

生態系における野兔病菌の維持様式に関する研究

研究分担者	棚林 清	国立感染症研究所	獣医科学部	室長
研究協力者	藤田 修	国立感染症研究所	獣医科学部	主任研究官
	堀田明豊	国立感染症研究所	獣医科学部	主任研究官
	進藤順治	北里大学	獣医学部	准教授
	工藤 上	北里大学	獣医学部	准教授
	朴 天鎬	北里大学	獣医学部	准教授
	小山田敏文	北里大学	獣医学部	教授

研究要旨：野兔病菌 (*Fransicella tularensis*) の生態系における維持様式を明らかにする目的で、野兔病菌感染斃死ノウサギが発見された牧野において野生小哺乳類やダニの捕獲ならびに周辺部の水、土の採取を実施し、これらからの野兔病菌の分離、ゲノム DNA の検出および抗体検出を試みた。ハタネズミやホンダアカネズミなどの捕獲小哺乳類 55 匹からは菌分離、ゲノム DNA 検出ともされず、また、野兔病菌に対する抗体も検出されなかった。斃死ノウサギ発見場所周辺の土 7 か所 28 検体のうち 1 検体で野兔病菌ゲノム DNA が検出された。また、周辺の池等の水 5 か所 10 検体についてはアメーバの分離培養とゲノム DNA が検出を行い 1 検体で DNA が検出された。ダニは 3 匹しか採取されていないが、検出された DNA は類似菌由来の可能性があった。今後も季節等も考慮して検体を採取して調査することやアメーバ内での増殖性や自然環境での野兔病菌の生残性の検討をする必要があると考えられた。

A. 研究目的

野兔病は、国内においてはノウサギを主な感染源とする典型的な動物由来感染症である。過去には関東地方から東北地方において患者の発生が認められたが、近年ほとんど発生の報告がなかった。しかし、2008 年には千葉、福島、青森県でノウサギからの感染者の報告があり、今日でも野兔病菌

が自然界には維持されていることが明らかとなった。本菌は自然界においてはマダニ等の吸血性節足動物と野生動物の間で維持されているものと考えられているが、水系に生息するアメーバ内で本菌の増殖が可能であるとの研究もあり、本菌の生態系での維持様式は不明な点が多い。

本研究では野兔病菌に感染し斃死したノ

ウサギが発見された青森県内の牧野での小哺乳類やダニ、ならびに周辺の土や池の水等について野兔病菌またはゲノム DNA の検出を試み本菌の自然環境における存在状況を明らかにし、本菌の生態系における維持様式の解明のための基礎的情報を得ることを目的とした。

## B. 研究方法

### (1) 検体収集と処理

小哺乳類動物：野兔病菌感染斃死ノウサギ発見地牧野にシャーマントラップを設置し捕獲を試みた。表 1 のようにハタネズミ、ホンダアカネズミ、ヒメネズミ、ヒミズ、ニホンジネズミの合計 5 種類 55 匹を捕獲した。体重と体長の測定、種の鑑別後、脾臓と肝臓を無菌的に摘出した。生存個体については血液も採取した。また、外部寄生体（ダニやツツガムシ）も合わせて採材した。臓器や寄生体については野兔病菌の分離培養に供するとともに DNA を抽出してリアルタイム PCR のための鋳型 DNA とした。

土：斃死ノウサギ発見場所を中心に 7 か所から 28 検体を採取した。これらの 0.5～0.9g から Mo Bio UltraClean Soil DNA Isolation Kit (Mo Bio Laboratories, Carlsbad, CA) を用いて DNA を抽出した。

水：牧野に点在する池や水溜まり 5 か所から 250ml ずつ 2 検体合計 10 検体を採取した。これらの 10 分間静置後の上清及び 1500rpm 10 分間遠心した沈渣はアメーバ分離用培地に塗布して培養した。また、原水 50ml を 8000rpm 15 分間遠心した沈渣から

は DNA を抽出した。

ダニ：同牧野において旗ざり法でマダニの採取を行った。メスの成ダニ（キチマダニ、*Haemaphysalis flava*）3 匹を捕獲した。これらから DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) により全 DNA を抽出してリアルタイム PCR の鋳型とした。

(2) 野兔病菌の分離培養：ペニシリン添加ユーゴン・チョコレート寒天培地平板に、野鼠の肝臓および脾臓の 10% 乳剤を塗布し、37°C 10 日間培養した。

(3) アメーバの培養：採取した水はその上清及び遠心沈渣を加熱不活化大腸菌塗布無栄養寒天培地に接種し 25°C で培養した。アメーバ集落が観察された場合は継代培養し、アメーバの同定と DNA 抽出を行い野兔病菌ゲノム DNA 検出リアルタイム PCR に供した。

(4) 野兔病菌ゲノム DNA 検出リアルタイム PCR：野兔病菌の高感度特異的ゲノム検出を行うために *fopA*, *tu14*, *ISFtu2*, *23kDa* 遺伝子領域を増幅するリアルタイム PCR はライトサイクラーを用いて行った。さらに増幅産物はアガロースゲル電気泳動により DNA サイズの確認を行った。

(5) 野兔病菌に対する抗体測定：不活化野兔病菌菌体を用いた微量凝集反応および抽出 LPS 抗原を用いた ELISA により行った。

## B. 結果

(1) 捕獲小哺乳類からの野兔病菌の分離およびゲノム DNA の検出：捕獲したハタネズミ、ホンダアカネズミ、ヒメネズミ、ヒミズ、ニホンジネズミの合計 5 種類 55 匹（表

1) の脾臓及び肝臓の乳剤をペニシリン加ユーゴン・チョコレート寒天培地に接種し培養を実施したが野兎病菌は分離されなかった。また、これら臓器から抽出した DNA を鋳型にリアルタイム PCR 法による野兎病菌ゲノム DNA の検出を試みたがいずれの個体でも検出されなかった。ツツガムシ等の外部寄生体からの野兎病菌ゲノム DNA の検出は現在実施中である。

(2) 土からの野兎病菌ゲノム DNA の検出: 斃死ノウサギ発見地を中心に7か所28検体の土を採取し、これらから抽出した DNA についてリアルタイム PCR を実施したところ1検体が *fopA* 遺伝子領域で陽性となった(図1)。また、他の3遺伝子領域でも陽性となった。

(3) 水からのアメーバの分離と野兎病菌ゲノム DNA 検出: 牧野内の5か所から10検体の水を採取し、その上清と沈渣についてアメーバの分離を試みたところ、3か所4検体で *Naegleria* 属、*Hartmannella* 属、*Vannella* 属、*Vexillifera* 属のアメーバが分離された。このうち1検体については野兎病菌ゲノムの *fopA* と *23kDa* 遺伝子領域でのみリアルタイム PCR 陽性となり野兎病菌類似菌である可能性が考えられた。アメーバが分離されなかった検体からの抽出 DNA のリアルタイム PCR では3検体のうち1検体は野兎病菌 4 遺伝子領域とも陽性となった。(表2)

