after canal tympanoplasty for congenital aural stenosis. *Otol Neurotol.* 35(6):966-71, 2014
8. Ichikawa K, **Kashio A**, Mori H, Ochi A, Karino S, Sakamoto T, Kakigi A, Yamasoba T. A new computed tomography method to identify meningitis-related cochlear ossification and fibrosis before cochlear implantation. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 150(4):646-53, 2014

〔学会発表〕(計 4 件)

1. **樫尾明憲**, 狩野章太郎他 ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子によるアミノ配糖体に対する内耳障害予防作用の検討 日本耳科学会総会 2016年10月8日~10日 長野国際21(長野県・長野市)
2. **Akinori Kashio**, Kazuo Yasuhara et al, Antioxidant supplementation prevents cochlear damage induced by chronic application of germanium dioxide. ARO 2016年2月20日~24日 San Diego (USA)
3. **樫尾明憲**・山嵜達也 酸化ゲルマニウム投与によるミトコンドリア障害モデルマウスの難聴とその予防 第16回日本抗加齢医学会総会 2016年6月10日~12日 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
4. **Akinori Kashio** Age related hearing loss, Mechanism and prevention 13<sup>th</sup> Asia-Oceania ORL-HNS Congress 2015年2月19日~22日 台北(台湾)

〔年よ〕(計 2 件)

1. **樫尾明憲** 山嵜達也. 小児の人工内耳のエビデンスは? EBM耳鼻咽喉科・頭頸部外科の治療 2015-2016 池田勝久他編 中外医学社 P90-95, 2015
2. **樫尾明憲** 山嵜達也. 蝸牛神経管狭窄等の蝸牛神経欠損・低形成症例における人工内耳手術の有効性 耳鼻咽喉科イノベーション - 最新の治療・診断・疾患概念 小林俊光他編 中山書店, P89-91

2015

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榎尾 明憲 (KASHIO AKINORI)  
東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号： 20451809