

環境省
請負調査

平成 19 年度

カエルツボカビ実態把握調査検討業務報告書

平成 20 年 3 月

財団法人 自然環境研究センター

目 次

第 1 章：調査の背景と目的	1
第 2 章：カエルツボカビの生態及び日本産の両生類に与える影響についての検討	3
1. カエルツボカビ菌の生物学的特性の把握	3
2. カエルツボカビ菌が日本産の両生類に与える影響の検討	8
第 3 章：カエルツボカビの国内野外分布の把握	14
1. カエルツボカビの分布概況把握調査結果の取りまとめ	14
2. 野外での両生類の状況に関する情報収集	36
第 4 章：カエルツボカビ実態把握調査検討会の開催	37
引用・参考文献	38
巻末資料 カエルツボカビ感染状況調査実施の手順と留意点	40

図表一覧

図 1 - 1	カエルツボカビ実態把握調査検討業務の体制	2
図 2 - 1	分離された HK-17 菌株の菌体	6
図 2 - 2	分離された HK-17 菌株の空の遊走子嚢	6
図 2 - 3	感染実験の状況	9
図 2 - 4	感染群ヌマガエルの死亡時の組織像	11
図 2 - 5	死亡したヌマガエルの皮膚スワブ PCR によるカエルツボカビ DNA 量の 経時的变化	12
図 3 - 1	野外におけるサンプル採取の手順	15
図 3 - 2	綿棒によるスワブサンプルの採材・保管方法	16
図 3 - 3	調査地点図の例	18
図 3 - 4	1 次 PCR によるカエルツボカビ DNA の ITS 領域合成の原理	20
図 3 - 5	2 次 PCR によるカエルツボカビ DNA の ITS 領域合成の原理	20
図 3 - 6	ゲノム PCR 法による検査結果の一例	21
図 3 - 7	調査地点位置図	24
図 3 - 8	採取時期別サンプル数	33
図 3 - 9	採取時期別の感染率	35
表 2 - 1	カエルツボカビ分離用試料	4
表 2 - 2	感染実験候補種一覧	9
表 2 - 3	感染実験に供した種、採集地、個体数	10
表 3 - 1	野外調査における記録票の例	18
表 3 - 2	都道府県及び地方ブロックごとの調査地点数	22
表 3 - 3	都道府県及び地方ブロックごとのサンプル数	23
表 3 - 4	両生類の種ごとのサンプル数と解析状況	32
表 3 - 5	地方ブロックごとの陽性個体の率	35
表 4 - 1	カエルツボカビ実態把握調査検討会検討委員（五十音順）	37

第1章：調査の背景と目的

外来生物には、食用や観賞用、天敵導入など、人が意識的に、すなわち意図的にもたらしたものと、資材や他の生物などに随伴して、非意図的に持ち込まれるものに分けられる。後者（非意図的に導入された外来生物）はいつの間にかわが国に入り込んでいる場合が多く、導入の経路が明確でない場合も多く、その予防や防除は、意図的に導入された外来生物にも増して困難であることが多い。

平成19年11月に発行された「第三次生物多様性国家戦略」（環境省編，2007）の「野生生物の保護と管理」に係る部分では、カエルツボカビについて下記のように言及されている。

「さらに、資材や生物に付着して非意図的に侵入する外来種による生態系への影響の防止対策に取り組んでいく必要があります。例えば、輸入された外国産のカエルから確認されたカエルツボカビについては、わが国の両生類に対する影響を明らかにする必要があります。」

野生生物の体内や体表には、さまざまな病原体や寄生生物が見られる。一般に、寄主（ホスト）と寄生生物（パラサイト）の間には長い共存の歴史の中で共進化が認められ、寄主は寄生生物による影響に抵抗性を具える方向に、また寄生生物は寄主を必要以上に痛めつけない方向にそれぞれ進化し、共生的な関係を保つことが多い。それに対して、外来性の病原体はそのような共進化の過程を経ず、エイズや鳥インフルエンザ、コイヘルペスをはじめとするいわゆる新興感染症は、寄主に対して致死的で、寄主の個体群に甚大な被害をもたらす場合がある。カエルツボカビの実態を把握し、その感染経路を推測する上で、両生類に対して新興感染症を引き起こす病原体である可能性を認識する必要がある。

カエルツボカビ *Batrachocytrium dendrobatidis* はツボカビ門フタナシツボカビ目に属する1属1種の真菌であり、飼育下のコバルトヤドクガエル *Dendrobates azureus* から分離され、1999年に新属新種として記載された（Longcore et al., 1999）。本種はツボカビ門で唯一、脊椎動物に寄生するものとされ、両生類の皮膚で増殖する。アフリカ起源といわれ、妊娠検査用に広く使われたアフリカツメガエルの伝播に伴って世界に蔓延したとされる。本種が引き起こすカエルツボカビ症は新興感染症とされ、中南米やオーストラリアで両生類の急速な減少を引き起こした。カエルツボカビの生物学的、疫学的な研究はオーストラリアとアメリカ合衆国で盛んになされており、特にオーストラリアでは、分離培養されたカエルツボカビ菌を在来のカエルに接種させ、病原性の程度を調べた研究が多数なされている。

本業務は、カエルツボカビの生態を明らかにすること、国内分布の状況を把握すること、カエルツボカビ分布地域での両生類個体群の動向を調べること、カエルツボカビ菌の分離培養及び両生類に対する感染性を明らかにすることにより、カエルツボカ

ビが日本の両生類に及ぼす影響について検討することを目的とするものである。

なお、調査は下記の体制で実施するものとする。

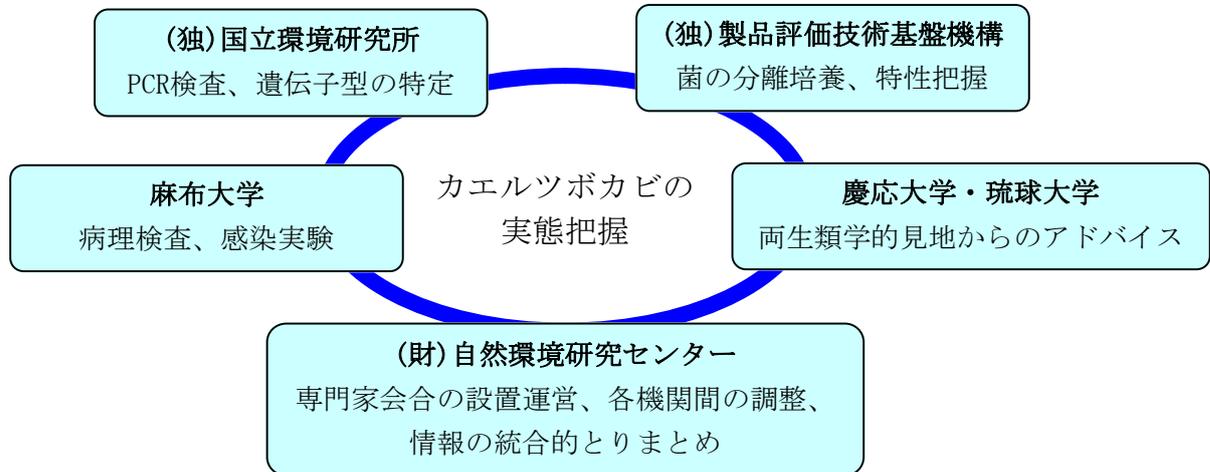


図 1-1 カエルツボカビ実態把握調査検討業務の体制

第2章：カエルツボカビの生態及び日本産の両生類に与える影響についての検討

1. カエルツボカビ菌の生物学的特性の把握

(1) 既存報告によるカエルツボカビの特性

主として海外でなされた研究により、カエルツボカビ菌は次のような生物学的特性を有していることが指摘されている（爬虫類・両生類の臨床と病理の研究会(2007)より）。

