

学位論文（博士）

カルシウム代謝異常が
ゼブラフィッシュの耳石形成に及ぼす影響について

氏名 岩本 文

所属 山口大学大学院医学系研究科

医学専攻 耳鼻咽喉科学講座

令和6年1月

目 次

(1) 要旨	1
(2) はじめに	2
(3) 方法	3-5
(4) 結果	6
(5) 考察	7-8
(6) 結語	9
(7) 参考文献	10-14
(8) 図表	15-18
(9) 図表の説明	19-21

(1) 要旨

良性発作性頭位めまい症（BPPV）は、末梢性めまい疾患の中で最も一般的な疾患である。閉経後の女性に発症しやすく、骨粗鬆症との関連が示唆されている。耳石は主に炭酸カルシウムで構成されているため、女性ホルモン低下に伴うカルシウム代謝異常が、耳石の脱落しやすさに関連している可能性がある。しかし、その明確な関連性や詳細な機序は現在のところ不明である。本研究では、カルシウム代謝異常を引き起こす薬剤（カドミウムとデキサメタゾン）がゼブラフィッシュ幼生の耳石形成に及ぼす影響を検討した。その結果、カドミウム投与群では耳石が顕著に縮小し、幼生のカルシウム含量も著しく減少した。しかし、デキサメタゾン投与群ではカルシウム含量は減少したにもかかわらず、耳石は増大した。この結果は、骨と同様に、耳石が内リンパ液中のカルシウム濃度に応じて溶解と再結晶を繰り返し、恒常性を維持していることを示唆している。

(2) はじめに

良性発作性頭位めまい症（BPPV）は、耳石脱落に起因するヒトのめまいの最も一般的な原因のひとつである¹⁾⁴⁾。これまでの研究から、エストロゲンレベルが低下した閉経後の女性は、特に BPPV に罹患しやすいことが示されている¹⁾⁵⁾⁻¹⁰⁾。エストロゲンレベルの低下は骨カルシウム代謝に影響を及ぼし、骨量減少や骨粗鬆症を引き起こす¹¹⁾¹²⁾。耳石は主に炭酸カルシウムで構成されているため¹³⁾⁻¹⁵⁾、カルシウム代謝異常は耳石の脱落にも関与している可能性が考えられる。しかし、耳石におけるカルシウム代謝の詳細なメカニズムは現在のところ不明である。

本研究では、カルシウム代謝異常を引き起こす薬剤（カドミウムおよびステロイドの一種であるデキサメタゾン）が、ゼブラフィッシュ幼生の耳石形成に及ぼす影響について検討した¹⁶⁾。ゼブラフィッシュはヒトのように球形嚢と卵形嚢に相当する 2 つの耳石器（sacculle、utricle）をもち、また薬剤スクリーニングに適した動物モデルである。

(3) 方法

全ての実験は山口大学にて実施した。29°Cに保たれた水槽内において野生型AB系統のゼブラフィッシュを飼育し、成魚の雌雄を交配させて得られた受精卵を採取した。受精卵を29°Cの胚培地（1 mM MgSO₄, 120 mM KH₂PO₄, 74 mM Na₂HPO₄, 1 mM CaCl₂, 500 mM KCl, 15 mM NaCl, 500 mM NaHCO₃ in dH₂O）を満たしたシャーレ内で生育し、実験に用いた。実験プロトコールは、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（No.43-007）、動物の愛護及び管理に関する法律、実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準を遵守した。

薬剤曝露

耳石は受精後初日にすでに形態学的に同定される。またゼブラフィッシュは2日目または3日目に卵から孵化するため、薬剤投与は2日目から開始した。ゼブラフィッシュ幼生を20µmol/Lの塩化カドミウム（Cl[Cd]Cl、99.99%微量金属基準；Sigma Aldrich, St. Louis, MO）、デキサメタゾン（Sigma Aldrich, St. Louis, MO）、対照群としてジメチルスルホキシド（DMSO）の溶液にそれぞれ曝露し、5日目と8日目で固定した。また、濃度による耳石形態変化の違いについて解析するため、3種類の濃度のカドミウム溶液（20 µmol/L、40 µmol/L、100 µmol/L）とデキサメタゾン溶液（20 µmol/L、40 µmol/L、100 µmol/L）も用意した。

