細菌 (*Mycobacterium fortuitum*) による内耳障害

—平衡機能障害について—

工田 昌也・田頭 宣治・原田 康夫*

永澤 容**

Inner Ear Damage Induced by Bacteria (*Mycobacterium fortuitum*)

—Disorders of Vestibular Functions—

Masaya Takumida, Nobuharu Tagashira and Yasuo Harada

(Hiroshima University)

Yutaka Nagasawa

(Mitsugi General Hospital)

Vestibular functions were investigated in mice with inner ear damage induced by *Mycobacterium fortuitum* injected into the caudal vein.

After the injection of *M. fortuitum*, the behavior of the mice was observed and recorded :

1. behavior in the open field, 2. auditory startle reflex, 3. transversing a narrow path, 4. descending a rope, 5. negative geotaxis, 6. grasping a rod, 7. swimming.

Seven days after the injection, some mice showed abnormal behavior, such as inability to standing, swim, transverse a narrow path, graspe rod, or descend a rope or negative geotaxis. Such abnormal behavior was observed in 60–70% of the mice 14 days after the injection of *M. fortuitum*.

Key words : *Mycobacterium fortuitum*, inner ear, vestibular disorder, mice

緒 言

後天的に内耳障害を引き起こす原因となるものには、耳毒性薬物、加齢、音響外傷、感染などがあげられるが、このうち、感染、なかでも細菌感染による内耳障害について、その病態を

詳細に観察した報告は極めて少ない。そこで、今回我々は、細菌感染における内耳障害、特に平衡機能障害について、マウスに腎病変や **spinning disease** とよばれる行動異常を引き起こすことが知られている非定型抗酸菌である

*広島大学医学部耳鼻咽喉科学教室（主任：原田康夫教授）

**公立みつぎ総合病院耳鼻咽喉科

*Mycobacterium fortuitum*¹⁾ (以下 *M. fortuitum* と略す) を使用し, 実験的にマウスに内耳障害を惹起させ, それによる平衡機能の変化をマウスの行動面より観察し, あわせて, 実験動物の平衡機能を行動面から如何に検知し得るかについて検討した.

研究方法

実験動物には, 週令 8 週, プライエル反射正常の JCL/ICR 系マウス 20 匹を使用した. 菌の調整は, *M. fortuitum* ATCC 6841 株を Dubos 培養液にて 3 日間, 37°C で培養したものを使用した. 菌のマウスへの接種は, マウス尾静脈より $7 \sim 8 \times 10^6$ 個, 一回接種とした. これらについて, 接種後 0, 2, 3, 7, 14 日の各時期において次の各項目につき検討した.

1. open-field 内での自由な反射, 行動形態の観察

50×50cm の四方形の field を用い, 周囲を高さ 30cm の壁で囲み, 内面を全て灰色に塗装した. 観察項目としては, 関口²⁾の報告に準じ, 次の観察を行った. すなわち, a) 歩行運動, b) 探索姿勢, c) 毛づくろい (爪なめ, 顔洗い, 毛なめ), d) 立位姿勢の 4 項目について field 内で 3 分間観察した間における出現の有無を観察した.

2. 急速立ち直り反射

マウスをあお向けにして床におき, 何秒以内に立ち直るかを観察した.

3. 聴覚性驚愕反応 (プライエル反射)

4. 橋渡し

Altman et al³⁾の報告により, 幅 3 cm, 長さ 60cm, 高さ 30cm の棒の一端に被検個体を置き, 他端踊り場に残りのマウスを集め, 被検個体の移動運動を観察した. なお, 3 分以内に渡り切るものを正常とした.

5. ロープ降り

この反応は, 床面から 30cm 位高い所より, 直径 1.7cm のロープを立て, 頭を上にもウスをロープにからませ, 下へ降りる動作を観察した. 反応測定としては, A 型: 頭を上にしたままず

り落ちる. B 型: 頭を持ち上げてすべり降りる. C 型: 頭をもちあげて, 下に向かって降りる. D 型: 頭を下に向けて降りる. の 4 型に分類した.

6. 背地走行

透明のプラスチック板よりなる 30×40cm の板を斜面角度 45° となるように傾斜させ, 板の中央にマウスを逆様において, I 型: まっすぐ下へ落ちる. II 型: 中央で方向を転換する. III 型: 方向を転換し真上に上昇する. IV 型: 90° 方向転換して左方向へ移動する. V 型: 90° 方向転換して右方向へ移動する. のいずれの反応を示すかについて 30 秒間観察した.

7. 棒つかみ

床面より高さ 15cm 位の所に 7×7mm の角材を固定し, マウスの尾部を持ちあげて, 前肢が棒に触れてから離し, 30 秒間行動を観察するということを, 一頭体につき 3 回施行した.

8. 遊泳

水平面 30×40cm の水槽内へ水を充分入れ, その中へマウスを静かに落とし, その行動を観察した.