(4) ダニからの野兎病菌の検出: 3匹のメス成ダニ (*H. flava*) から抽出した DNA についてリアルタイム PCR を実施したところ、3

遺伝子領域 (*fopA*, *ISFtu2*, *23kDa*) では想定 DNA 増幅が認められたが1遺伝子領域 (*tu14*) では想定サイズと異なる増幅が認められ、これらのダニには野兎病菌類似菌が含まれていたと考えられた。

### C. 考察

本邦における野兎病の感染源動物のほとんどはノウサギであるが、これらのノウサギにおいてはどのような経路で感染が起きたか、また、生態系において野兎病菌がどのように維持されているのかについては、ダニ等の関与が考えられているが詳細については不明な点が多い。本研究では野兎病感染斃死ノウサギが発見された場所周辺で小哺乳類、土、池等の水及びダニの検体を収集し、野兎病菌の分離、ゲノムDNAの検出や抗体検出を試みた。捕獲野鼠からは野兎病菌及びゲノムDNAや抗体は検出されなかったが、土や水の検体からはゲノムDNAの断片が微量ながら検出された。ダニは少数しか収集できていないが確実な野兎病菌DNAは検出されなかった。これまでの検体での調査では斃死ノウサギへの感染様式を推定できる情報を得るのは困難であると考えられることから、季節等の要因も考慮して多数のダニやその他の検体の収集を検討する必要がある。また、自然環境での野兎病菌の生残性やアメーバでの野兎病菌増殖の解析等についても検索が必要である。



#### D. 結論

野兔病感染斃死ノウサギ発見場所周辺において小哺乳動物、ダニ、土、水を捕獲・採取し、野兔病菌やそのゲノムDNA、抗体の検出を試みた。捕獲野鼠等55匹からは野兔病菌およびゲノムDNAは検出されず、抗体もなかったことから過去の感染もなかったと考えられる。一方、土や水からはそれぞれ1検体に野兔病菌ゲノムDNAの断片が検出された。ダニは少数しか採取できなかったが野兔病類似菌と考えられるDNAしか検出されなかった。今後も季節等の要因も考慮してさらに多数の検

体について検討する必要がある。また、アメーバでの本菌の増殖および自然環境での生残性についても検討が必要と考えられた。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1: 野生小哺乳動物の種および捕獲頭数

種名	学名	総匹数 (オス/メス)
ネズミ目 ネズミ科		
ハタネズミ	<i>Microtus montebelli</i>	31 (12/19)
ホンドアカネズミ	<i>Apodemus speciosus speciosus</i>	12 (2/10)
ヒメネズミ	<i>Apodemus argenteus</i>	10 (5/5)
トガリネズミ目 モグラ科		
ヒミズ	<i>Urotrichus talpoides</i>	1 (0/1)
トガリネズミ目 ジネズミ科		
ニホンジネズミ	<i>Crocidura dsinezumi</i>	1 (0/1)
合計		55 (19/36)

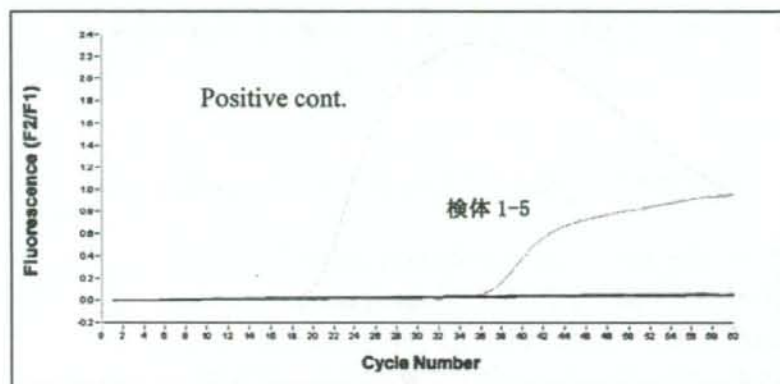


図 1 : 土から抽出した DNA のリアルタイム PCR による野兔病菌ゲノム DNA の検出  
(増幅領域は *fopA*, *tu14*, *ISFtu2*, *23kDa* 領域でも検体 1-5 は陽性となった。)

表 2: 水およびアメーバからの抽出 DNA のリアルタイム PCR による  
野兔病菌ゲノム DNA の検出

	検体	増幅対象領域			
		<i>fopA</i>	<i>tu14</i>	<i>ISFtu2</i>	<i>23kDa</i>
水	2-2 (沈渣)	+	-	-	+
	8-3 (沈渣)	+	+	+	+
	6-4 (沈渣)	+	-	+	+
アメーバ	2-2-1	+	-	-	+

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症事業）  
分担研究報告書

野生動物の感染症に関する研究：ペンギン目の感染症病変

研究分担者 柳井徳磨 岐阜大学応用生物科学部教授  
研究協力者 酒井洋樹 岐阜大学応用生物科学部助教  
研究協力者 中村諒子 岐阜大学応用生物科学部学生  
研究協力者 加納 暎 日本大学生物資源科学部准教授  
研究協力者 村田浩一 日本大学生物資源科学部教授

研究要旨：飼育下のペンギンは種々の感染症に抵抗性が低いとされる。したがって、鳥インフルエンザや西ナイル熱の侵入に際して最初の感染鳥類の一つになることが予想されるが、病勢鑑定のための病理学的背景データは十分に蓄積されていない。ペンギンでみられる背景病変について、病理組織学的検索を行った。検索材料として、2000年から2008年に岐阜大学に送付されたペンギン目54例を用いた。死因として最も多かったのは、鳥マラリア症およびアスペルギルス症を含む感染症であった。その他、増殖性病変、全身性アミロイド症、心疾患、鉛中毒などがみられた。背景病変としては、老齢性変化、肺における炭粉沈着、膀胱におけるランゲルハンス島過形成が高率に認められ、そのほか、黄色脂肪症などがみられた。鳥マラリア症が疑われた症例においては、これまでに報告のある、肝臓および脾臓などの臓器における網内系細胞の増加以外に、肝臓における巣状壊死や肝炎がみられた。また、アスペルギルス症については、気嚢に付着した真菌をPCR法にて同定した結果、*Aspergillus fumigatus*が検出された。いずれの感染症も、単独で発症していることは少なく、炎症性疾患や、アミロイド症を併発していた。また、換羽や育雛の時期の疾病発生率が高かったことから、これらの時期における免疫力の低下が重篤な疾病発生に関わっていると考えられた。