観察と測定

顕微鏡観察

ゼブラフィッシュ幼生を4%PFAで一晩固定し、1%KOHと1.5% H_2O_2 で8~9分間脱色した。PBSで10分間ずつ3回洗浄した後、アリザリンレッドS (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) で染色した。アリザリンは金属基に結合し、骨分化細胞や石灰化細胞に沈着したカルシウムを赤色に染色する。10分間洗浄した後、RapiClear 1.47 (SunJin Lab Co., Hsinchu City, Taiwan) を用いて顕微鏡用スライドに封入した。オールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-X810, KEYENCE, Osaka, Japan) にて、Plan Apochromat 20x 対物レンズ (NA0.75, BZ-PA20, KEYENCE, Osaka, Japan) を用いてゼブラフィッシュの背側から耳石を観察した。BZ-X Analyzer ソフトウェア (BZ-H4A, KEYENCE, Osaka, Japan) の Measurement Application (BZ-H4M, KEYENCE, Osaka, Japan) を用いて耳石の面積を測定した。

カルシウム濃度の測定

骨量を測定する代わりに、ゼブラフィッシュ幼生全体を溶解してカルシウム濃度を測定した。受精後8日目の各群100匹の幼生を強塩酸 (35%、11.2mol、500 μ L) で溶解し、60°Cで150分間加熱した。ボルテックス後、室温で30分間静置した。4°Cで10分間遠心後、得られた上清50 μ lを450 μ lの水に加え、1molの水酸化ナトリウムでpHを中和した (pH2 \geq)。

吸光度を測定してカルシウム濃度を算出し、4回の測定値を平均して幼生1匹あたりのカルシウム量を算出した。測定にはMetallo Assay Calcium LS (OCPC) キット (Metallogenics Co., Ltd., Chiba, Japan) を用いた。

統計学的解析

対照群と薬剤投与群間の有意差はt検定を用いて評価した。統計解析はすべてMicrosoft Excel for Mac version 16を用いて行った。統計的差異は $p < 0.05$ を有意とみなし、データは対照群と薬剤投与群各6匹の平均値 \pm 標準偏差 (s.d.) で示した。

(4) 結果

カドミウム投与群の耳石は、5日目および8日目において、utricle と saccule の両方で対照群のものより有意に小さかった (** $P < 0.001$, $n=6$) (Fig.1A-C)。さらに、異なるカドミウム濃度 (20 $\mu\text{mol/L}$ 、40 $\mu\text{mol/L}$ 、100 $\mu\text{mol/L}$) で比較すると、8日目においてカドミウム濃度が高いほど耳石が小さくなる傾向がみられた ($n=6$) (Fig. 2A-C)。一方、デキサメタゾン投与群では、5日目および8日目のいずれにおいても、耳石は対照群と比較して有意に大きかった (* : $P < 0.05$ *** : $P < 0.001$, $n=6$)。saccule では有意差は認められなかったが ($n=6$)、8日目では対照群と比較して耳石がわずかに大きくなる傾向が見られた (Fig. 3A-C)。デキサメタゾン投与群でも異なる濃度 (20 $\mu\text{mol/L}$ 、40 $\mu\text{mol/L}$ 、100 $\mu\text{mol/L}$) で比較を試みたが、高濃度になると死亡したため評価困難であった。

アリザリンによる染色を行った結果、デキサメタゾン投与群は対照群と比較して、耳石が不均一で粗造に染色されていた。カドミウム投与群は、対照群やデキサメタゾン投与群に比べ、さらに不均一で粗造であった (Fig. 4A)。デキサメタゾン投与群の幼生1匹あたりのカルシウム濃度は対照群の82%であった (Fig. 4B)。一方、カドミウム投与群のカルシウム濃度は対照群の41%で、より減少していた (Fig. 4C)。