○宿主

カエルツボカビ *Batrachochytrium dendrobatidis* の種名はヤドクガエル属の1種、コバルトヤドクガエル *Dendrobates azureus* からの分離株を用いて種の記載が行われたことに由来する。しかし、*B. dendrobatidis* の宿主はヤドクガエルに限られていたわけではなく、100種以上の両生類に感染することが確認されている。また、カエル類（無尾目）だけではなく、イモリやサンショウウオ類（有尾目）にも感染することがある。

○生活環および性状

カエルツボカビの生活環は、遊走子 (zoospore) と遊走子嚢 (zoosporangium) の2形態からなり、無性生殖により増殖するとされている。カエルツボカビの遊走子嚢は表面が平滑で、球形から長球形であり、乳頭状の放出管がある。病理切片中に観察される遊走子嚢は径が6～15 μmとなる。遊走子嚢の内部には遊走子が最大300個程度入っている。遊走子は後方へ伸びる鞭毛があり、水中を遊走する。遊走子嚢から泳ぎでた遊走子が宿主に到達することで伝播する。感染は100個程度の遊走子により成立するとされる。両生類の皮膚の表面に達すると、角質層を貫通し、徐々に径が大きくなり、遊走子嚢を形成する。遊走子は乾燥により死滅する。発育の至適温度は17～25℃で、23℃が最も適しているとされる。高温に弱く、28℃で発育が止まり、30℃以上になると死滅する。

○寄生形態

ツボカビ類は一般的に土壌や淡水中に生息し、その生活様式には腐生性と寄生性(条件的寄生性あるいは偏性寄生性)がある。

ツボカビ類は分解菌あるいは腐生菌としてキチン、セルロース、ケラチンといった分解しにくい物質を利用する。花粉粒、昆虫の外骨格、原生生物や微小無脊椎動物、両生類の皮膚、他種の真菌、草木や果実、水に浸かった枝などに付着または寄生して栄養を吸収する。

カエルツボカビは既知のツボカビ類では脊椎動物に寄生する唯一の種でありケラチンを利用している。オタマジャクシではケラチンは口器にのみ分布しているの、カエルツボカビは口器にだけ寄生し、カエルツボカビが感染してもほとんど無症状であ

る。オタマジャクシは変態とともにケラチンの分布が増えてくるが、それに伴ってカエルツボカビの感染が広がり、症状が顕れるようになり、重篤な場合は死に至る。ただし、カエルツボカビ症に対する感受性はカエル種によって異なり、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) やウシガエル (*Rana catesbeiana*) は感染しても発症しないことが知られている。

(2) カエルツボカビ菌の分離培養の試み

麻布大学のカエルツボカビ菌罹患両生類の脱皮殻等を試料とし、独立行政法人製品評価技術基盤機構においてカエルツボカビ菌の分離培養実験を実施した。その結果、1 試料からの培養菌株の確立に成功した。分離された菌株の形態的特徴は既知のカエルツボカビと差異がないことが示された。また、DNA解析の結果、今回の菌株は海外で高い病原性を発揮している既報告のカエルツボカビ菌とは塩基配列に差異があり、国立環境研究所より報告されているカエルツボカビ菌のCタイプと一致した。

以下に、同法人稲葉重樹研究員による試験結果報告よりその概要をとりまとめた。

①カエルツボカビ菌感染個体サンプルからのカエルツボカビ菌の分離

a. 方法

カエルツボカビの分離培養にはLongcore et al. (1999)による純粋培養株の確立手法を一部改編して用いた。

培養に当たっては、麻布大学獣医学部より提供を受けたカエルツボカビ菌に感染した両生類組織14試料を分離源として用いた(表2-1)。日本在来両生類由来の試料は試料10(コガタハナサキガエル) 試料14(オオサンショウウオ)の2試料のみである。羅病カエルの剥離外皮組織、アフリカツメガエルの爪部、及びオオサンショウウオ個体の前肢、後肢、総排泄腔(クロアカ)の一部を試料とした。提供された試料は雑菌などが混入していたため、洗浄を行った。洗浄した試料のうち、剥離表皮組織の場合はそのまま分離用試料とした。爪部は解剖用メスやピンセットを用いて細分した。オオサンショウウオ組織の場合は、組織周囲の表皮組織をピンセットを用いて引きはがし、分離操作に供した。

表2-1 カエルツボカビ分離用試料

番号	資料提供年月日	資料番号*	試料の詳細
1	平成19年10月17日	K-3	羅病カエル由来の剥離表皮組織
2	平成19年11月30日	HK-17	羅病カエル由来の剥離表皮組織
3	平成19年11月30日	K-3	羅病カエル由来の剥離表皮組織
4	平成19年12月12日	HK-17	羅病カエル由来の剥離表皮組織
5	平成19年12月12日	K-3	羅病カエル由来の剥離表皮組織
6	平成19年12月12日	OK-4	羅病カエル由来の剥離表皮組織
7	平成19年12月12日	HK-3	羅病カエル由来の剥離表皮組織
8	平成19年12月12日	A-18	羅病カエル由来の剥離表皮組織
9	平成19年12月19日	K-4	羅病カエル由来の剥離表皮組織
10	平成19年12月19日	HK-2	羅病カエル由来の剥離表皮組織
11	平成19年12月27日	K-3	羅病カエル由来の剥離表皮組織
12	平成20年1月25日	IN-23	羅病カエル由来の剥離表皮組織
13	平成20年2月20日	RC-60	アフリカツメガエル爪部
14	平成20年3月13日	AJ-10	オオサンショウウオ組織

b. 結果

分離に供した14試料のうち、平成19年11月30日に提供を受けた試料2（HK-17克蘭ウェルツノガエル）剥離表皮組織片において、20℃では培養開始後3日目に、15℃では培養開始後一週間後に抗生物質を添加したペプトン化乳/トリプトン/ブドウ糖（PmTG）寒天平板上でカエルツボカビ菌と考えられる菌体の成長が認められた。それ以外の試料では菌体の成長が全く認められないか、細菌の混入によって培養の継続ができなくなった。

菌体の成長が認められたHK-17組織から分離菌株の確立を試み、20℃培養下のPmTG液体培地で顕著な菌の増殖が認められた。本菌株をHK-17A菌株とした。また、15℃及び20℃培養下トリプトン/ゼラチン加水分解物/乳糖(TGhL)寒天培地上で菌体からの遊走子の放出が確認されたが、遊走子からの新たな菌体形成には至らなかった。そのため、TGhL寒天平板上の菌体をTGhLゼラチン平板及びTGゼラチン平板に移植したところ、菌の増殖が認められた。これらのうち、15℃培養条件下でTGゼラチン平板上に生育した菌株をHK-17B菌株とした。

②分離菌株の同定

a. 方法

a-1 形態観察

HK17-A菌株を微分干渉光学顕微鏡により観察した。

a-2 分子系統学的解析

HK-17A菌株のコロニーより抽出したDNAを用いてPCR法による増殖を行い、DNA塩基配列を決定した。

b. 結果

b-1 形態観察

遊走子から遊走子嚢への成長、遊走子嚢内の細胞質の遊走への分化、遊走子の放出という無性生殖環のすべての成長段階を観察することができた。観察された特徴及び遊走子嚢や遊走子の大きさはLongcore et al. (1999)による種の記載と差異がなく、形態観察結果からはHK17Aをカエルツボカビと同定することが妥当と考えられた（**図 2-1、2**）。