A. 研究目的

ペンギンは、南半球に生息する一群の飛べない鳥の総称であり、ペンギン目ペンギン科に属する。食性は肉食性で、魚類、甲殻類、頭足類などを海中で捕食する。ペンギンの分類は、学者や団体によって考え方が異なり、国際自然保護連合のリストでは25種と亜種が記載されている。ペンギンは、世界各地の動物園、水族館で飼育されている。特に日本は、1915年に、上野動物園で初めてペンギンが飼育展示されて以来、南氷洋の漁船が多くペンギンを持ち帰ったことや、繁殖技術が向上したことなどによ

り、その数が増加し、2008年の時点で11種、約3400羽が飼育されている。これは、世界で飼育されているペンギンの約1/4を占めている。日本でペンギンを飼育している動物園・水族館は、2008年現在、109園館ある。飼育されているペンギンの種類は、エンペラーペンギン、キングペンギン、アデリーペンギン、ジェンツーペンギン、ヒゲペンギン、フンボルトペンギン、ケーブペンギン、マゼランペンギン、マカロニペンギン、イワトビペンギンおよびコガタペンギンであり、それぞれの亜種も存在する。南極・亜南極のペンギンの飼育には低温に

する設備が必要だが、フンボルトペンギン、ケープペンギン、マゼランペンギンなどの温帯ペンギンは地方によっては屋外飼育も可能である。現在、地球の自然環境は、人間による開発で加速的に触まれている。そのような中で、野生のペンギンは、レッドリストにおいて10種が絶滅危惧種、2種が準絶滅危惧種に分類され、絶滅の危機にさらされている。そのうち、フンボルトペンギンは、1993年の時点で野生に1万羽しかないとされているのに対し、国内では2005年の時点で1544羽飼育されている。

ペンギンは、アスペルギルスを始め感染症に対する感受性が高いとされている。飼育下のペンギンでは、飼育環境の不備によりアスペルギルス感染の機会が著しく増大する。近年では、国内数施設で飼育されているペンギン50羽のうち27羽が鳥マラリアに感染していたという報告もあり、屋外飼育との関連が示唆される。また、ペンギンは、他の鳥類とは異なる生態を示す。中でも、換羽には膨大なエネルギーが費やされるため、体力が低下し、疾病発生が誘因されると考えられる。しかし、これらの示唆されている事項を含め、飼育下で発生するペンギンの疾病について、詳細は明らかになっていない。

本研究では、鳥インフルエンザや西ナイル熱の侵入に際して最初の感染鳥類の一つになることが予想されるペンギン目について(図1)、疾病鑑別のための病理学的背景データを収集する目的で検索した。さらにペンギンに好発するアスペルギルス症について病理発生および予防につき検討した。

## B. 研究方法

検索材料は、2000年から2008年9月までに岐阜大学獣医病理学教室に送付された各種ペンギン54例である。これらの材料は、国内の園館で飼育されていたペンギンであ

り、全身材料あるいは主要臓器のホルマリン固定材料として送付された。これらの内訳は、フンボルトペンギン (*Spheniscus humboldti*) 35例、キングペンギン (*A. patagonicus*) 7例、ケープペンギン (*S. demersus*) 4例、マカロニペンギン (*Eudyptes chrysolophus*) 4例、イワトビペンギン (*E. chrysocome*) 4例であった。性別は、雄22例、雌28例、性別不明4例であった。ペンギンの産地については、各園館で繁殖し飼育していたものが19例、他の園館から搬入したものが12例、野生個体を捕獲し飼育していたものが2例、由来不明が21例であった。

### 1). 病理学的検査

斃死ペンギンは、各園館で解剖され、採取した主要臓器および病変部位を10%中性緩衝ホルマリン溶液あるいは10%ホルマリン溶液にて固定後、当研究室に送付された。肉眼所見は、園館から送付された依頼書の記載事項を参考にしてまとめた。6例のペンギンは死亡後冷蔵保存あるいは冷凍保存にて当研究室へ送付され、剖検し肉眼観察を行った後、主要臓器を採材し、10%リン酸緩衝ホルマリン溶液にて固定した。ホルマリン固定した臓器は、定法に従いパラフィン包埋し、ミクロトームにより3 $\mu$ mの厚さで薄切し、パラフィン切片を作製した。組織切片は、定法に従いヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を施し、光学顕微鏡にて観察した。

### 2). 分子病理学的検査

#### (1) 鳥マラリア症

病理組織学的検索にて、鳥マラリア症である可能性が極めて高いと診断された症例について、肝臓のパラフィンブロックを用いて、ポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction; 以下 PCR) による確定診



断を試みた。肝臓は、約2ヶ月間、動物園で10%ホルマリン溶液に浸漬され、岐阜大学に送付された後、約5年間、10%リン酸緩衝ホルマリン溶液に浸漬されていた。2ヶ月浸漬された肝臓のパラフィンブロックおよび5年浸漬された肝臓のパラフィンブロックを、それぞれマイクロームで10 $\mu$ mに薄切したものを3枚、1.5ml チューブに容れ、材料とした。DNA抽出には、TaKaRa DEXPAT™を使用した。チューブに、DEXPAT 0.5mlを添加、100°Cで10分加熱、12,000rpmで10分遠心し、抽出されたDNA溶液をPCRに供した。PCRには、TaKaRa Ex Taq (Mg<sup>2+</sup> free Buffer) もしくは puRe Taq Ready-To-Go-PCR Beads (GEヘルスケア)を用い、方法についてはメーカーの使用説明書に従った。ポジティブコントロールには、血液塗抹の鏡検で感染を確認し、かつPCR陽性であり、シーケンズによる塩基配列の決定からマラリア原虫であることを確認済みであるペンギンの血液より抽出したDNAを用いた。条件設定は、論文に従い、Applied Biosystems もしくは PCR Thermal Cycler (TaKaRa)を用いて、*Plasmodium* spp. および *Haemoproteus* spp. の187bp (SSU rRNA)、478bp (mtDNA cyt b) および673bp (mtDNA c y t b) を目的とした遺伝子増幅を行った。

遺伝子増幅の確認は、1.5%アガロースゲル(ニッポンジーン、AgaroseS)に、メーカーのEZLoad Molecular Ruler 100bp (Bio-Rad)と共に電気泳動したものを、エチジウムブロマイド染色した後、ゲル撮影装置プリントグラフ(ATTO)によるUV照射にて行った。

## (2) アスペルギルス症

アスペルギルス症が散発しているマカロニペンギン(No. 49など)の飼育施設で飼育されているペンギンの血清59検体を用

いて検索した。ラテックス凝集反応法(バイオラッド社、パストレックス®アスペルギルス)およびELISA(酵素免疫測定法)(バイオラッド社、プラテリア®アスペルギルス)による、血清中の可溶性アスペルギルス抗原である多糖体のガラクトマンナンの検出をメーカーの使用説明書に従って行い、アスペルギルス症の発生状況を検索した。