結 果

1. open-field 内での観察

歩行運動, 探索姿勢, 毛づくろいの 3 項目に関しては, *M. fortuitum* 接種後 0, 2, 3, 7, 14 日のいずれの時期においても 100% のマウスで認められた. しかし, 歩行運動に関しては, 接種後 14 日に 4 匹 (20%) のマウスで直線歩行がなく, 右または左にほぼ体長を直径とした円運動を激しくくり返すのが認められた. また, 立位姿勢 (standing) については, *M. fortuitum* 接種後 3 日までは 100% に認められたが, 接種後 7 日では 87.5%, 接種後 14 日では 31.3% と接種後の経過が長くなるにつれてしだいに認められなくなった (図 1).

2. 急速立ち直り反射

M. fortuitum 接種後 14 日まで, いずれの時期においてもすべて 1 秒以内に立ち直りを認めた. しかし, 接種後 14 日では 40% のマウスは,

他のマウスが瞬時に立ち直るのに比べ、やや時間がかかるようであった。

3. 聴覚性驚愕反応 (auditory startle reflex)

接種後2日で87.5%, 3日で97.5%, 14日で100%のマウスで反応の消失が認められた (図2)。

4. 橋渡し (transversing narrow path)

M. fortuitum 接種後, 0, 2, 3日ではすべてのマウスが30秒以内に橋を渡り切ったが, 接種後7日では12.5%, 14日では69.7%のマウスが橋を渡り切れずに落下した。その行動は, 四肢のうち, いずれかが橋の面よりはずれるとともに戻すことができず, そのままずると落ちていくというもので, 空間的な位置の認識が不可能になっているようであった (図3)。

5. ロープ降り (descending on rope)

図 1

図 2

接種後0, 2, 3日ではすべてのマウスがC型かD型であり (図4), 頭を下にして降りることが可能であったが, 接種後7日で18.8%, 14日で62.5%のマウスが正常にロープを降りることができず, 頭を上にしてずり落ちたり (A型), 頭を上にして身体を回転させながら下降したり (B型) した (図5, 6)。

6. 背地走行 (negative geotaxis)

接種後0, 2日ではすべてのマウスがⅢ, Ⅳ, V型のいずれかの移動形態を示したが, 接種後3日で6.3%, 7日で12.5%, 14日で75%のマウスが, Ⅰ, Ⅱ型の移動形態を示した (図7)。

図 3

図4 頭を下にして降りる (D型)
接種後0日

7. 棒つかみ (grasping rod)

接種後0, 2, 3日では, すべてのマウスが落下することなく棒をつかむことができたが, 7日目では12.5%, 14日目では68.7%のマウスが落下した (図8 A B, 9).

8. 遊泳 (swimming)

接種後3日目までは, すべてのマウスが正常に遊泳可能であったが, 7日目で31.2%, 4日

目で73.3%が遊泳不能であった (図10). このようなマウスの大部分は, 水面に落下すると同

図5 頭を上にして身体を回転させながら下降する (B型) 接種後2週

図 6

図 7

図8 棒つかみでは棒をつかんでも, はい上がることができず(A) 落下する(B) 接種後2週

時にバタバタし、まさにおぼれてしまった。また、あるものでは水面上を回転するものや、水中に棒を立てたようにまっすぐになってしまうものも認められた。

考 察

従来より、耳毒性薬物、加齢、あるいは感染などにより内耳障害が起きることはよく知られており、形態学的あるいは生理学的にその病態について詳細な報告がなされている。しかし、その中でも、感染、特に細菌感染による内耳障害についての報告は数少ない。さらに、内耳障害のうちでの平衡機能の障害についての行動面での検索は Igarashi et al⁴⁾ による歩行状態の計数的解析、木村⁵⁾ による回転刺激、温度刺激の眼振による電気生理学的観察などがなされているが、未だ未解決な問題が数多く残されている。

著者ら⁶⁾ は、細菌による内耳障害の病態を明らかにする目的で、マウスに高度な内耳障害と平衡機能障害を惹起させる。非定型抗酸菌の一種である *M. fortuitum* を使用し、それによる内耳の形態的变化をすでに報告した。それによれば、コルチ器では菌の接種後3日ではほぼすべての外有毛細胞の聴毛の消失が認められ、接種後2週では前庭器においても、平衡斑では striola 部、半規管では膨大部稜頂部を中心とした感覚毛の変性、脱落といった所見が認められた。今回の研究はこれらの内耳の形態学的な

異常をふまえたうえで、細菌により惹起される行動異常、いかにいえば平衡機能障害を行動面より明らかにしようとしたものである。

本実験において、マウスの行動を観察するために用いた項目は、従来、マウスの行動発達研究に用いられていたものである。関口²⁾ は、成熟正常マウスであれば、歩行運動、搜索姿勢、毛づくろい、立体姿勢のいずれもが open-field 内で認められると報告している。今回、*M. fortuitum* 接種後に認められたような立位姿勢の消失、あるいは回転運動の出現は本来、生後2週以前の幼若マウスのもので、成熟マウスでは認められないものである²⁾。また、朴沢⁷⁾ の報告で、 K^+ イオン迷路内投与で同様の激しい回転運動を行なうことが知られており、open-field 内における観察の中で認められた立体姿勢の消失や、回転運動の出現は、*M. fortuitum* による内耳障害の結果によりおこった行動異常と考えられる。