図 2 - 1 分離されたHK-17菌株の菌体 (PmTG液体培地中)
内部に遊走子を形成した成熟遊走子嚢 (右) と遊走子放出後の空の遊走子嚢 (左)



図 2 - 2 分離されたHK-17菌株の空の遊走子嚢 (PmTG液体培地中)
分岐した仮根と逸出管が確認できる

③分子系統学的解析

18S rDNAの部分塩基配列を既知のカエルツボカビの塩基配列と比較した。1726塩基中2塩基が異なっていたものの、既知の他の菌類の遺伝子配列との比較から、HK-17Aの塩基配列はカエルツボカビに近いことが示唆された。

また、今回得られたDNA抽出物を国立環境研究所に送付し、核リボソームRNA遺伝子領域5.8SrRNA領域-非転写領域間の塩基配列と比較したところ、海外で大量死を引き起こしてい

る菌株の塩基配列（Aタイプ）とは異なり、国立環境研究所による調査でCタイプとされている塩基配列と相同であることが示された。

④分離菌株の培養・保存

a. 液体培地

分離菌株はPmTG液体培地中で良好に生息し、菌株を維持することが可能である。

b. 固体培地

分離菌株の遊走子を単体で各寒天培地に接種した場合、菌の増殖は認められなかった。一方、液体培地中で培養した高密度の菌液を各寒天培地に接種した場合には、いずれの寒天培地においても菌の増殖が認められ、接種したコロニーが次第に増殖した。

⑤考察

今回、麻布大学より提供を受けた14試料のうち、1試料のみでカエルツボカビ菌の分離に成功した。分離成功の要因として、①試料中に十分な菌体量が含まれていること、②未熟な菌体が含まれていること、③試料に混入している原生動物、酵母、細菌などの微生物を十分に取り除くこと、の3点が特に重要と考えられる。一方、国内産コガタハナサキガエル及びオオサンショウウオからの感染試料からはカエルツボカビ菌の分離に成功せず、明白な病徴の現れない軽度の感染試料からの菌株分離には従来用いられている方法とは異なる分離法の確立が必須であると考えられた。

HK-17A菌株は液体培地中で良好に生育する。したがって、培地の量を加減することに感染試験や生理学的研究に用いる大量の菌体を得ることが可能である。

2. カエルツボカビ菌が日本産の両生類に与える影響の検討

(1) 感染実験の概要と実施体制

飼育下両生類におけるカエルツボカビの感染が確認されたことで、日本国内の在来種への感染拡大が懸念され、在来種のカエルツボカビ感受性の調査が急務となった。そこで、在来のカエル類40種から分類学的・生態学的考慮を加えて感染実験候補種を選定し、沖縄県指定天然記念物3種を含む20種、計184個体に対し、ツボカビ症を発症中の外国産カエル飼育水を感染源として暴露し、感染実験を行った。結果、暴露後41、42、47日目に死亡したヌマガエル4個体、45日目に死亡したコガタハナサキガエル1個体、54、58日目に死亡したヤエヤマハラブチガエル2個体に、分子生物学的検査・病理組織学的検査によってカエルツボカビが皮膚上で増殖している事が確認された。

以下、麻布大学獣医学部・松井久実講師の結果報告よりその概要をとりまとめた。なお、感染実験は下記の4名により実施された。

- ・松井久実（麻布大学獣医学部講師・獣医生理学）
- ・宇根有美（麻布大学獣医学部准教授・獣医病理学）
- ・福山欣司（慶應大学生物学教室准教授・両生類生態学）
- ・上野寛子（明治学院大学国際学部生物学実験室教学補佐・両生類分類学）

(2) 方法

1) 感染実験候補種を選定

感染実験候補種を選定は、在来種40種を分類学的位置、地理分布、生態学的特徴について考慮し、第1次～第3次までの候補の優先順位付けを行った（表2-2）。実際の実験種は、第1次候補を優先に、採集時期や場所を考慮して選定した。

2) 実験個体の飼育条件

感染実験に用いたカエルは2007年6月から9月にかけて野外採集し、個別飼育とした。実験に供したカエルと採集地、個体数は表2-3の通りである。カエルは感染群と対照群の2群に分けて実験に供した。陽性対照としてカエルツボカビ感受性を有するクラウンウエルツノガエルとヤドクガエル（いずれも国内繁殖個体）を用いて同様に実験した。実験個体の飼育容器は、横180×縦110×高さ120mmのプラスチック製生物飼育ケース（いわゆるプラケース）を用い、赤玉土と水入れ（内径50mm）を入れたものを使用した。大型の個体には横300×縦200×高さ180mmのケースを用い、同様に飼育した（図2-3）。

実験室内は温度22～23℃、湿度40～45%に保ち、12時間明暗条件とした。カエルの餌として、業者で繁殖飼育されたフタホシコオロギおよびヨーロッパイエコオロギを使用した。

表 2-3 感染実験に供した種、採集地、個体数

科名	属名	種名	学名	採集地	個体数
ヒキガエル科Bufonidae Gray, 1825					
ヒキガエル属Bufo Laurenti, 1768					
		ミヤコヒキガエル	Bufo gargarizans miyakonis Okada, 1931	南大東島	10
		アズマヒキガエル	Bufo japonicus formosus Boulenger, 1883	神奈川県	10
アマガエル科Hylidae Rafinesque, 1815					
アマガエル属Hyla Laurenti, 1768					
		ニホンアマガエル	Hyla japonica Günther, 1859	神奈川県	10
アカガエル科Ranidae Rafinesque, 1814					
アカガエル属Rana Linnaeus, 1758					
		イシカワガエル	Rana ishikawae (Stejneger, 1901)	沖縄本島	4
		コガタハナサキガエル	Rana utsunomiyaorum Matsui, 1994	石垣島	11
		トウキョウダルマガエル	Rana porosa porosa (Cope, 1868)	神奈川県	9
		ツチガエル	Rana rugosa Temminck et Schlegel, 1838	千葉県	7
		トノサマガエル	Rana nigromaculata Hallowell, 1861	広島県	7
		ハナサキガエル	Rana narina Stejneger, 1901	沖縄本島	12
		ホルストガエル	Rana holsti Boulenger, 1892	沖縄本島	8
		ヤヤマハラブチガエル	Rana psaltes Kuramoto, 1985	西表島	14
		リュウキュウアカガエル	Rana okinavana Boettger, 1895	沖縄本島	10
クールガエル属Limnodynastes Fitzinger, 1843					
		ナミエガエル	Limnodynastes namiyei (Stejneger, 1901)	沖縄本島	8
ヌマガエル属Fejervarya Bolckay, 1915					
		ヌマガエル	Fejervarya limnocharis (Gravenhorst, 1829)	栃木県	9
アオガエル科Rhacophoridae Hoffman, 1932					
アイフィンガーガエル属Chirixalus Boulenger, 1893					
		アイフィンガーガエル	Chirixalus eiffingeri (Boettger, 1895)	西表島	10
アオガエル属Rhacophorus Kuhl et Van Hasselt, 1822					
		モリアオガエル	Rhacophorus arboreus (Okada et Kawano, 1924)	千葉県	4
		ヤヤマアオガエル	Rhacophorus owstoni (Stejneger, 1907)	西表島	7
カジカガエル属Buergeria Tschudi, 1838					
		カジカガエル	Buergeria buergeri (Temminck et Schlegel, 1838)	千葉県	6
		リュウキュウカジカガエル	Buergeria japonica (Hallowell, 1861)	西表島	11
ヒメアマガエル科Microhylidae Günther, 1858					
ヒメアマガエル属Microhyla Tschudi, 1838					
		ヒメアマガエル	Microhyla okinavensis Stejneger, 1901	西表島	9