また、No. 49については、気嚢に付着していた菌体を分離し、プライマーに *benA* を用いてPCRを行った後、*Aspergillus fumigatus* の $\beta$ -tubulin 遺伝子について、解析を行い、一致しているか検索した。

## C. 結果

### 1) 死亡年齢

幼鳥の時期に死亡したペンギンは、フンボルトペンギン9例、ケープペンギン1例の計10例であった。今回の検索で、若鳥の時期に死亡したペンギンはいなかった。成鳥の時期に死亡したペンギンはフンボルトペンギン21例、キングペンギン5例、ケープペンギン2例、マカロニペンギン3例およびイワトビペンギン1例の計32例であった。死亡した全個体の割合で見ると、幼鳥は18.5%(10/54)、成鳥は59.3%(32/54)、不明は22.2%(12/54)であった。

### 2) 背景病変-各臓器における病理組織学的所見

検索は54検体について行った。全身性疾患として、鳥マラリア症が幼鳥で1例、成鳥で7例の計8例(8/54、14.8%)で認められた。全身性アミロイド症が成鳥で7例(7/54、13.0%)認められた。骨髄性白血病およびリンパ性白血病が幼鳥で1例、成鳥で3例の計4例(4/54、7.4%)認められた。アスペルギルス症が幼鳥で2例、成鳥で3例の計5例(5/54、9.3%)で認められた。敗血症、黄色脂肪症および骨格筋の変性がそれぞれ成鳥1例でのみ認められた。



また、加齢性の変化が、成鳥の 16 例 (16/54、29.6%) で認められた。

#### ① 鳥マラリア症

鳥マラリア症と診断された検体のうち、フンボルトペンギンの幼鳥が 1/9 例 (各種ペンギンにおける検索検体数に対する発生率; 11.1%)、成鳥が 4/26 例 (15.4%)、キングペンギンの成鳥が 1/7 例 (14.3%)、マカロニペンギンの成鳥が 1/4 例 (25.0%) およびイワトビペンギンの成鳥が 1/4 例 (25.0%) であった。

鳥マラリア症に関連した変化は肝臓に認められた。肝臓では、黒褐色色素を貪食したマクロファージの浸潤、活性化クッパー細胞による多量のヘモジデリンを貪食がほとんどの感染例で認められた。また、一部では肝臓に肉芽腫が形成され、類洞内に原虫様の類円形偽嚢胞が多数認められた (図 2)。脾臓、肺および腎臓への黒褐色色素の沈着、黒褐色色素貪食マクロファージの浸潤もしばしば認められた (図 3)。

#### ② アスペルギルス症

アスペルギルス症が病理組織学的に確定診断されたのは、フンボルトペンギンの幼鳥 1/9 例 (11.1%)、成鳥 2/26 例 (7.7%)、ケープペンギンの幼鳥 1/1 例 (100%) およびマカロニペンギンの成鳥 1/4 例 (25%) の 5 例であった。

中でも、1つの水族館で、2008 年夏に、相次いで 3羽のペンギンがアスペルギルス症によって死亡していた。それらのペンギンは、マカロニペンギン (雄、成鳥)、フンボルトペンギン (雄、幼鳥) およびフンボルトペンギン (雌、成鳥) である。

館内工事のために、仮収容施設へ移動させ飼育していたところ、移動から 1ヶ月程して、一般状態不良に陥った。アスペルギルス症を疑い、以降 1ヶ月間、抗真菌剤などによる治療が実施されたが、死亡した。解剖学的検査で、気嚢をはじめ、腹腔内臓

器が多量の真菌様病変で覆われていた (図 4)。肺は、硬度を増し、暗赤色～黄褐色を呈し、辺縁にはゴマ粒大の黄色斑が散在していた。同様の結節が腎臓にも認められ、肝臓は腹膜と癒着していた。組織学的には、肺に多中心性の壊死巣が認められ、壊死巣内に多数の真菌の菌糸 (図 5) が認められた。気嚢は高度に肥厚し、表層に頂嚢を含む菌糸が多量に付着していた。その他、心外膜炎、腎臓における真菌性包膜炎、食道周囲組織の巣状壊死および腹膜炎が認められた。

#### ③ 全身性アミロイド症およびアミロイド沈着症

全身性アミロイド症およびアミロイド沈着症は、フンボルトペンギンの成鳥 7/26 例 (26.9%) で認められた。

アミロイドは、組織学的に HE 染色において弱好酸性の均質無構造の物質で、心臓、脾臓、肝臓、膵臓、腎臓、副腎などの臓器において、細胞外へ沈着していた。

#### ④ 白血病

白血病は、フンボルトペンギンの幼鳥 1/9 例 (11.1%) および成鳥 3/26 例 (11.5%) で認められ、3例では骨髄性白血病が疑われ、他の 1例はリンパ性白血病と診断された。

#### ⑤ 黄色脂肪症

黄色脂肪症は、キングペンギンの成鳥 1/7 例 (14.3%) で認められた。腹腔内に腫瘤が認められ、組織学的には、その腫瘤には脂肪細胞の変性壊死がみられ、黄色のセロイド色素を貪食したマクロファージの浸潤が認められた。マクロファージは融合し、大型のセロイド色素を含む異物型巨細胞も多数出現していた。

## ⑥ 老齢性変化

病理学的な変化として、組織・臓器の萎縮、軟骨の骨化生、血管壁の膠原および弾性線維の硬化、心筋線維および副腎におけるリボスチン沈着、脳における神経細胞の脱落、グリア細胞の増加、リボスチンの沈着などの老齢性変化が、フンボルトペンギンの成鳥 11/26 例 (42.3%)、キングペンギンの成鳥 2/7 例 (28.6%)、ケープペンギンの成鳥 1/3 例 (33.3%) およびマカロニペンギンの成鳥 2/4 例 (50.0%) で認められ、それらの個体の年齢は、11 歳～30 歳 3 ヶ月であった。

## 2). 分子病理学的検査

### (1) 鳥マラリア症

2 ヶ月ホルマリン浸漬された肝臓のパラフィンブロックおよび 5 年浸漬された肝臓のパラフィンブロックにつき検索したが、いずれにおいても、*Plasmodium* spp. および *Haemoproteus* spp. の遺伝子増幅は確認されなかった。

### (2) アスペルギルス症

ラテックス凝集反応法および ELISA による、血清中アスペルギルス抗原の検出は、59 検体のペンギンについて、ラテックス凝集法では全て陰性であった。しかし、ELISA では、2 検体が陽性を示した。検体には、アスペルギルス症で死亡した No. 49 の血清も含まれていた。死亡前日、4 日前、13 日前および 23 日前の血清につき検索を行ったが、いずれも陰性であった。また、No. 49 の気嚢から分離培養した真菌は、形態学的に *Aspergillus fumigatus* と考えられた (図 5)。また、*A. fumigatus* の  $\beta$ -tubulin 遺伝子の塩基配列は、