急速立ち直り反射については、今回の観察では明確な変化をとらえることはできなかった。聴覚性驚愕反応については、*M. fortuitum* 接種後3日目にはほとんどすべてのマウスで消失しており、形態的にコルチ器外有毛細胞がほとんど脱落しているということ⁶⁾ とよく対応していた。

橋渡り、棒つかみ、遊泳という項目に関して、これらの行動は、例えば、棒つかみでは前

図 9

図 10

肢で棒をつかみ, つかんだら後肢を屈曲し, 外転し, 尾部を利用して棒の上へよじ登るという複雑な行動形態が合成されて初めて成功するもので, 生後15日から22日目位以後に完成する行動様式であるとされている²⁾. これらのすべての項目で, *M. fortuitum* 接種後7日目位より, 不成功なもの割合が増加しており, これらもまた, *M. fortuitum* による内耳障害によるものと考えられた. また, ロープ降り, 背地走行に関して, 関口²⁾は正常成熟動物は, ロープ降りではC, D型, 背地走行ではⅢ, Ⅳ, Ⅴ型のいずれかをとると報告している. 今回の我々の観察でも同様に, 最初はC, D型, あるいはⅢ, Ⅳ, Ⅴ型と正常であったものが, 接種後7日目頃よりしだいにA, B型あるいはⅠ, Ⅱ型に移行していった.

このように, *M. fortuitum* による行動学的な異常は, 接種後7日目頃より認められはじめ, 接種後2週ではかなり明確となり, 形態学的変化の起こる時期⁶⁾とよく一致しており, これらの行動異常は, *M. fortuitum* による内耳障害の結果引き起こされたものと考えられた. さらに, このような行動異常は, 特に open-field 内での立位姿勢の消失, あるいは橋渡り, 棒つかみ, 遊泳が不可能になること, ロープ降りでA型, B型を示す. 背地走行でⅠ型, Ⅱ型を示すというものであった.

現在のところ, 実験動物における平衡機能障害について, 行動面より観察したものは数少なく, 授乳期マウスでは内耳を電氣的に損傷し, その行動発達をみた田中ら⁸⁾の報告があるが, 成熟動物に対して障害実験を行ないその行動を観察したものは稀である. 今回の研究で, *M. fortuitum* 接種による行動異常を経時的に観察することにより, 行動異常の出現について, 内耳の形態学的な変化の時期に対応して, 橋渡り, 遊泳が不可能になったり, 立位姿勢が消失するなど, ある程度決まったパターンをとらえることができた. これらの観察方法は, 今後, 内耳の障害実験を行なう上での機能的な異常を

測定する示標となる可能性が有り得るものと考えられた.

結 語

マウスに*M. fortuitum* を接種し, その行動を観察した結果, 以下のことが明らかとなった. 観察項目のうち, open-field 内での回転運動, 立位姿勢, 棒つかみ, 背地走行, ロープ降り, 橋渡り, 遊泳の項目は平衡機能障害の状態をよく反映するものと考えられた. これらの項目については *M. fortuitum* 接種後7日目位より異常が出現しはじめ, 接種後14日目では, 60~70%以上のマウスで異常行動が認められ, 形態学的な観察結果とよく対応していた.

参考文献

- 1) Saito H and Tasaka H: Comparison of the pathogenicity for mice of *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium abscessus*. J Bacteriol 99: 851~855, 1969.
- 2) 関口茂久: ラットとマウスを用いた行動発達研究法. 誠信書房, 東京, 1977.
- 3) Altman J and Sudarshan K: Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. Animal Behavior 23: 896~920, 1975.
- 4) Igarashi M, et al: Dynamic equilibrium in squirrel monkeys after unilateral and bilateral labyrinthectomy. Acta Otolaryngol (Stockh) 69: 247~253, 1970.
- 5) 木村訓子: 長時間反復回転刺激の水平半規管膨大部稜に及ぼす影響に関する実験的研究. 日耳鼻 86: 870~880, 1983.
- 6) 工田昌也, 他: 細菌 (*M. fortuitum*) による内耳障害. Ear Res Jpn 16: 49~51, 1985.
- 7) 朴沢二郎: めまい診察と迷路病態. 篠原出版, 東京, 1985.
- 8) 田中 修, 他: 授乳期マウスの反射. 行動の発達—平衡機能障害マウス作成のこころみ. 厚生省特定疾患. 前庭機能異常調査研究班昭和58年度研究報告書: 39~45, 1984.

原稿到着: 昭和60年11月18日
別刷請求先: 工田昌也
〒734 広島市南区霞1-2-3
広島大学医学部耳鼻咽喉科学教室