3) 感染実験

病原体の感染実験には通常、株化されたものが感染源として用いられる。しかし今回の場合、感染実験開始時点において、国内で確認されたカエルツボカビはまだ分離培養されていなかったため、感染源にはツボカビ症発症中のクラウンウェルツノガエル、マルメタピオカガエルの飼育水を用いた。実験開始の2007年9月24日から2週間、飼育水入手毎に個体に直接滴下、および水槽内の水入れへの添加によって継続的に暴露を行った。暴露後、週に1回体表面スワブを採取し、分子生物学的検査に供した。実験期間中に死亡した個体は体表面スワブを採取後、ホルマリン固定標本とし、病理組織検査に供した。暴露から6ヶ月経過時点を実験終了点とし、一部のカエルを除いてホルマリン固定標本とした。

分子生物学的検査法では、AnnisらによるPCR法を用い (Annis et al., 2004)、アガロー

ス電気泳動もしくはポリアクリルアミド電気泳動で目的バンドの有無を判定した。病理組織検査では、カエルツボカビ感染好発部位である大腿部内側面の皮膚をパラフィン包埋切片とし、形態学的にカエルツボカビの遊走子嚢および遊走子の有無を判定した。

(3) 結果

実験終了時点の2008年3月24日までに何らかの原因で死亡した個体は、感染群31個体、対照群20個体であった。このうち、PCR検査・病理組織検査ともにカエルツボカビを検出したものは、コガタハナサキガエル1個体（45日目に死亡）、ヤエヤマハラブチガエル2個体（54, 58日目）、ヌマガエル4個体（41, 42, 47日目）、クラウンウエルツノガエル1個体（123日目）の計8個体で、いずれも感染群の個体であった。ヌマガエルはほとんど生前の変化がなく、前日まで特に異常が見られず、翌日突然死している例がほとんどであった。中には死亡数日前に大腿部内側面が発赤している例もあった。コガタハナサキガエルでは、死亡前日に脱皮が見られた。ヤエヤマハラブチガエルの1個体は、斜頸や眼球の白濁が見られ、死後の病理検査で脳内に原虫が確認された。もう1個体のヤエヤマハラブチガエルは、死亡日まで特に変化は見られなかった。クラウンウエルツノガエルは生存中脱皮が見られ、脱皮の程度は週によって亢進する期間と、全く脱皮の見られない期間があった。死亡4日前から食欲不振と後肢伸張が見られた。図2-4に、感染群ヌマガエルの死亡時の組織像を示す。

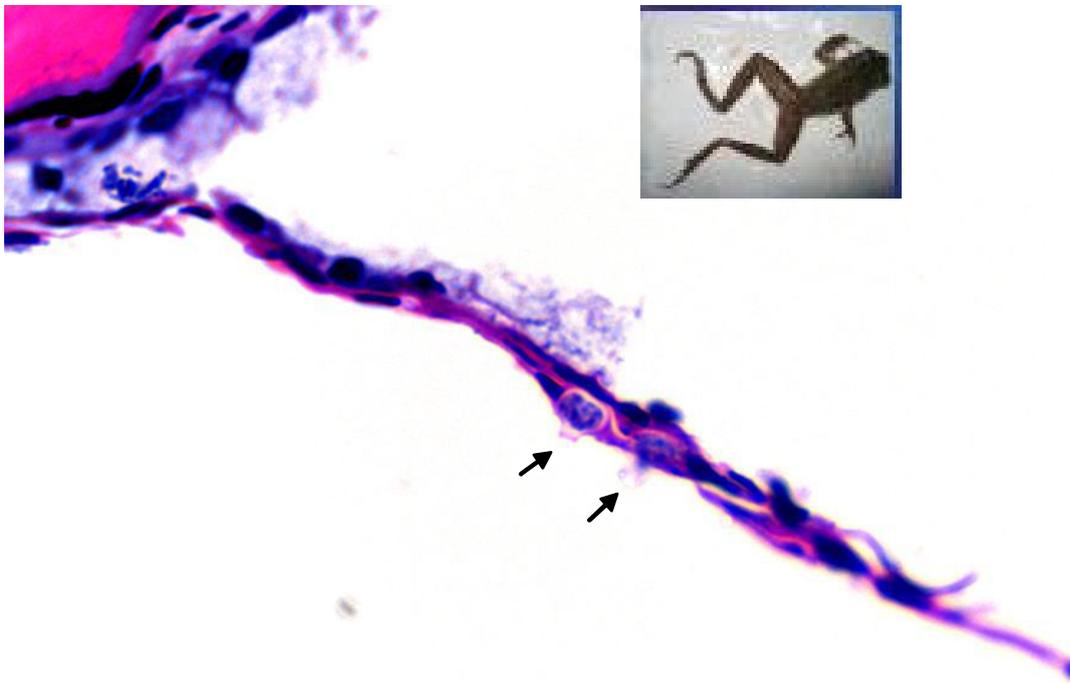


図2-4 感染群ヌマガエルの死亡時の組織像
矢印はカエルツボカビの遊走子嚢を示す。

致死したヌマガエル4個体、コガタハナサキガエル1個体の死亡時スワブPCR産物の塩基配列を調べたところ、国立環境研究所・五箇公一博士の分類によるCタイプの塩基配列に100%一致する事が確認された。また、感染源となったクラウンウエルツノガエルのカエルツボカビ配列はCタイプ、マルメタピオカガエルのカエルツボカビ配列はAタイプである事が確認された。

致死したカエルについて、観察初期より死亡に至るまでのスワブサンプルを用い、PCRによるカエルツボカビDNAの検出を試みた。ヌマガエル2個体についての結果を図2-5に示す。観察初期サンプル(1~3週間後のもの)では明確なDNAバンドは観察できないが、観察後期(4、5週間後のもの)から死亡時サンプルではカエルツボカビに起因すると思われるDNAバンドが明瞭に観察され、観察後期から死亡時にかけてカエルツボカビが皮膚表面で増殖していることが示唆された。

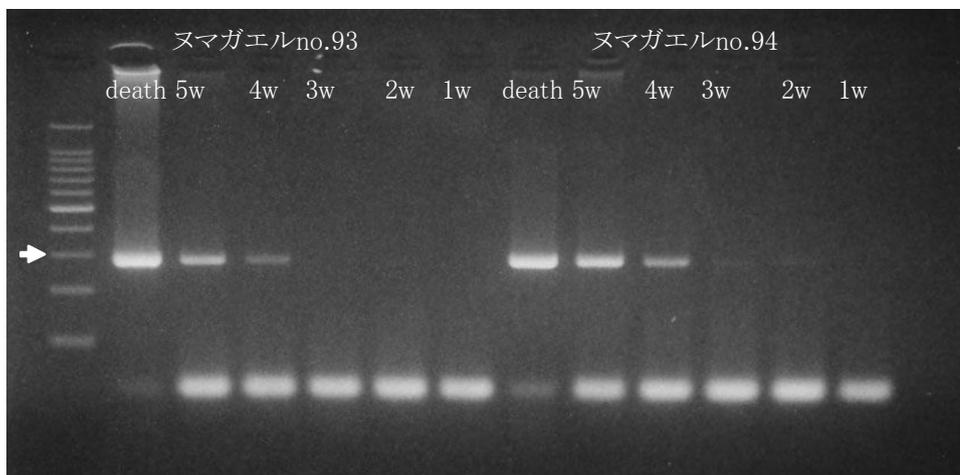


図2-5 死亡したヌマガエルの皮膚スワブPCRによるカエルツボカビDNA量の経時的变化

死亡個体のうち、PCR検査でカエルツボカビ陽性、病理組織検査において検出限界以下であったものを、現時点で感染群8個体、対照群3個体確認した(一部はまだ検査途中である)。PCR検査でカエルツボカビ検出限界以下、かつ病理組織検査で陽性であった個体はいなかった。