TGGGATCTCTCATCTTAGCAGGCTACCTCCATGGGTTCCAGCCTCACTGTCATGGGTATCAGCTAACAAATCTACAGCGACCATCTCTGGTGGAGCATGGCCTTGACGGCTCTG

GCCAGTAAGTTCGACCTATATCCTCCAATTGAGAAAAGCGGCGGAAACACGGAAAACAAGGAAGAAGCGGACCGGTGTCTGATGGGAAATAATAGCTACAATGGCTCCTCCGATCTCCAGCTGGAGCGTATGAACGTCTATTTC AACGAGGTGTGTGGATGAAACTCTTGATTATACTATTTCGGCAACATCTCAGATCTGACTCGCTACTAGGCCAACGGTGACAATATGTTCTCTGTCGGCTTCTGGTCGATCTCGAGCCTGG

であった。ホモロジー解析によって、*A. fumigatus* と 100% の相同性を示した。

## D. 考察

### 1) 検体の死亡年齢について

死亡した全個体の割合でみると、幼鳥は 18.5% (10/54)、成鳥は 59.3% (32/54) であり、成鳥の時期に死亡する個体が半数以上を占めた。ペンギンの平均寿命は、野生化においては 10 年程度に過ぎないが、幼鳥の生存率は南極に住むほとんどの種では比較的高いとされている。今回の検索から、幼鳥の時期が 5 種のペンギンの中では最も長いフンボルトペンギンでも 1 年であることを考慮すると、1 年あたりに死亡するペンギンの数は 0～1 歳で 10 羽、2～10 歳では年に 3 羽以上死亡する計算になり、割合としては、幼鳥の時期に死亡するペンギンが多いと考えられた。このことから、野生化においては、ペンギンは適した環境を自ら探し、そこに住むことができ、親鳥が天敵から守ってくれるが、飼育下では、天敵はいないものの、環境は選べないので、適応できなかった場合は死亡してしまう可能性がある。一方、成鳥については、死亡時の年齢が野生下での平均寿命 10 歳を上回っていた個体が 32 羽中 24 羽 (75.0%) であった。中には 30 歳を越えるペンギンもみられた。幼いうちに、環境に適応できたペンギンは、餌環境に恵まれ、天敵のいない場所で、このように長生きが可能になったと考えられる。また、換羽や育雛の時期の



疾病発生率と死亡率が高かったことから、これらの時期における免疫力の低下が発生するので蚊で媒介される西ナイル熱の伝播に際しては留意すべき点と考えられた。

## 2) 背景病変について

### ① 鳥マラリア症

鳥マラリア症は、鶏においては、*Plasmodium gallinaceum* および *P. juxtannucleare* によるものが知られている。剖検時の特徴は、肝臓および脾臓が暗黒褐色を呈することと、脾腫である。また、全身の網内系細胞は増殖し、肝臓および脾臓ではマラリア色素の沈着がみられる。心筋、胸腺、皮下、筋肉および小腸漿膜面に小出血斑がみられる。診断は、末梢血液の塗抹ギムザ染色標本の鏡検で、赤血球内のシズント、トロホゾイトやガメトサイトの確認によって行う。ペンギンは、マラリア原虫に罹患しやすく、罹患した場合、未治療であれば死亡率が 50~60% に登る重要な疾患である。しかし、病理学的な報告は乏しく、診断法においても、赤血球内にはあまり虫体がみられないとされており、PCR による診断が行われている。実際、予防的に血液塗抹検査および PCR によるマラリア検査を行っている園館では、血液塗抹検査で陰性だった個体でも、PCR では陽性になる場合が多かった。

鳥マラリア症のペンギンは病理組織学的に、肺、脾臓、肝臓、脳およびその他臓器の内皮細胞にシズントが認められるとされているが、今回鳥マラリア症が疑われたのは、特に、肝臓において黒褐色色素を貪食したマクロファージあるいはクッパー細胞が多数認められた場合であった。これは、マラリアの赤内型原虫内に、虫体が血色素を利用した終末産物として認められる黄褐色の顆粒であるマラリア色素である可能性が高いと考えられた。しかしながら、血液

塗抹および組織における、マラリア原虫の検出頻度は、ギムザ染色を行ったとしても極めて低く、やはり、PCR による診断に最も有用性があった。そこで、剖検後の組織学的診断によって、マラリア症が疑われた場合に、パラフィンブロックからの PCR 診断が行えないか検索を行った。その考察は、分子病理学的検索の項で述べる。組織学的な特徴としては、これまでに言われている、肝臓および脾臓といった臓器における網内系細胞の増加以外に、肝臓における巣状壊死、肝炎および髄外造血がみられた個体があった。巣状壊死においては、細胞死が急速に訪れ細胞内のゾル状蛋白質の不活化が細胞質全体にわたり生じ、細胞が干からびた状態になった凝固壊死がみられ、鳥マラリア症が急性感染症であることが示唆された。

鳥マラリア症の発生の要因としては、いずれの症例も鳥マラリア症に特徴的とされる病変だけでなく、出血性腸炎、気嚢炎、肝炎、敗血症、アミロイド症、総排泄腔炎、化膿性腹膜炎、慢性気管支肺炎、心内膜炎、心筋炎、心外膜炎、胸腹膜炎および間質性腎炎といった背景病変あるいは、高度な老齢性変化を有していたことから、もともとマラリア原虫に罹患しやすいことに加え、基礎疾患により抵抗力が低下していた個体に感染し、急性症状を呈して死亡するケースが多いようであった。

今回、鳥マラリア症は、フンボルトペンギン、キングペンギン、マカロニペンギンおよびイワトビペンギンに認められ、種特異性はみられなかった。また、マラリア原虫を媒介するのは蚊であるため、屋内あるいは屋外という飼育環境の違いによって、発生に差があるかどうかを検索したが、室内で飼育されるキングペンギンおよびマカロニペンギンにおいても感染が疑われた症例は存在した。しかし、屋外で飼育される



ペンギンには、野鳥との接触がみられる園館も存在し、蚊を介した、ペンギンから野鳥への伝播、あるいは野鳥からペンギンへの伝播が危惧される。PCR による健康診断を実施し、早期のマラリア治療を行うことが必要である。

## ② アスペルギルス症

アスペルギルス症は、主に *Aspergillus fumigatus* が原因となって起こる呼吸器病である。鳥類における真菌症は、ペンギン目で多く認められることが以前から知られており、その原因は日和見感染で、腫瘍などの基礎疾患やステロイド剤投与によって宿主の感染抵抗力の低下した成鳥や、抵抗力の減弱した雛などに発生がみられる。