(5) 考察

本研究により、ゼブラフィッシュの耳石はカドミウム投与により用量依存的に小さくなること、幼生中のカルシウム含量はカドミウム投与量が多いほど減少することが示された。この結果は、過去の報告とほぼ同様である。さらに、カルシウム補充試験では、カルシウム含量が増加するのに対し、カドミウム含量は減少することも報告されている¹⁷⁾¹⁸⁾。つまりゼブラフィッシュにおいては、カドミウムがカルシウムと競合的に作用してカルシウムの取り込みを阻害すると考えられる。このことは、 CaCO_3 の沈着が阻害されることによって耳石の成長が妨げられ、耳石が小さくなるという結果につながった可能性を示唆している¹⁵⁾。一方、デキサメタゾン投与群では、幼生中のカルシウム含量はカドミウム投与群と同様に对照群より低かったが、耳石は増大していた。またアリザリン染色において、耳石は不均一で粗造に染色されていた。過去の報告によると、両側卵巣摘出(OVX)ラットにおいて、耳石が大きく密度が低い様子が観察されている¹⁹⁾²⁰⁾。さらに、ストレプトマイシンに曝露されたモルモットでも、耳石の肥大が報告されている²¹⁾²²⁾。これらは、内リンパ液中のカルシウム濃度が低下すると、恒常性を維持するために耳石が溶解と再結晶化を繰り返すことによって生じるのではないかと考えられている。本研究の結果も同様に、このような過程によって密度の低い大きな耳石が形成された可能性が考えられる。

動物モデルを用いた耳石器に関する研究は散見されるが²³⁾⁻²⁵⁾、今回我々がゼブラフィッシュを用いたのにはいくつかの理由がある。第一に、ゼブラフィッシュは繁殖が容易で、複数の個体を同時に薬剤曝露することができる²⁶⁾²⁷⁾。第二に、ゼブラフィッシュにはヒトと同

様に半規管があり、**sacculle** と **utricle** という 2 つの耳石器がある。ヒトと違って蝸牛はなく、**sacculle** で聴覚を、**utricle** で平衡感覚を受容するといわれている。ゼブラフィッシュは骨の研究モデルとしても広く用いられており、グルココルチコイド誘発性骨粗鬆症 (GIOP) モデルも存在する²⁸⁾。本研究における薬剤投与群のゼブラフィッシュも、GIOP モデルに類似したモデルといえる。薬剤投与群の耳石形態に変化が見られたことから、骨粗鬆症患者の耳石にも何らかの変化が起きている可能性は十分にある。

ただ本研究には、いくつかの限界もあった。ゼブラフィッシュは耳石研究における優れた動物モデルであるが、ヒトとは異なる点が複数存在するため、その結果をヒトに応用することは容易ではない。例えば、ゼブラフィッシュには耳石膜がないため、耳石と有毛細胞が直接相互作用する。耳石膜上に無数の耳石を持つ哺乳類とは異なり、ゼブラフィッシュの耳石は各耳石器に 1 つずつしかない。さらに、哺乳類では骨量や骨密度を測定することは比較的容易だが、ゼブラフィッシュ幼生では困難であった。このため、本研究では幼生全体を溶解してカルシウム濃度を測定することで代用しており、骨の局所的な評価はできていない。

(6) 結語

カルシウム代謝異常の病態生理は、骨量減少だけでなく耳石形成にも影響を及ぼす。ゼブラフィッシュの耳石は哺乳類の耳石とは構造的に異なるが、カルシウム代謝異常と耳石との関係を観察するにはシンプルで有用なモデルである。将来的にはさらにサンプル数を増やし、骨粗鬆症治療薬の影響や、耳石の形態変化が結果的に脱落しやすさにつながるかといった点をより詳細に評価する必要がある。

