アスペルギルス症を併発したアルダブラゾウガメ (*Geochelone gigantea*)の非定型抗酸菌症の1例

森本 委利, 宮下 実

大阪市天王寺動物園 〒543 大阪市天王寺区茶臼山町1-108

(1996.7.9 受付, 1996.7.16 受理)

A Case of Atypical Mycobacteriosis in a Aldabra Tortoise (*Geochelone gigantea*) associated with Aspergillosis

Tomotoshi MORIMOTO, Minoru MIYASHITA

Osaka Municipal Tennoji Zoological Garden,
1-108, Chausuyama-cho, Tennoji-ku, Osaka 543, Japan

ABSTRACT. In quarantine, a young female Aldabra tortoise died in October, 1994 at Osaka Municipal Tennoji Zoological Garden. After pathological and bacteriological examinations, it became clear that the tortoise died of *Mycobacterium nonchromogenicum* complex (*M. terrae* complex) infection concurrently with *Aspergillus fumigatus* infection. From the pathological changes, it was assumed that the case had been infected with the mycobacteria at first, and after weakened by the infection, got infected with mycosis. The time of the tortoise's infection with mycobacteria is unknown. This is the first report of a case of *Mycobacterium nonchromogenicum* complex infection in Aldabra tortoise.

Key words: Aldabra tortoise, *Aspergillus fumigatus*, *Mycobacterium nonchromogenicum* complex (*M. terrae* complex)

Jpn. J. Zoo Wild. Med. 2(1) : 67-71, 1997

1994年8月23日に来園し、屋外運動場で検疫中であった年齢不明の若齢アルダブラゾウガメの雌が、同年10月8日朝死亡、即日剖検された。生前の一般状態に異常は見られなかった。

病理学的検索として、全身諸臓器を肉眼的に観察したのち、病変部組織標本作製用として、左肺後部腫瘍1か所および灰白色結節を有した肝臓および腎臓からそれぞれ2部域と1部域を各拇指頭大に採取し、10%中性緩衝ホルマリン水で固定した。その後、常法に従ってパラフィン薄切標本を作成し、Hematoxylin-Eosin (HE), Periodic Acid Schiff (PAS), Grocott および Ziehl-Neelsen 染色を施し、光学顕微鏡を用いて組織学的観察を実施した。

細菌学的検索では、結節が密発した肝組織について、その2部域の各一部分を採取し、一般細菌（好気性および嫌気性）、抗酸菌およびカンジダの培養を行い、病原菌の同定を実施した。抗酸菌培養は、培養前に採取肝組織のスタンブ標本に Ziehl-Neelsen 染色を施し、鏡検後以下のように実施した。

まず、採取肝組織に4%NaOHを加え、3%小川培地にて8週間培養。4週目から毎週発育状態を観察し、抗酸菌陽性コロニー数をカウントした。34日目にはナイアシンテストを行い、陰性結果のものについて極東抗酸菌鑑別セット（極東製薬工業㈱、東京）にて抗酸菌の鑑別操作を3週間にわたり実施した。

Fig.1. The Aldabra tortoise after death

一方、肺組織に発生した真菌については、その集落の一部を採取し、Sabouraud's Agar 平板培地および Corn Meal Agar 平板培地で、25 および 37°C にて 7 日間にわたり培養し、各培地の観察を毎日続けた。この間に、肉眼ならびに顕微鏡下での集落の状態ならびに集落から釣菌したカビの顕微鏡下観察から、同定を実施した。

剖検時の体重は 25.0 kg で、来園当時と比べ 4.6 kg 減少していた。外部計測では、曲背甲長 74.5 cm、腹甲長 52.3 cm、甲幅 47 cm、甲高 31 cm であった。