病理学的な特徴として、鶏では気管支、肺、気嚢に黄色から灰黄色の結節病巣を形成することが知られており、今回検索したペンギンにおいても同様の結節が認められた。組織学的には、壊死性化膿性または肉芽腫性の病変がみられると言われているが、検索結果も一致していた。肺においては、壊死性化膿性病変、気嚢においては肉芽腫性の病変が形成される傾向にあり、気嚢炎が認められた症例の多くはアスペルギルス症であった。また、気嚢炎が認められた症例のうち、アスペルギルス症でないものは、原因として、細菌性の気嚢炎あるいは、心外膜炎の波及によるものが考えられた。

アスペルギルス症の診断において問題となると考えられたのは、肉眼的な診断である。今回、各園館で剖検によってアスペルギルス症が疑われたが、当研究室の病理組織学的検査によって、細菌性が疑わしい慢性化膿性気嚢炎や、化膿性気管支肺炎という診断が出た症例が3例あった。特に、細菌性であっても、高度な病変が形成されている場合は、肉眼的にアスペルギルス症と判断してしまう症例があると考えられる。死亡

する前から、アスペルギルス症を疑い、抗真菌薬による治療を行っている症例もみられたが、治療を行う際には、培養による確定診断も並行して行い、アスペルギルス症でなかった場合は、治療方法の検討を再度行うべきである。

## ③ 全身性アミロイド症

今回、6例のペンギンで、各臓器にアミロイドの沈着が認められた。アミロイド症とは、線維構造をもつ特異な蛋白質であるアミロイド線維からなるアミロイド物質が、種々の原因によって細胞外に沈着し、組織や臓器の機能異常を生じる疾患群である。すなわち、通常可溶性である蛋白質が様々な原因によりアミロイド線維に変わり、種々の臓器および組織に沈着することである。鳥類においては、ホワイトペンギンダック、ハクチョウ、その他のガンカモ科、水鳥、家禽、七面鳥およびフラミンゴなどで認められている。そのほとんどは、ヒトにおける二次性あるいは反応性の AA アミロイドーシスに一致するものである。

## ④ 老齢性変化

飼育下のペンギンにおける平均寿命が長いということは述べてきたが、実際の影響については、老齢性変化の点から考察する。老齢性変化は、全体の29%に認められた。野性化での寿命である10歳までは、老齢性変化は認められないが、それ以上になると、発生率の増加がみられた。15歳以上になると、その発生率は75%を越える。

老齢性変化を発現する個体では、同時に心内膜炎、肺炎、肺胸膜炎、肝炎、食道炎、胃炎、腸炎および腹膜炎といった炎症性病変が認められる場合が多かった。また、老齢性変化のみられた個体の死因は、不明なものを除くと腫瘍、心疾患、感染症であった。高齢化の進んでいる日本人における3

大死因は、悪性新生物、心疾患および脳血管疾患であるが、このことから、ペンギンにおいても、高齢個体は、腫瘍あるいは心疾患で死亡する可能性が高いと考えられた。また、不明のものについては、老衰による死亡と考えられた。

#### ⑤黄色脂肪症

黄色脂肪症は、ネコ、ブタなどで不飽和脂肪酸含量の高い飼料の過剰摂取と $\alpha$ -トコフェロール（ビタミン E）の欠乏によって起こり、皮下や腹腔内の貯蔵脂肪が過酸化および変性し、セロイド色素の沈着と炎症反応が認められる疾患である。これまでに、鳥類およびペンギンにおける報告はない。不飽和脂肪酸は、アジ、イワシ、サバなどの青魚に多く含まれており、園館で飼育されているペンギンにも給餌されている可能性がある。ビタミン E の飼料添加物を、魚と一緒に与えることで予防可能になると考えられる。

#### E. 結論

飼育下のペンギンは種々の感染症に抵抗性が低いとされる。したがって、鳥インフルエンザや西ナイル熱の侵入に際して最初の感染鳥類の一つになることが予想されるので、病勢鑑定のための病理学的背景データを蓄積した。死因として最も多かったのは、鳥マラリア症およびアスペルギルス症

を含む感染症であった。その他、全身性アミロイド症などがみられた。また、アスペルギルス症については、気嚢に付着した真菌を PCR 法にて同定した結果、*Aspergillus fumigatus* が検出された。いずれの感染症も、単独で発症していることは少なく、炎症性疾患や、アミロイド症を併発していた。また、換羽や育雛の時期の疾病発生率が高かったことから、これらの時期における免疫力の低下が発生するので蚊で媒介される西ナイル熱の伝播に際しては留意すべき点と考えられた。

#### F. 健康危機情報

特になし

#### G. 研究発表等

学会発表

1. 「ペンギンの背景病変」柳井徳麿、中村涼子、村上麻美、酒井洋樹、柵木利昭、加納壘、村田浩一。日本内科学アカデミー・日本獣医臨床病理学会 2009 年大会（2009 年東京）