実験終了時点の生存個体で、PCR検査陽性であったものについて、現在解析を続けている。

(4) 考察

今回の感染実験では、次の4点に注目して解析を行った。

- ① カエルツボカビの感染が成立するか。
- ② カエルツボカビがカエルの皮膚上で殖えるか。
- ③ 感染カエルが何らかの病状を示すか。
- ④ 感染カエルが致死するか。

現在、全ての結果はまだ出ていないが、国内で確認された外国産カエルに対して病原性を有するカエルツボカビが、一部の在来種に対して感染し、皮膚上で増殖する事が明らかとなった。致死の原因を特定する事は困難であるが、2つの検査法でカエルツボカビが確

認された7例について、形態学的にカエルツボカビ像を捉えられる程増殖が見られること、PCR検査で時系列を追ってカエルツボカビ配列の増幅があること、感染群陽性対照であるクラウンウェルツノガエルの死亡より死亡時期が早いこと、発症期間がほとんどなく死亡していることから、カエルツボカビ感染で急性致死したと考えられる。一方で、実験終了まで何の変化もなく生存した種も多い。それらの個体の感染経過の解析を行い、在来種のカエルツボカビ感受性と抵抗性について、今後明らかにする必要がある。

しかし、今回の実験には次の通りの問題点がある。

第1に、株化された病原体を感染に用いておらず、結果的にはあるが、感染源に2タイプのカエルツボカビを用いた点である。感染源に用いた飼育水のカエルツボカビ型と死亡個体のカエルツボカビ型はCタイプで一致したものの、一緒に感染源としてAタイプ発症カエルの飼育水を用いているにもかかわらず、Aタイプは死亡個体から検出されていない。また、発症個体の飼育水を実験に用いたことで、感染に関わった遊走子数が不明で、感染群の個体が均一に暴露されたかどうか不明であること、また、他の病原体のコンタミネーションによるカエルツボカビとの共感染もしくは競合の可能性があることから、不完全な実験であると言わざるを得ない。

第2に、実験開始前のプレスワブチェックや除菌操作が不完全であったことが挙げられる。野外の一部地域の一部の種からカエルツボカビが発見されていることから（第3章参照）、感染前から保持していたカエルツボカビが、棲息環境の変化などを転機として増殖した可能性は捨てきれない。

第3章：カエルツボカビの国内分布状況の把握

1. カエルツボカビの分布概況把握調査結果のとりまとめ

日本産両生類に対してカエルツボカビがもたらすリスクを検討するためには、国内の野外におけるカエルツボカビの分布状況を把握することが重要である。これまでに、(独)国立環境研究所は国内で得られた両生類の体表スワブサンプルの解析を進めてきた。また、環境省は本年7月から全国における両生類のサンプリングを進め、得られたサンプルは国立環境研究所において解析が進められた。

本章では、環境省による野外サンプルの採取、国立環境研究所による解析結果について説明し、現在までに明らかになったわが国の野外におけるカエルツボカビの分布状況についてとりまとめる。

(1) 目的

カエルツボカビの国内分布状況を把握することの目的は、概ね次の三者にまとめられる。

- ・ 野外におけるカエルツボカビの全国分布図を作成すること。
- ・ 地域ごと及び両生類の種ごとの解析を行い、それぞれの感染率を明確にすること。
- ・ 希少種の集中分布域（奄美・沖縄）で詳しい分布状況を示すこと。

(2) 解析手法

1) サンプル採取の体制

解析は「**野外におけるスワブサンプルの採取**」と「**PCR検査**」よりなる。スワブサンプルとは、検体（ここでは捕獲された両生類）の特定部位（ここでは体表）を拭った綿棒のことで、検体の上皮細胞や分泌物、付着物が含まれる。このサンプルを検査して、カエルツボカビの遺伝子が含まれていないかどうかを確認するものである。

スワブサンプルの採取に係る体制は下記のとおりである。

①都道府県調査

各都道府県（沖縄を除く）の自然環境保全の担当部署に、地域の博物館や動物園、水族館、専門家などの協力を得てサンプル採取を実施していただくよう依頼した。比較的市街地に近い場所で、サンプル採取を実施していただいた。

②南西諸島における調査

沖縄県及び鹿児島県奄美地域においては、環境省那覇事務所が中心となり、沖縄県、沖縄美ら海水族館がサンプル採取を実施した。

③国立公園等における調査

環境省地方環境事務所が地域の専門家等に依頼して、全国の国立公園、国指定鳥獣保護区を中心としたサンプリングを実施した。

④予備調査、補完調査

以上の調査の補完として、自然環境研究センター職員が特に必要性の高い地点においてサンプルを採取した。一部の水田では、JAが協力する「田んぼの生きもの調査プロジェクト」の協力を得てサンプル採取を行った。

予備的調査は2007年6月から実施され、本格的な野外サンプルの採取は7月に開始された。多くの野外調査は夏に実施された。

2) 野外におけるスワブサンプル採取の手法

①調査器具等

事務局から、県を通してサンプル採取の実施者に統一規格の綿棒、送付用チューブ、送付用ビニル袋、サンプル採取用の手袋を送付した。この他、調査協力者には各自で網、長靴、消毒用セット（消毒剤・バケツ・柄付きたわし等）、デジタルカメラ、調査票、地形図などを準備していただいた。

②サンプル採取の手順

野外におけるサンプル採取の手順は**図3-1**の通りであった。

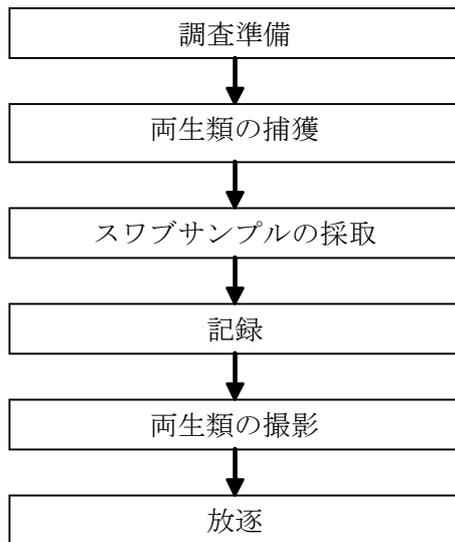


図3-1 野外におけるサンプル採取の手順

綿棒によるスワブサンプルの採材は**図3-2**の通りである。両生類を捕獲する時には1個体ごとに手袋かポリ袋を用い、サンプルに他の個体の表皮等が混じらないよう注意した。採材に際しては、検査個体1個体につき綿棒2本を用意した。それぞれの綿棒で、カエルツボカビの感染濃度が高いとされる四肢の腹面（手のひら・足の裏及び水掻き）、大腿部の腹面（内股部）、腹部側面などを拭った。