(7) 参考文献

- 1) Von Brevern, M., Radtke, A., Lezius, F., Feldmann, M., Ziese, T., Lempert, T. and Neuhauser, H.: Epidemiology of benign paroxysmal positional vertigo: a population based study. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 78: 710-15, 2007.
- 2) Labuguen, R.H.: Initial evaluation of vertigo. *American family physician*, 73: 244-51, 2006.
- 3) Bhattacharyya, N., Gubbels, S.P., Schwartz, S.R., Edlow, J.A., El-Kashlan, H., Fife, T., Holmberg, J.M., Mahoney, K., Hollingsworth, D.B. and Roberts, R.: Clinical practice guideline: benign paroxysmal positional vertigo (update). *Otolaryngology Head and Neck Surgery*, 156: S1-S47, 2017.
- 4) Kitahara, T., Ota, I., Horinaka, A., Ohyama, H., Sakagami, M., Ito, T., Shiozaki, T., Wada, Y. and Yamanaka, T.: Idiopathic benign paroxysmal positional vertigo with persistent vertigo/dizziness sensation is associated with latent canal paresis, endolymphatic hydrops, and osteoporosis. *Auris Nasus Larynx*, 46: 27-33, 2019.
- 5) Baloh, R.W., Honrubia, V. and Jacobson, K.: Benign positional vertigo: clinical and oculographic features in 240 cases. *Neurology*, 37: 371-78, 1987.

- 6) Li, S., Wang, Z., Liu, Y., Cao, J., Zheng, H., Jing, Y., Han, L., Ma, X., Xia, R. and Yu, L.: Risk factors for the recurrence of benign paroxysmal positional vertigo: a systematic review and meta-analysis. *Ear, Nose & Throat Journal*, 101: NP112-NP34, 2022.
- 7) Yamanaka, T., Shirota, S., Sawai, Y., Murai, T., Fujita, N. and Hosoi, H.: Osteoporosis as a risk factor for the recurrence of benign paroxysmal positional vertigo. *The Laryngoscope*, 123: 2813-16, 2013.
- 8) Jang, Y.S. and Kang, M.-K.: Relationship between bone mineral density and clinical features in women with idiopathic benign paroxysmal positional vertigo. *Otology & Neurotology*, 30: 95-100, 2009.
- 9) Agrawal, Y., Ward, B.K. and Minor, L.B.: Vestibular dysfunction: prevalence, impact and need for targeted treatment. *Journal of Vestibular Research*, 23: 113-17, 2013.
- 10) Yu, S., Liu, F., Cheng, Z. and Wang, Q.: Association between osteoporosis and benign paroxysmal positional vertigo: a systematic review. *BMC neurology*, 14: 110, 2014.
- 11) Parham, K., Leonard, G., Feinn, R.S., Lafreniere, D. and Kenny, A.M.: Prospective clinical investigation of the relationship between idiopathic benign paroxysmal positional vertigo and bone turnover: a pilot study. *The Laryngoscope*, 123: 2834-39, 2013.

- 12) Vibert, D., Kompis, M. and Häusler, R.: Benign paroxysmal positional vertigo in older women may be related to osteoporosis and osteopenia. *Annals of Otology, Rhinology & Laryngology*, 112: 885-89, 2003.
- 13) Xu, Y., Zhang, H., Yang, H., Zhao, X., Lovas, S. and Lundberg, Y.W.: Expression, functional, and structural analysis of proteins critical for otoconia development. *Developmental Dynamics*, 239: 2659-73, 2010.
- 14) Lundberg, Y.W., Xu, Y., Thiessen, K.D. and Kramer, K.L.: Mechanisms of otoconia and otolith development. *Developmental Dynamics*, 244: 239-53, 2015.
- 15) Talaat, H.S., Abuhadied, G., Talaat, A.S. and Abdelaal, M.S.S.: Low bone mineral density and vitamin D deficiency in patients with benign positional paroxysmal vertigo. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 272: 2249-53, 2015.
- 16) Umemura, T. and Wako, Y.: Pathogenesis of osteomalacia in itai-itai disease. *Journal of Toxicologic Pathology*, 19: 69-74, 2006.
- 17) Han, J., Liu, K., Wang, R., Zhang, Y. and Zhou, B.: Exposure to cadmium causes inhibition of otolith development and behavioral impairment in zebrafish larvae. *Aquatic Toxicology*, 214: 105236, 2019.