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

#### I. 特許取得

なし。

#### j. 実用新案登録

なし。

#### K. その他

なし。

図の説明



図1 野鳥との接触、蚊による吸血により鳥インフルエンザ、ウエストナイル熱の感染は想定される。

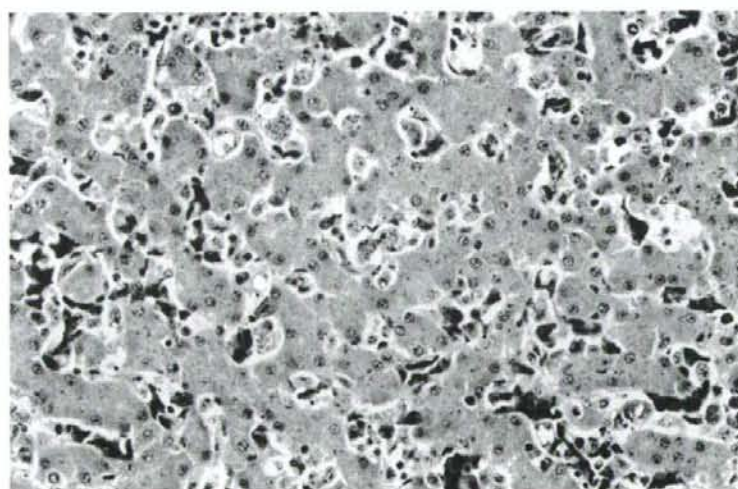


図2 鳥マラリア症に罹患したペンギンの肝臓。多数のマラリアのシizontが認められる。HE染色。



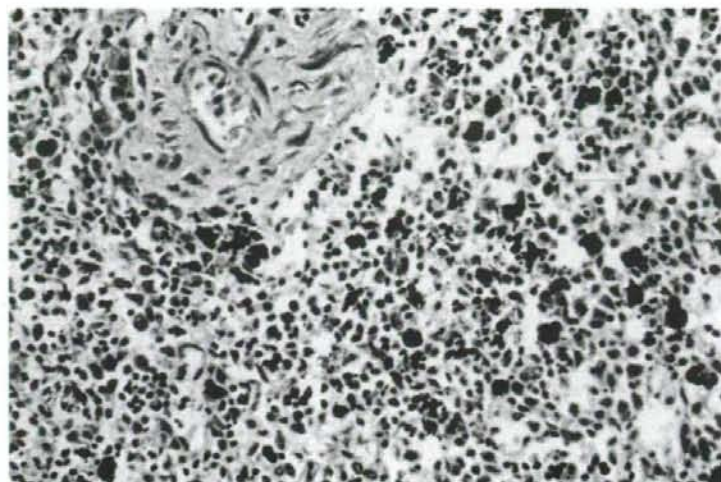


図3 鳥マラリア症に感染したペンギンの脾臓。黒褐色の色素沈着が高度。  
HE染色。



図4 アスペルギルス症に罹患したペンギン。胸部気嚢に多量の真菌菌糸が認められる。

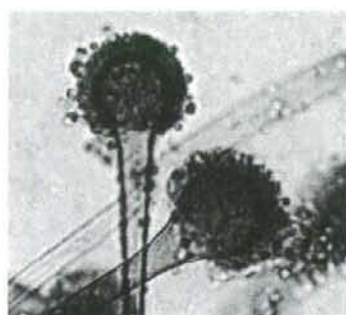


図5 アスペルギルスに特徴的な頂囊が認められる。

## 厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症事業）

野生動物の感染症：愛玩・展示鳥における鳥抗酸菌症のサーベイ、特に *Mycobacterium genavense* 感染について

### 分担研究報告書

研究分担者 柳井徳磨 岐阜大学 応用生物科学部 教授

研究協力者 酒井洋樹 岐阜大学 応用生物科学部 助教

研究協力者 福田真弓 岐阜大学 応用生物科学部 学生

研究協力者 真田靖幸 Companion Bird Laboratories 所長

研究協力者 小嶋篤史 鳥と小動物の病院リトルバード 院長

研究要旨：我が国の愛玩鳥あるいは動物園展示鳥類における鳥抗酸菌症に着目して、その病態と感染経路について検索した。過去に鳥抗酸菌症と診断された 16 例の全例に *Mycobacterium (M) genavense* 感染の特徴とされる巣状～瀰漫性の肉芽腫性病変が認められ、*M. avium* 感染の特徴とされる乾酪壊死を伴う肉芽腫は認められなかった。PCR による分子生物学的にも 10 例中 8 例で *M. genavense* (MG) 感染が示唆された。MG 感染症は見過ごされる可能性があり、同居感染が持続し死亡が続く可能性ある。

動物園に集団発生したウスユキバトの鳥抗酸菌症 23 例の検索では、全例で肺感染が認められた。過密飼育であり、環境中の菌の濃度が高かったことから、エアロゾルによる経気道感染が示唆された。微生物学的検索と分子生物学的検索により MG が分離同定され、同様の組織像を示したことから、ウスユキバトの同一群は全例が MG に感染していたと考える。

我が国では鳥抗酸菌症の発生は散発的とされているが、MG 感染では症状が明確ではなく、肉眼所見も見逃されるケースが多いので実際の発生は多いと推測される。我が国でも鳥抗酸菌症では MG が優勢菌となりつつある。

### A. 研究目的

鳥類の抗酸菌症は、従来 *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC) が主要な起因菌であるとされてきた。しかし、1993 年以降、欧米の愛玩鳥や動物園展示鳥において *M. genavense* (MG) 感染の報告が相次いでいる。

*M. genavense* (MG) は、1992 年に後天性免疫不全症候群 (AIDS) 患者から分離、同

定された比較的新しい *Mycobacterium* 属菌である。従来から抗酸菌培養に用いられてきた小川培地や Middlebrook 7H10 培地のような固形培地では発育せず、培地の選好性があり、pH を調整した Middlebrook 7H9 液体培地など、特殊な液体培地を用いる必要がある。培養には 6～8 週間を要する。そのため、迅速診断として各種材料からの PCR による診断が多い。欧米では、免疫抑制状



態の患者において *M. genavense* (MG) の感染報告が増加している。動物における感染は、1993年に愛玩鳥6羽において初めて報告された。その後、ベルギーの動物園飼育鳥における報告や様々な鳥で報告があり、哺乳類ではフェレット、イヌ、ネコ、ウサギにおける感染も報告されている。スイスの愛玩鳥における調査では、剖検された愛玩鳥の3.8%に抗酸菌症が認められ、そのうち71.8%がMGによるものであった。イタリアでは、愛玩鳥の抗酸菌症の95.8%がMGであった。日本では、2005年に初めてMG感染症の報告が動物園飼育鳥、愛玩鳥、野鳥においてなされたが、疫学的情報に乏しい。本研究は以下の2点に着目して、我が国の動物園および愛玩鳥におけるMGの感染状況と疫学を調べた。

1) 過去に鳥抗酸菌症と診断された症例について、組織学的特徴および遺伝子学的検索から *M. genavense* (MG) が起原菌かどうかを検討した。さらに動物園獣医師と鳥類臨床獣医師のMG感染症への関心度や認識度のアンケート調査、飼育管理状況の調査を行った。

2) 動物園におけるMGの集団発生につき、病理、細菌および疫学的に検討した。

## B. 研究方法

抗酸菌症と診断された動物園飼育鳥および愛玩鳥について、病理組織学的特徴を比較・検討し、さらにパラフィン組織と臓器乳剤からのリアルタイムPCR、PCR-RFLPにて起原菌の検索を行った。一部の例では凍結材料乳剤から菌培養も試みた。また、全国の動物園獣医師、鳥類臨床獣医師にアンケートを行い、抗酸菌症への関心度やMGの

認知度の調査と症例情報の収集を行った。

### (1) 病理組織学的検索

過去に鳥抗酸菌症と診断された種々の鳥類16例、さらにK動物園で集団発生した鳥抗酸菌症例23例についてHE染色標本作製し、それぞれの病理学的特徴を検索した。さらに抗酸菌のためのチール・ネルゼン(ZN)染色を施し鏡検を行った。

### (2) 微生物学的検索

糞便および剖検時に採取した凍結材料(肝臓)の乳剤50μlから培養を行った。糞便は、1gを20mlの滅菌蒸留水で希釈し、30分間混合攪拌した。30分間静置後、上清5mlを25mlの0.6%ヘキサデシルピリジニウムクロライド(HPC)水溶液と混合し、一晚室温に静置した。凍結材料乳剤は直接培地に接種した。培地はMiddlebrook 7H10 Agar medium with mycobactin and egg yolkを作成した。臓器乳剤は上清を直接培地に接種した。37℃炭酸ガス孵卵器内で10週間培養した。

### (3) 分子生物学的検索

パラフィンブロックあるいは凍結材料からリアルタイムPCRでMG特異的配列の増幅を行った。検体の一部では、臓器乳剤から *Mycobacterium* 属菌に特異的な65kD-heat shock protein 遺伝子(*hsp65*)をターゲットとしたPCRを行い、制限酵素断片長多型(RFLP)解析を実施した。