肉眼所見においては、外貌では鼻孔に鼻汁漏出痕があるのみで他に著変無し。内景では、黄褐色透明体腔液が灰白色絮状物を中量浮遊した状態で多量(3,200 ml 以上)貯留した。心では透明心囊液の微増。心冠部脂肪は皆無。肺では左右両肺とも前後部に各々大きな灰白色腫瘤(直径 4~5 cm 大)を有し、前部は充実性でその剖面から球状から楕円形あるいは不正形の結節の集まりを成し、後部は壁厚 1 cm 前後の空洞状で、その内壁に黒みがかかる濃緑色の真菌集落の発生をみた。後部腫瘤の剖面も、前部のような楕円形から不正形の結節から成っていた。肝臓は辺縁鈍、表面粗大顆粒状、色調は不均一で暗赤、にくづく様を呈した。硬度は増加し、直径 2~10 mm 大の灰白色結節が密発した。脾臓はやや腫大し、剖面膨隆は中等度、直径 2~3 mm 大の灰白色結節が密発。腎臓では脾臓同様の直径 2~3 mm 大の灰白色結節が散在した。胃では、壁に直径 1 mm 大の灰白色結節がごく少数散在。小腸では、全域にわたり充血および水腫が軽度、大腸では、中部から下部にわたり充血中等度で、水腫は軽度~中等度。また出血も軽度~中等度観察

された。

組織所見においては、肺では正常肺組織と思われる部位は認められず、数個の大小の空洞によって構成され、その空洞の一部に肝臓で認めたものと同様な乾酪壊死組織とこれを取り囲む肉芽組織が存在。本肉芽組織は中央の壊死組織を完全に包囲する類上皮細胞のほか、時折それらに混じて多核巨細胞がみられ、さらにそれらを取り囲むように、リンパ球や好酸性顆粒球が浸潤し、線維組織の形成がみられた。この空洞と肉芽組織には、PAS 染色、Grocott 染色により多数の分生子を有し、有隔で二叉に分岐するアスペルギルスの菌糸が認められた。このアスペルギルスは、頂囊は乳棒形あるいはフラスコ形で、単列の梗子が頂囊上半分を覆った。分生子は 1 細胞性、直径約 2.5 μ m のほぼ球形で表面は細かい粗面。分生子頭は単一の緻密な円柱状を呈した。以上の形態は *Aspergillus fumigatus* の形態と合致していた[1,2]。肺病巣部には、Ziehl-Neelsen 染色により、抗酸菌は全く確認できなかった。これは、大きな病巣では抗酸菌による病巣が形成、完成された後に陳旧となり、抗酸菌が消失したものと考えられた。

肝臓では、全域にわたり中心部に大きな乾酪壊死巣を有す大小不同の肉芽腫(結節)が密発。同結節の大部分は壊死巣で、これを取り囲み、やや幅の狭い肉芽組織が増生し、

Fig.2. Left: A cluster of nodules in the anterior of lung.

Center: The lesion in the posterior of lung are hollowlike. Blackish-green fungi are found on all the inside of the lumen.

Right: Fungi in the posterior of lung shows the form of *Aspergillus*. Grocott stain. $\times 200$. One division of scale is 1 mm.

アルダブラゾウガメの非定型抗酸菌症の1例

Fig. 3. Multiple tubercles in the liver.

Insert: A cut surface of a region of the multiple tubercles.

One division of scale is 1 mm.

これに少数のリンパ球、マクロファージが加わる。Ziehl-Neelsen 染色により抗酸菌を見いだしたが、陳旧の大きな肉芽腫結節にはあまり存在せず、中心部に壊死が少なく、類上皮細胞が大部分を占めるやや新しい小結節に、多数の抗酸菌を証明した。PAS および Grocott 染色では、アスペルギルスを確認できなかった。残存肝細胞は、変性、粗鬆化が強かった。

腎臓には、乾酪壊死巣をもった肉芽腫結節と肉芽腫のみの結節が少数認められた。所見は肝臓とほぼ同様で、壊死巣をもった大きな結節に抗酸菌は極少数で、肉芽腫のみの若い結節には多数の抗酸菌を Ziehl-Neelsen 染色により確認し、かつリンパ球を主としこれに少数の好酸性顆粒球を混じた軽度の細胞浸潤を認めた。PAS および Grocott 染色により、アスペルギルスは認められなかった。