- 18) Green, A.J., Wall, A.R., Weeks, R.D., Mattingly, C.J., Marsden, K.C. and Planchart, A.: Developmental cadmium exposure disrupts zebrafish vestibular calcium channels interfering with otolith formation and inner ear function. *NeuroToxicology*, 96: 129-39, 2023.
- 19) Yang, L., Xu, Y., Zhang, Y., Vijayakumar, S., Jones, S.M. and Lundberg, Y.W.: Mechanism underlying the effects of estrogen deficiency on otoconia. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology*, 19: 353-62, 2018.
- 20) Nishihara, E., Okada, M., Kiyoi, T., Shudou, M., Imai, Y. and Hato, N.: Evaluation of the structure of the otoconial layer using micro-computed tomography. *Auris Nasus Larynx*, 47: 734-39, 2020.
- 21) Zhang, D.M., Takumida, M. and Harada, Y.: Incorporation of tetracycline into otoconia of the guinea-pig following streptomycin intoxication. *Acta otolaryngologica*, 116: 812-16, 1996.
- 22) Takumida, M., Zhang, D.M., Yajin, K. and Harada, Y.: Formation and fate of giant otoconia of the guinea pig following streptomycin intoxication. *Acta otolaryngologica*, 117: 538-44, 1997.
- 23) Takemura, T., Sakagami, M., Nakase, T., Kubo, T., Kitamura, Y. and Nomura, S.: Localization of osteopontin in the otoconial organs of adult rats. *Hearing research*, 79: 99-104, 1994.

- 24) Kang, Y.J., Stevenson, A.K., Yau, P.M. and Kollmar, R.: Sparc protein is required for normal growth of zebrafish otoliths. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology*, 9: 436-51, 2008.
- 25) Vibert, D., Sans, A., Kompis, M., Travo, C., Mühlbauer, R.C., Tschudi, I., Boukhaddaoui, H. and Häusler, R.: Ultrastructural changes in otoconia of osteoporotic rats. *Audiology and Neurotology*, 13: 293-301, 2008.
- 26) Ou, H.C., Santos, F., Raible, D.W., Simon, J.A. and Rubel, E.W.: Drug screening for hearing loss: using the zebrafish lateral line to screen for drugs that prevent and cause hearing loss. *Drug discovery today*, 15: 265-71, 2010.
- 27) 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. *Hearing Research*, 342: 80-85, 2016.
- 28) Lin, W.Y., Dharini, K. K., Peng, C.H., Lin, C.Y., Yeh, K.T., Lee, W.C., and Lin, M.D.: Zebrafish models for glucocorticoid-induced osteoporosis. *Tzu-Chi Medical Journal*, 34: 373-80, 2022.

この論文は *Medical Science & Innovation* に掲載予定の *Effect of Defective Calcium Metabolism on Otolith Formation in Zebrafish* から引用したものである。