調査実施によりカエルツボカビ菌を不用意に拡散させる可能性を極力低減させるために、長靴、網などの器具類は地点ごとに消毒した。消毒剤としてはキッチンハイター（塩素濃

度200ppm以上)、オスバンS10(200～500倍希釈液)を用いるか、または50℃以上の熱湯に5分程漬ける方法を採用した。

帰所後、サンプルを冷蔵庫の冷凍室に保管した。ある程度まとまった段階で、サンプル、記録票、調査地点図、写真をセットにしてクール便の冷凍(−18℃)で国立環境研究所宛に送付した。

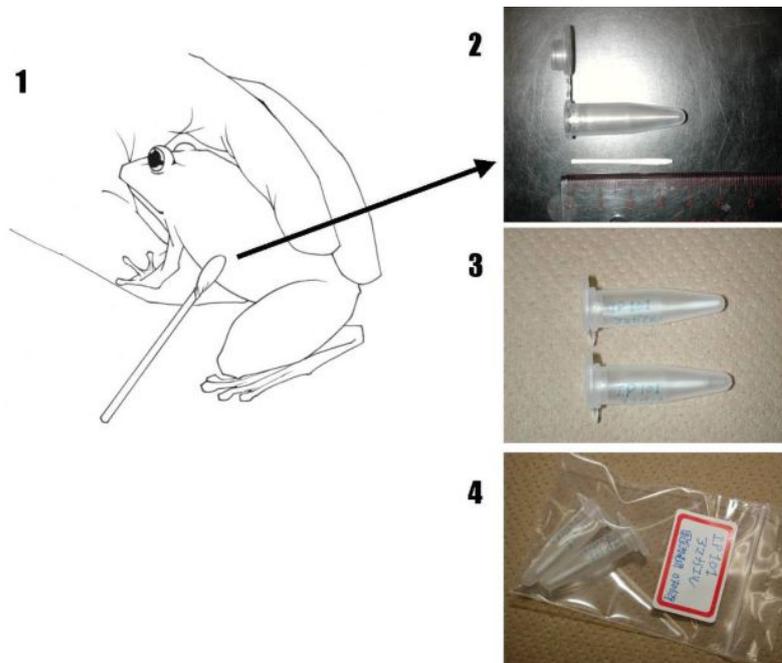


図3-2 綿棒によるスワブサンプルの採材・保管方法

1. 綿棒の先でカエル個体の表面をぬぐい取る(2本)。
2. 綿棒の先端から3.5cmに切り取る。
3. 1.5mL用マイクロチューブに綿棒を1本ずつ入れる。
4. 個体別にチューブを冷凍保管する。

③両生類の死体の取扱いについて

一箇所で複数の死亡個体が見つかった場合は、カエルツボカビ感染の疑いがある一方、他の原因での死亡も十分考えられるので、両生類以外の生物も合わせて死亡していないか、最近農薬等の散布が行われた事実がないかなど可能な範囲で確認した。ただし、夏期には野外の両生類の死体が速やかに腐乱することから、死体からのスワブサンプルの採取は行わなかった。もし死体が発見された場合は、周辺で生きた個体(可能であれば弱っている個体)を見つけてサンプリングを実施すると共に、別途、事務局に報告いただくようにした。

上記のサンプル採取・送付のマニュアル「カエルツボカビ感染状況調査実施の手順と留意点」(都道府県調査及び国立公園等における調査)を巻末資料に示した。野外サンプルの採取には合計500人程度に従事していただいた。

3) 調査地点の整理と調査票

都道府県調査及び国立公園等調査では、スワブサンプルの採取とともに、採取地点についての調査票（表3-1）及び調査地点図（図3-3；原則として2.5万分の1）を送付していただいた。

送付されたサンプルのうち、1231 サンプルについて調査票に写真が添付され、写真から種の判別を行った。その結果、97 サンプルについては、調査票に記入されていた種からの変更を行った。記入された種と違う種（亜種を含む）と判別されたもの(73 サンプル)、亜種名が確定されたもの (9 サンプル)、調査票では「種不明」とされたものの種あるいは属が特定されたもの (12 サンプル)、調査票では種名「A」が記載されていたが、写真判別の結果「A?」とされたもの (2 サンプル) があった。

種の判別が困難で、「A or B」、「A?」とされた場合には、暫定的に A として集計した。

送付された調査地点図については、国土地理院の地図閲覧サービス

(<http://watchizu.gsi.go.jp/>) の画面上で、調査地点の中心部の緯度経度を読み取り、位置情報とした。調査実施者から 1 地点として報告されている場合でも、調査地点図上で別地点として表示されているものについては、それぞれの経緯度を読み取り、別地点として整理した。

南西諸島での調査では、調査地点図によらず、GPS で読み取ること等により、緯度経度の情報が集積されたため、必要に応じ世界測地系に変換し位置情報とした。なお、沖縄諸島でのデータは、採取地点ごとに緯度経度情報が与えられていたが、奄美諸島でのデータは、採取地点名は同じであっても、サンプルごとに個別に経緯度情報が与えられているものが多く、後述する解析の優先順位を決める都合上、緯度経度の違う点をすべて違う調査地点とはせず、記載されていた採取地点（「○○林道」等）を 1 地点として整理した。

表 3 - 1 野外調査における記録票の例

記録票(例)

調査日 : 2007年 7月12日 調査者 ○○ ○○、○○ ○○

地形図名 2.5万分の1 東京首都

標本番号	種名(わかれば)	採集場所(調査地点名、市町村名までの所在、わかれば通称など)	写真の有無	写真の有無
070712-1	アマガエル	調査地点A 東京都千代田区 日比谷公園内	あり	
070712-2	"	"	あり	
070712-3	"	"	あり	
070712-4	アマガエル	"	あり	
070712-5	"	"	あり	
070712-6	アズマヒキガエル	調査地点B 東京都千代田区 日比谷公園内	あり	
070712-7	"	"	なし	

種名が不明の場合は空欄でも結構です

調査地点図(例)



図 3 - 3 調査地点図の例

4) PCR検査の手順

PCR検査は国立環境研究所・侵入生物研究チームの五箇公一リーダーを中心として実施された。

Goka et al. (2001)に記載されているDNA抽出用緩衝液中に綿棒を浸し、一定時間攪拌して付着物を溶出させた後、蛋白分解酵素を加えて、タンパク質や酵素を分解し、得られた溶液をPCR反応用の鋳型（テンプレート）DNAとした。本業務では、カエルツボカビ菌の核ゲノムにおける5.8SrRNA遺伝子領域とその両側に存在する非転写領域（Internal Transcribed Spacer：ITS）合計約300塩基をPCR法によって増幅し、増幅産物の有無によって菌の存在を確認する方法を採用した。

ITS領域とは遺伝子の間を埋める“スペーサー（隙間埋め）”で、それ自体の塩基配列は無意味であるとされ、一般に塩基配列や塩基長の変異率が高い。従って、系統間や種間の差が大きい領域であり、系統や種の識別に有効な領域とされる。そこでこの領域を利用して、カエルツボカビの遺伝子だけを区別して増幅させることが可能である。

ITS領域用プライマー¹は、Annis et al. (2004)によって開発され、カエルツボカビを特異的に増幅するとされるBd1aとBd2aを使用した。通常は、これらのプライマーを使用してDNAテンプレートから1次的に合成・増幅するが（**図3-4**）、今回使用したDNAテンプレートは野外個体の体表スワブから得られたものであり、1次的PCRでは夾雑物が目的産物の増幅を阻害したり非特異的増幅をもたらしたりする。そこで、本調査では、18SrRNA遺伝子上及び28SrRNA遺伝子上にプライマーを設計して、1次PCRを実施し、得られた産物をテンプレートとしてBd1aおよびBd2aを使用して2次PCRを行うことで、特異的かつ高感度にカエルツボカビのITS1-5.8S-ITS2領域約300塩基を増幅することとした（**図3-5**）。