細菌学的所見では、病変肝組織から小川培地にて分離された菌は、ナイアシンテストで陰性を示し、*M. tuberculosis* 以外の抗酸菌であるため、極東抗酸菌鑑別セットで鑑別操作を実施した。結果は硝酸還元試験（培養 24 時間目観察）陰性、発育速度 3 日試験（培養 3 日目観察）陰性、ツィーン 80 水解試験（培養 7 日目観察）陽性、PAS 培地黒変（培養 7 日目観察）陰性、ピクリン酸培地判定（2 週間目観察）陰性、コントロール培地（2～3 週間目観察）を対照にして

PNB 培地および HA 培地判定ともに陽性、EB 培地判定陰性。コントロール培地での光発色試験および暗発色試験ともに陰性。以上の性状から最終的に *M. nonchromogenicum* complex [3]（あるいは *M. terrae* complex [4] とも言う）と同定され、*M. nonchromogenicum*, *M. terrae*, *M. triviale* 3 種の菌のいずれかと推定された。

培養真菌観察では培養 5 日目、Sabouraud's Agar 培地にて黒褐色放射状集落の形成を認め、さらに 24 時間培養したところ、分生子頭は密な円柱状で、分生子柄は無色で短く平滑。頂囊はフラスコ型を示した。以上から病変肺の真菌は、*Aspergillus* sp. と同定された [1,2]。

防疫では、剖検後、飼育舎の消毒をリンドレス®（ファイザー製薬㈱、東京）500 倍希釈液で実施した。

野生動物ならびに動物園動物において、ミコバクテリウム（抗酸菌）感染の発生は時折みられ、爬虫類でもその発生は例外ではない [5-10]。しかし、カメにおける発生はまれであり [5,7,9,10]、アルダブラゾウガメについては、その発生報告はみられない。

一方、アスペルギルスに感染したカメの症例報告は時にみられ [7,11]、陸棲カメのほうが水棲のカメよりも感染する頻度が高いが [12]、アルダブラゾウガメのアスペルギルス症報告例は極めて稀である [13]。

本例では病理学的所見ならびに細菌学的所見から *Aspergillus fumigatus* と混合感染していたが、検査結果から抗酸菌感染が先行し、これにより衰弱し抵抗力が低下したところに、アスペルギルスの二次感染を起こしたもの [1] と考えられた。

M. nonchromogenicum complex [3] (*M. terrae* complex [4]) に含まれる 3 菌は、一般性状の同一性から、各菌を独立した別種として扱ってよいのか疑問視されている [4] もので、今後更なる分類学的研究が待たれている菌である。今回原因菌と推定される 3 菌のうち *M. nonchromogenicum* および *M. terrae* は共に土壌由来であり、ヒトにおいてごく少数例で発病を見ているが、唾液あるいは痰から発見された *M. triviale* は、病原菌とは見られていない [4]。よって本例は、前 2 者の非定型抗酸菌が今回の有力な原因菌ではないかと考えられた。恐らくは飼育場内の土から日和見的に感染したのであろうと推察されるが、本例が入園前すでに抗酸菌感染していたか、それとも入園後感染を受けたのか、この結果からは確定できなかった。本例の抗酸菌によ

Fig. 4. The microscopic appearance of one tubercle in the kidney.

The many acid-fast bacilli are found in the central caseation (arrow). Ziehl-Neelsen stain. $\times 100$

Insert: A high magnification appearance of the acid-fast bacilli on the arrow head portion. Ziehl-Neelsen stain. $\times 1,500$

る病変では、それにより形成された肉芽腫結節で凝固壊死を伴う肉芽腫が形成されていることから慢性例であり [10]、まず肺が侵された後、菌が肺静脈枝を経て大循環にのり、肝臓、腎臓、脾臓へ散布されたものと推察された。これによって多発性となった結節は、本例のようにめったに大きくはならず、臨床症状が急激に悪化し、個体は死に至るのが通例である [14]。ニワトリへの *M. avium* 接種例では、接種後 5 週間目には中心に凝固壊死組織をもった結節が認められる [15] ことは、本例でも入園後 (46 日間) に病変が形成されたと判断できなくはない。しかし、今回の症例は感染菌が違う種であること、罹患動物がニワトリのような恒温動物ではなく代謝が低い変温動物のカメであること、自然発生例であることなどから、本例で形成された病変に至るまでの時間経過を正確に把握するのは困難である。