(8) 図表

Fig. 1

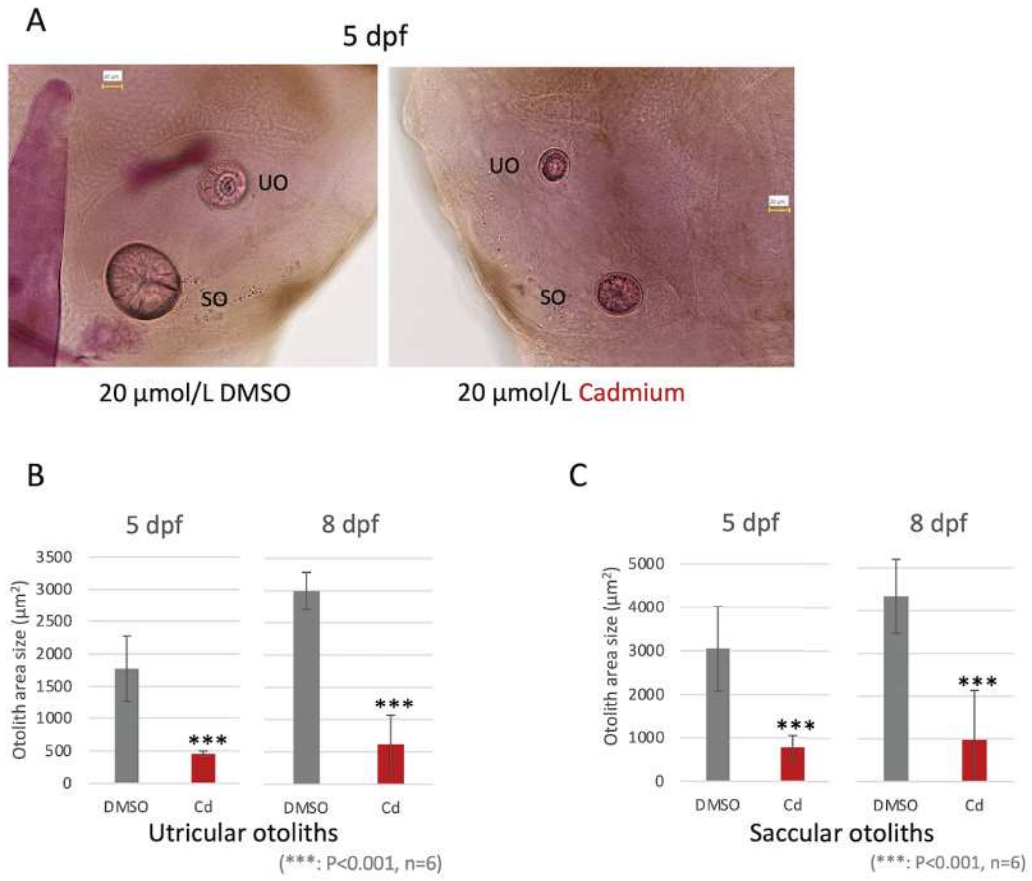


Fig. 2

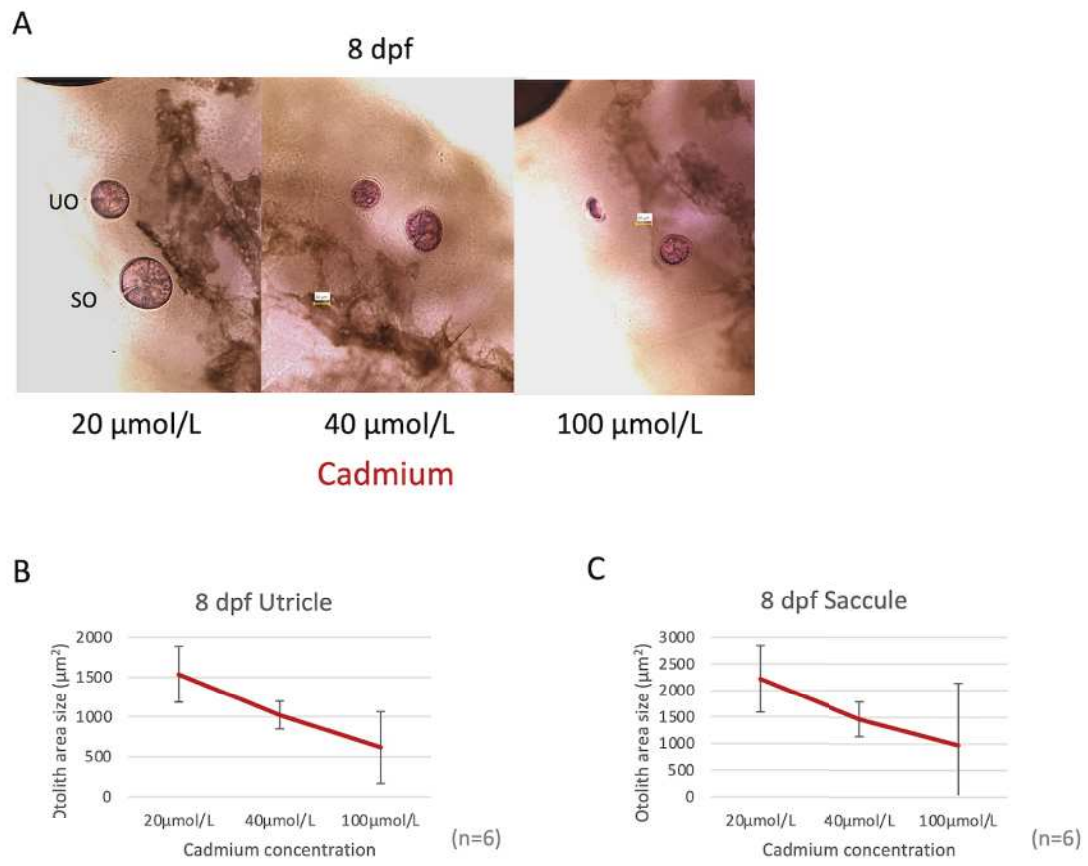


Fig. 3