### (4) アンケート調査

抗酸菌症症例の情報収集と、*M.*

*genavense* (MG) に関する認知度を知らため、日本動物園水族館協会加盟の動物園および愛玩鳥類の臨床に関心の高い動物病院を対象にアンケート調査を実施した。

### C. 研究結果

[1] 国内における愛玩鳥および飼育展示鳥類の抗酸菌症に関する回顧的研究

#### 1) 病理組織学的検索

岐阜大学および Companion Bird Laboratories (CBL) に保管されていた鳥類の抗酸菌症の 16 例 (表 1) について病理学的特徴を検索した。その内訳は 1998 年～2008 年に動物園 3 施設より診断を依頼された展示飼育鳥 4 例、2003～2008 年に剖検依頼があった愛玩鳥は 12 症例であった。

検索した 16 例の全例において種々の臓器および組織に肉芽腫性病変の形成が認められた。肉芽腫は主としてマクロファージ (類上皮細胞) の巣状～瀰漫性浸潤であり、*M. avium* 感染の特徴とされる乾酪壊死を伴う肉芽腫は認められなかった。肝臓では肉眼的に微細な斑状の病変がみられ、組織学的に明らかな肉芽腫形成が 9/16 例でみられた (図 1、2)。肺でもしばしば肉芽腫性病変が認められた (10/16 例)。腸粘膜では固有層の肉芽腫が 12/16 例にみられた。高度感染例 (7 例) では、粘膜固有層においてヨーネ病の組織像に類似した肉芽腫性腸炎 (図 3) がみられた。心臓には軽度な感染が 4/16 例にみられた。脾臓では 4/16 例に瀰漫性肉芽腫の形成がみられた。皮膚では 4 例に肉芽腫性腫瘍がみられた。検索された 16 例の鳥抗酸菌症例の病変分布と組織学的特徴は、いずれも主としてマクロファージ (類上皮細胞) の集簇から成ってお

り、しばしば類上皮細胞の周囲にリンパ球、形質細胞の集簇や少数の偽好酸球浸潤がみられた。この組織像は、これまでの MG 感染の報告と一致していた。

#### 2) 分子生物学的検索

PCR による分子生物学的検索で、MG 感染が示唆されたのは検索した 10 例中 8 例であった (表 1)。

#### 3) アンケート調査

アンケートの有効回答は 49 園館からの 77 人、および鳥類臨床獣医師 21 件・31 人であった。

動物園獣医師において、MG を知らないという回答は 41/77 人 (53.2%) に上り、一方、菌の性状や肉眼所見、組織所見について 18/77 人 (23.4%) が認識していた。剖検は 41/49 施設 (83.7%) で行われていたが、組織検査を死亡例の全てで行っている園館は 1 施設のみで、他は任意で行われている (40 園館、81.6%) か、組織検査までは行わない施設 (8 園館、16.3%) もあった。鳥類臨床獣医師では、MG の性状や症状、剖検所見や組織所見についての認知度は高く、診察時に抗酸菌症を鑑別リストに入れているという回答が多かった。

各症例に同居鳥がいるかどうかについて調べたところ、ほとんどの飼い主が同じケージ内で複数羽、あるいは家庭内の別ケージで複数羽を飼育しており、同居なしという回答は 4 例であった。

#### 4) 飼育状況の現地調査および聞き取り調査

鳥抗酸菌症が発生した I 動物園と救護シェルターにおいて飼育環境、発生前後の対



応などについて実地調査を行った。

#### <I 動物園>

九州のI動物園でオオハシの1例(No.6)が、粘血便を示して後約2ヶ月後に死亡した。糞便の培養では抗酸菌陰性であったが、同塗抹の染色では陽性であった。オオハシ舎は南西向きの屋外型金網ケージで、ネズミや野鳥の侵入を防ぐのは困難であり、スズメの糞害が深刻であった。地面は土で、多くの植栽があり、舎内は日陰がちであった(図4)。同居あるいは隣接ケージの個体では、2003年4月にはシロムネオオハシが抗酸菌症で死亡、2005年1月にクリハシオオハシが *Yersinia pseudotuberculosis* 感染の疑いで死亡、2008年1月にシロムネオオハシが粘血便を排泄し死亡していた。

#### <救護シェルター(千葉県)>

大型、中型のオウム・インコは種ごとに飼育され、中庭に面した部屋にいた。白色オウムが右側の飼育舎に、オカメインコやボウシインコは左側の飼育舎内に多数飼育されていた。セキセイインコやブンチョウなど、小型の鳥は入口に最も近い部屋で、1羽~2羽ずつが3段のラックに置かれた金網ケージで飼育されていた。いずれの飼育舎も床はコンクリートであり、水洗しやすい構造になっていた。中庭は土の地面で、屋根がついていた。この施設ではサンショクキムネオオハシ、ブンチョウ、キンカチヨウ、ジュウシマツ、セキセイインコ、ベニコソウインコの各1例において抗酸菌症がみられたが、これらの鳥は、それぞれ別の飼育舎あるいは別ケージ内で飼育されていた。別の飼育舎の鳥どうしが直接接触する機会は、中庭に放鳥する際にあるが、通常は飼育舎ごとに放鳥するとのことだっ

た。

[2] 動物園展示ウスユキバト(*Geopelia cuneata*)の一群における *M. genavense* (MG) の集団感染

#### 1) K動物園におけるウスユキバトの発生状況

K動物園にて飼育されていたウスユキバトが、2007年1月と10月に各1例づつ斃死した。これらは組織学的に抗酸菌症と診断された。2008年4月に動物園がウスユキバトの糞便を一般の臨床検査所に依頼したところ、BBL MGIT 抗酸菌システム(Becton, Dickinson and Company, NJ, USA)を利用したMGIT法にて抗酸菌陽性反応が得られた。隔離飼育や治療が困難という判断から、残る21羽は6月に安楽殺された。

#### 2) 病理組織学的検査

同じ展示舎で飼育されていた全例に鳥抗酸菌感染が認められた。斃死例2例と安楽殺例1例では全身性の高度な肉芽腫性病変が認められた。特に肺、腸粘膜および肝臓に高度な病変を形成する傾向が認められた。他の安楽死させた20例にも、軽度な肺病変がいずれにも認められた。また、一部の例では腸粘膜や肝臓に感染病変がみられた。病変は概ね、マクロファージ(類上皮細胞)がシート状に浸潤し大小の巣状~瀰漫性の肉芽腫性病変を形成していた。肺:全例で肉芽腫形成が認められた。ごく軽度~軽度感染例(19/23例)では、二次あるいは三次気管支粘膜、気管支壁に多中心性に肉芽腫が認められた。高度な感染例(4例)では、肉芽腫が組織中に瀰漫性に認められた。