抗酸菌による病変は、罹患動物の抵抗性によりその現れ方が異なる [3, 8] が、抗酸菌による結節は、本質的には肉芽腫病変であり、Final phase としての典型例は、中央に凝

固壊死巣を有し、その周りを類上皮細胞層(ここでは類上皮細胞により多核巨細胞の形成をみる)が取り囲み、さらにその周囲をリンパ球、顆粒球等の白血球、線維結合組織が取り囲む [8, 16]。

本例の結節も基本的にこれと同じであった。なお本例の結節では、白血球が存在する領域に好酸性顆粒球(恐らくは、偽好酸球と考えられるが)の浸潤が割合みられ、ニワトリの *M. avium* による結節 [15] と類似していたが、石灰化は本例では確認できなかった。また、肺、肝臓、腎臓に形成された乾酪壊死組織は、その多くが抗酸性を示したため、同部位での抗酸菌の検出を困難にするくらいがあった [10, 16]。

アスペルギルス症の治療は一部の爬虫類でなされているが、抗酸菌罹患爬虫類の治療は、その成功例の報告はなく [17] 一般に推奨されるものではない [9]。通常殺処分されるべきものである [17, 18]。人獣共通感染症の原因菌である抗酸菌では、変温動物由来菌感染症例がヒトで報告されている事実があること [4]、また、わが国の非定型抗酸菌症の罹患頻度は次第に増加傾向にある [19] ことから、取り扱いには十分注意されなければならない [5, 17]。

抗酸菌検出法では、哺乳類 [8]、鳥類 [15] でツベルクリン反応テスト、ニワトリでの Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) 法 [15] はすでに応用されているが、変温動物ではまだみられない。最近、病的材料に含まれる各菌種固有の DNA を増幅して、直接菌種の存在を証明する PCR 法が導入されつつあり、非定型抗酸菌の各菌種についても検討が進んでいる [19] ので、今後期待したい。

当面は、体重減少や食欲減退等の異常症状発生確認や X-ray 検査、バイオプシー等により総合的に診断していく以外、抗酸菌症を発見できない。そこで動物導入後の検疫期間の設定は非常に重要と思われる。抗酸菌感染症における経過は急性から慢性までと様々であるため、exotic animal の臨床症状は多様である [8, 10]。よって十分な検疫期間を設定すべきである。Thoen & Karson [15] はニワトリ等の家禽で 60 日、Thoen & Himes [8] は動物園動物全般に 60~120 日、できれば 120 日 [8] を推奨している。彼らはまた、抗酸菌症発生時の動物舎消毒は、できるならば 3 週間間隔で 2 回 [6] ~3 回 [8] を推奨し、消毒薬は 3~5% cresylic compound か、sodium orthophenylphenate のよ

アルダブラゾウガメの非定型抗酸菌症の1例

うなフェノールの誘導体の使用を勧めている [6,8]。我々は、抗酸菌に有効なヨードホルム剤を用いた。なおよく使用される hypochlorites, halides, 塩化ベンザルコニウムは、抗酸菌に対する殺菌効果はみられない [8]。

要 約

1994年10月、当園で検疫中の若齢アルダブラゾウガメ(雌)1頭が死亡した。病理学的ならびに細菌学的検査の結果、当該動物の死因は、*Aspergillus fumigatus* 感染を伴った非定型抗酸菌 *Mycobacterium nonchromogenicum* complex (*M. terrae* complex) 感染によることが判明した。感染はまず抗酸菌に始まり、それによる衰弱後、アスペルギルス感染に至ったと病変から推察された。しかし抗酸菌の感染時期は確定できなかった。本症例は、アルダブラゾウガメにおける *M. nonchromogenicum* complex (*M. terrae* complex) 感染の最初の報告である。