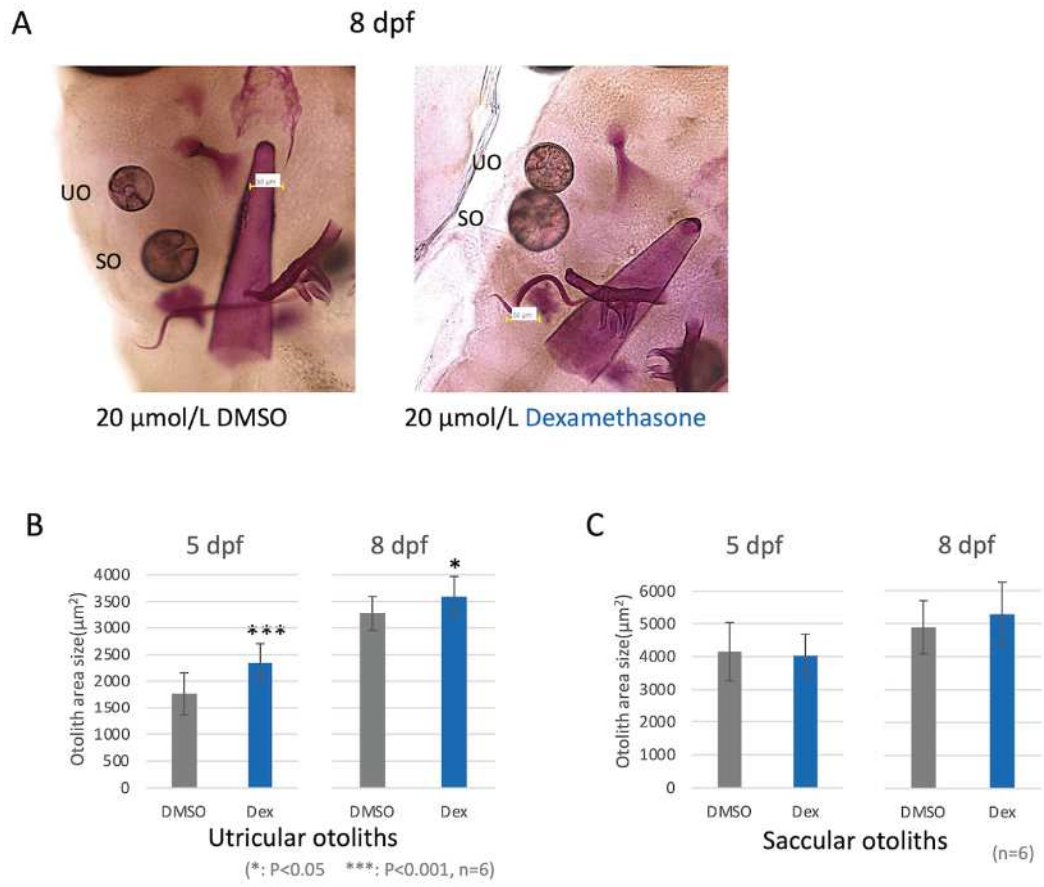
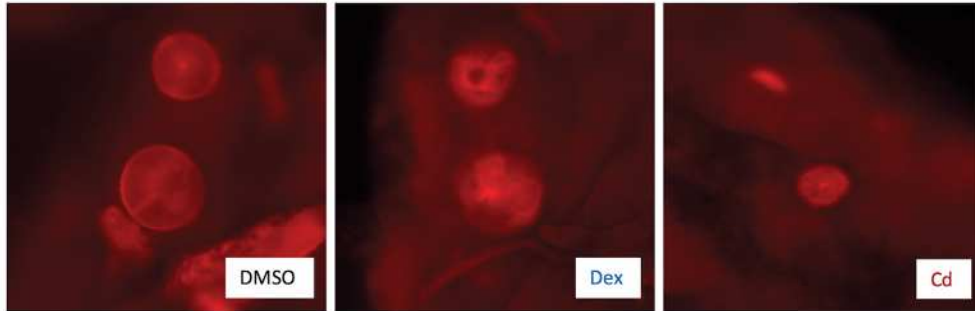
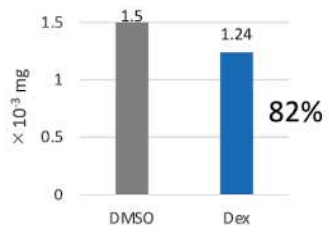