¹ プライマー（Primer）はPCR反応でDNAを合成する際に開始地点となる短い核酸の断片である。通常はプライマーなしにDNAを合成することはできない。

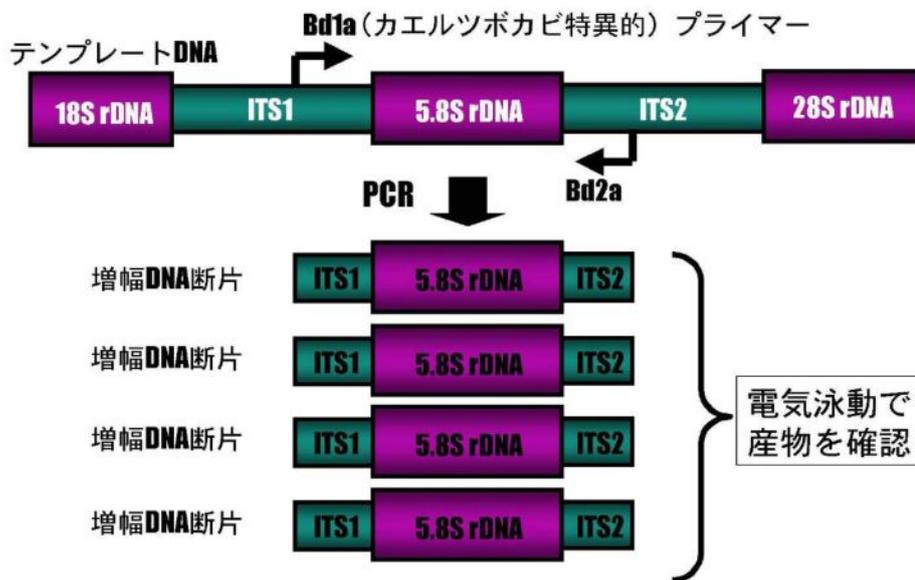


図3-4 1次PCRによるカエルツボカビDNAのITS領域合成の原理

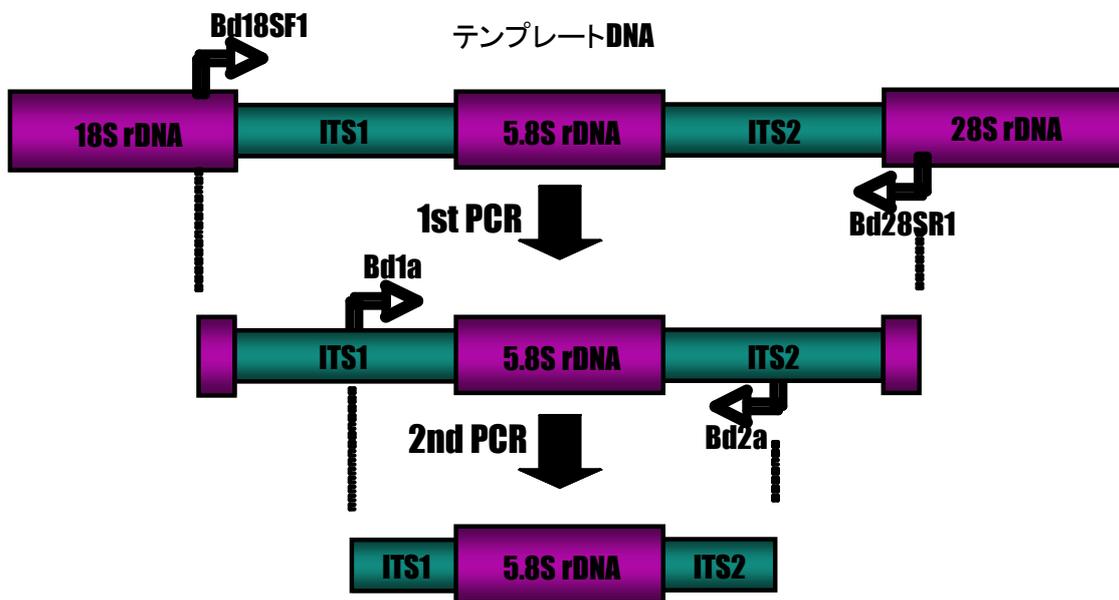


図3-5 2次PCRによるカエルツボカビDNAのITS領域合成の原理

得られた増幅産物を6%アクリルアミドゲル(厚さ1mm)電気泳動法によって分離して、エチジウムブロマイドでUV蛍光染色することにより目的産物の合成を確認した(図3-6)。

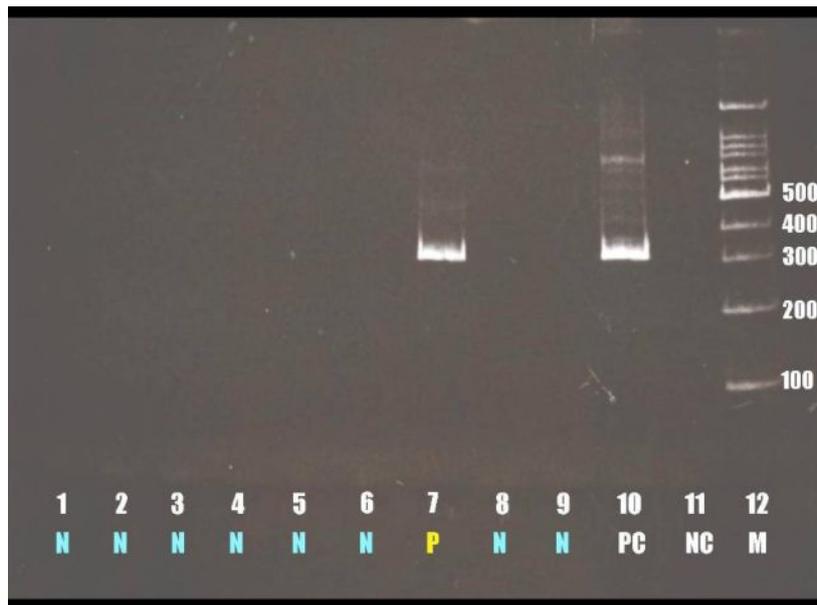


図3-6 ゲノムPCR法による検査結果の一例

1～9列が検査サンプル、10列がポジティブコントロール（PCR反応がうまくいっているか確認するためのコントロール）（塩基配列決定済み）、11列がネガティブコントロール（鋳型DNAの含まれないコントロール）、12列がサイズマーカー。7列目にポジティブコントロールと同じ、約300塩基のPCR産物が確認される。他のサンプルからは何もPCR産物が検出されていない。このことから7列の個体に感染が疑われるという結果が出る。

本業務では、さらに、PCR反応で得られたDNA断片がカエルツボカビ由来であることを確かめるために塩基配列を決定し、DNAデータベースに登録されているカエルツボカビ塩基配列情報と比較した。なお、これまでにITS1領域に塩基配列変異が見られる複数のハプロタイプが検出されており、これらの変異には塩基の挿入・欠失が含まれており、合成DNA断片の長さにも変異が生じていることが予備調査で明らかとなっている。