キーワード：アルダブラゾウガメ, *Aspergillus fumigatus*, *Mycobacterium nonchromogenicum* complex (*M. terrae* complex)

引用文献

1. 東 量三. 1973. アスペルギルス症. 家畜伝染病の診断(農林省家畜衛生試験場技術者集合同会編), pp.678-688. 文永堂, 東京.
2. McGinnis MR, D'Amato RF, Land GA. 1984. アスペルギルス. In *Pictorial handbook of medically important fungi and aerobic actinomycetes* (山口英世監訳), pp 38-44. 医歯薬出版, 東京.
3. 束村道雄. 1980. 総説: 抗酸菌の分類学 II. 抗酸菌の菌種-群別の試案. *Kekkaku* 55: 341-347.
4. Wayne LG, Kubica GP. 1986. Section 16, The mycobacteria. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2* (Sneath PH, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG eds), pp.1435-1457. Williams & Wilkins, Baltimore.
5. Burke TJ. 1978. Chapter 9, Reptiles, Infectious diseases of reptiles. In *Zoo and wild animal medicine* (Fowler ME editor-in-chief), pp 134-137. W.B.Saunders Co., Philadelphia.
6. Thoen CO, Himes EM. 1980. Mycobacterial infections in exotic animals. In *The comparative pathology of zoo animals* (Montali RJ, Migaki G ed.), pp.241-245. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C..
7. Marcus LC. 1981. Specific diseases of herpetofauna. In *Veterinary Biology and Medicine of Captive Amphibians and Reptiles*, pp.83-221. Lea & Febiger, Philadelphia.
8. Thoen CO, Himes EM. 1981. Tuberculosis. In *Infectious diseases of wild mammals, 2nd ed.* (Davis JW, Karstad LH, Trainer DO. eds.), pp.263-274. The Iowa State University Press, Ames, Iowa.
9. Wallach JO, Boever WJ. 1983. Chapter 22, Reptiles and Amphibians. In *Diseases of exotic animals*, pp.979-1047. W.B.Saunders Co., Philadelphia.
10. Frye FL. 1991. Chapter 4, Infectious diseases. In *Reptile Care, Vol. 1*, pp.112-157. T.F.H. Publ. Neptune city.
11. Griner LA. 1983. Amphibians and Reptiles. Order Testudinata. In *Pathology of zoo animals*, pp 66-86. Zoological Society of San Diego, San Diego.
12. Hunt TJ. 1957. Notes on diseases and mortality in Testudines. *Herpetologica* 13: 19-23.
13. Andersen S, Eriksen E. 1968. Aspergilose bei einer Elefantenschildkröte (*Testudo gigantea elephantina*). In *X internationalen Symposiums über die Erkrankungen der Zootiere*, pp.65-67. Akademischer Wissenschaften der DDR, Berlin.
14. Wheeler PR, Burkitt HG, Stevens A, Lowe JS. 1987. Chronic inflammation In *Basic Histopathology: A Color Atlas and Text 1st ed.* (今井 大編訳), pp.17-35. 西村書店, 新潟.
15. Thoen CO, Karson AG. 1984. Avian tuberculosis. In *Diseases of Poultry 8th ed.*, pp.165-177. The Iowa State University Press, Ames, Iowa.
16. Brownstein DG. 1984. Mycobacteriosis. In *Diseases of amphibians and Reptiles*. (Hoff GL, Frye FL, Jacobson ER ed.), pp.1-23. Plenum Press, New York.
17. Mader DR. 1996. Section 11, Microbiology. In *Reptile Medicine and Surgery*, pp.117-125. W.B.Saunders Co. Philadelphia.
18. Klös H-G, Lang EM. 1982. Amphibia-Reptiles; Infectious diseases. In *Handbook of Zoo Medicine* (Translated by Speckmann G), pp.368-372. Van Nostrand Reinhold Co., New York.
19. 網谷良一, 田中栄作, 久世文幸. 1993. 非定型抗酸菌症. 臨床と微生物. 20: 1001-1009.