Fig.4

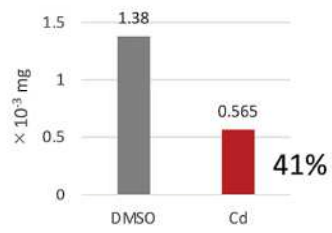
A



B



C



(9) 図表の説明

Fig. 1A : 20 μ mol/LのDMSOとカドミウム溶液にそれぞれ曝露された5日目のゼブラフィッシュ

耳石の大きさは、DMSO群と比較してカドミウム投与群の方が小さい。

dpf: day post-fertilization、UO: utricle otolith、SO: saccule otolith

Fig. 1B, C

5日目と8日目において、カドミウム投与群の耳石はDMSO群の耳石よりもutricleおよびsacculeともに有意に小さかった (***) : $P < 0.001$, $n=6$ t-test)。

dpf: day post-fertilization、Cd: カドミウム

Fig. 2A : 3つの異なる濃度のカドミウム (20 μ mol/L、40 μ mol/L、100 μ mol/L) に曝露された、8日目のゼブラフィッシュ

カドミウム投与濃度が高いほど耳石は小さい。

dpf: day post-fertilization、UO: utricle otolith、SO: saccule otolith

Fig. 2B, C

耳石サイズに有意差はなかったが、8日目においてはカドミウム濃度が高いほど耳石が小さくなる傾向にあった (n=6)。

dpf: day post-fertilization

Fig. 3A : 20 $\mu\text{mol/L}$ のDMSOとデキサメタゾン溶液にそれぞれ曝露された8日目のゼブラフィッシュ

dpf: day post-fertilization、UO: utricle otolith、SO: saccule otolith

Fig. 3B

デキサメタゾン投与群では、5日目および8日目のいずれにおいても、DMSO群と比較してutricleの耳石が有意に大きかった (*: $P < 0.05$ ***: $P < 0.001$, n=6)。

dpf: day post-fertilization、Dex: デキサメタゾン

Fig. 3C

sacculle (n=6) では有意差は認められなかったが、8日目においてはDMSO群と比較してデキサメタゾン投与群でわずかに耳石が大きい傾向が見られた。

dpf: day post-fertilization、Dex: デキサメタゾン

Fig. 4A : アリザリン染色における各群の外観の比較

デキサメタゾン投与群の耳石は、DMSO 群と比較して不均一で粗造に見える。

カドミウム投与群では、DMSO 群やデキサメタゾン投与群に比べ、より不均一で粗造に見える。

Dex: デキサメタゾン、Cd: カドミウム

Fig. 4B, C : 吸光度を測定して算出したカルシウム濃度を、各群で比較した結果

幼生 1 匹あたりのカルシウム濃度は、DMSO 群と比較してデキサメタゾン投与群では 82%、カドミウム投与群では 41%であった。

Dex: デキサメタゾン、Cd: カドミウム