(3) 結果

1) サンプル採取地点とサンプル数

都道府県ごとのサンプル採取地点数を表3-2に、サンプル数を表3-3にそれぞれまとめた。北海道から沖縄までの調査地点位置を図3-7に示した。北海道から沖縄までの944地点から、合計5178個体分の野外サンプルが送付された。1地点あたり、平均5.5個体の両生類のサンプルが得られている。

国土面積（約38万km²）をこの地点数で割ると、約400km²に1地点の割合、すなわち100km²（=1/25,000地形図の図幅に相当する面積）あたり約0.25地点の割合で調査がなされたことになる。サンプル数を地域別に見ると、最も多かったのは奄美・琉球諸島で、全体の27%に相当する1388サンプルが採取された。次いで関東地方、中国地方の順であり、最も少ない四国では227サンプルが得られた。

面積あたりのサンプル数を地域別に見ると、調査地点密度が最も高い奄美・琉球諸島で5.38地点/100km²、最も低い東北地方では0.09地点/100km²となった。

表3-2 都道府県及び地方ブロックごとの調査地点数

県コード	県名	県ごと地点数	地方ブロックごと地点数	
1	北海道	101	101	北海道
2	青森	5	58	東北
3	岩手	6		
4	宮城	18		
5	秋田	13		
6	山形	8		
7	福島	8		
8	茨城	30		
9	栃木	9		
10	群馬	14		
11	埼玉	10		
12	千葉	31		
13	東京	13		
14	神奈川	9		
15	新潟	20	173	中部
16	富山	8		
17	石川	15		
18	福井	14		
19	山梨	20		
20	長野	37		
21	岐阜	8		
22	静岡	11		
23	愛知	9		
24	三重	31		
25	滋賀	0	102	近畿
26	京都	8		
27	大阪	10		
28	兵庫	62		
29	奈良	9		
30	和歌山	13		
31	鳥取	22	67	中国
32	島根	12		
33	岡山	8		
34	広島	16		
35	山口	9		
36	徳島	9		
37	香川	2	45	四国
38	愛媛	22		
39	高知	12		
40	福岡	14	95	九州(除く南西諸島)
41	佐賀	14		
42	長崎	12		
43	熊本	15		
44	大分	5		
45	宮崎	8		
46	鹿児島	76		
47	沖縄	138	187	南西諸島(奄美~八重山)
全国合計		944		

表3-3 都道府県及び地方ブロックごとのサンプル数

県コード	県名	県ごとサンプル数	地方ブロックごとサンプル数	
1	北海道	275	275	北海道
2	青森	55	390	東北
3	岩手	60		
4	宮城	91		
5	秋田	78		
6	山形	48		
7	福島	58		
8	茨城	133		
9	栃木	87		
10	群馬	45		
11	埼玉	34		
12	千葉	142		
13	東京	44		
14	神奈川	61		
15	新潟	98		
16	富山	20		
17	石川	62		
18	福井	90		
19	山梨	125		
20	長野	116		
21	岐阜	77	899	中部
22	静岡	74		
23	愛知	75		
24	三重	162		
25	滋賀			
26	京都	73		
27	大阪	79		
28	兵庫	155		
29	奈良	37	393	近畿
30	和歌山	49		
31	鳥取	93		
32	島根	84		
33	岡山	97		
34	広島	107		
35	山口	84	465	中国
36	徳島	31		
37	香川	21		
38	愛媛	54		
39	高知	121	227	四国
40	福岡	70		
41	佐賀	84	595	九州(除く南西諸島)
42	長崎	101		
43	熊本	99		
44	大分	95		
45	宮崎	61		
46	鹿児島	361		
47	沖縄	1112		
全国合計		5178		

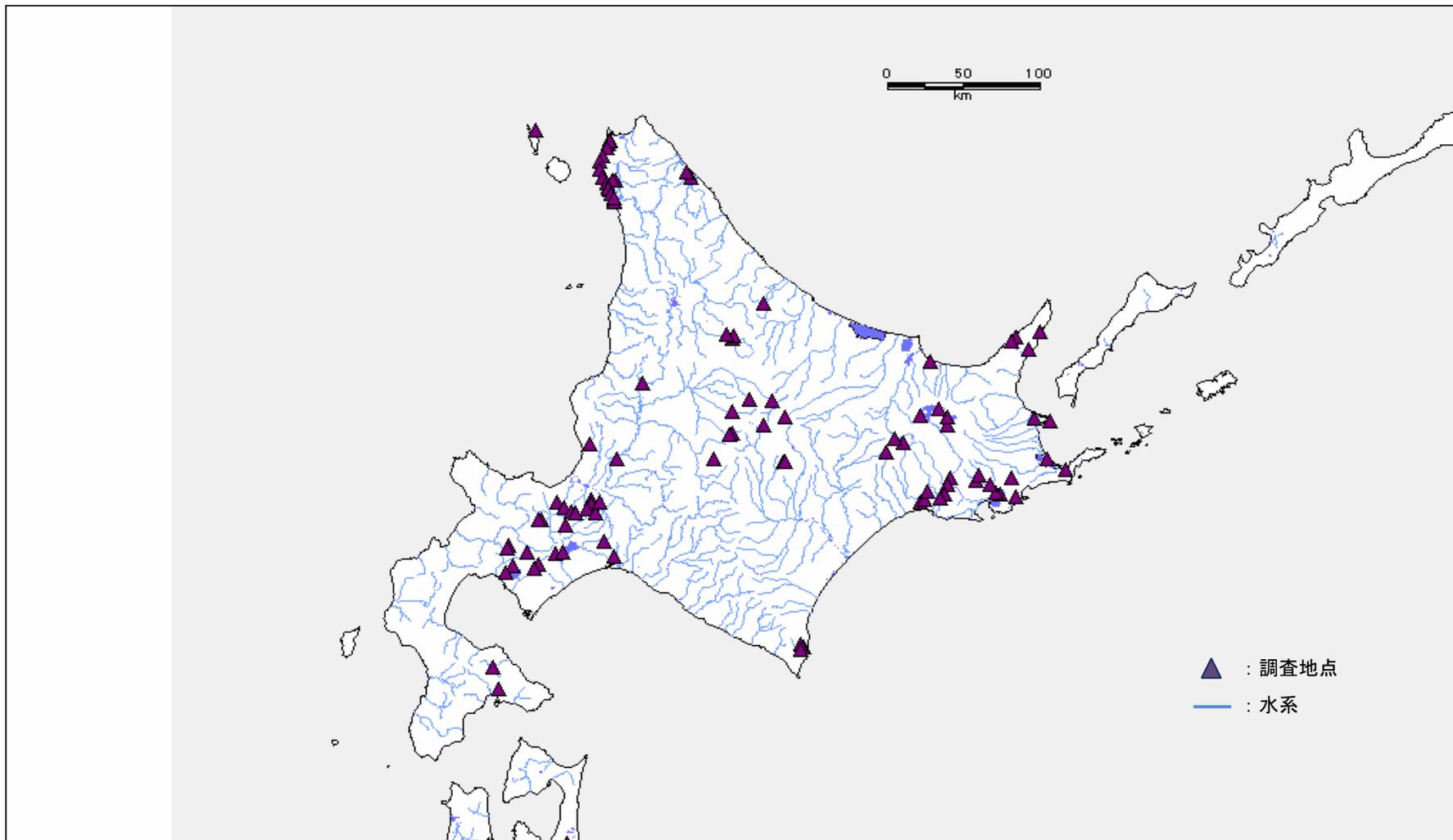


图 3 - 7 調査地点位置図 (北海道)

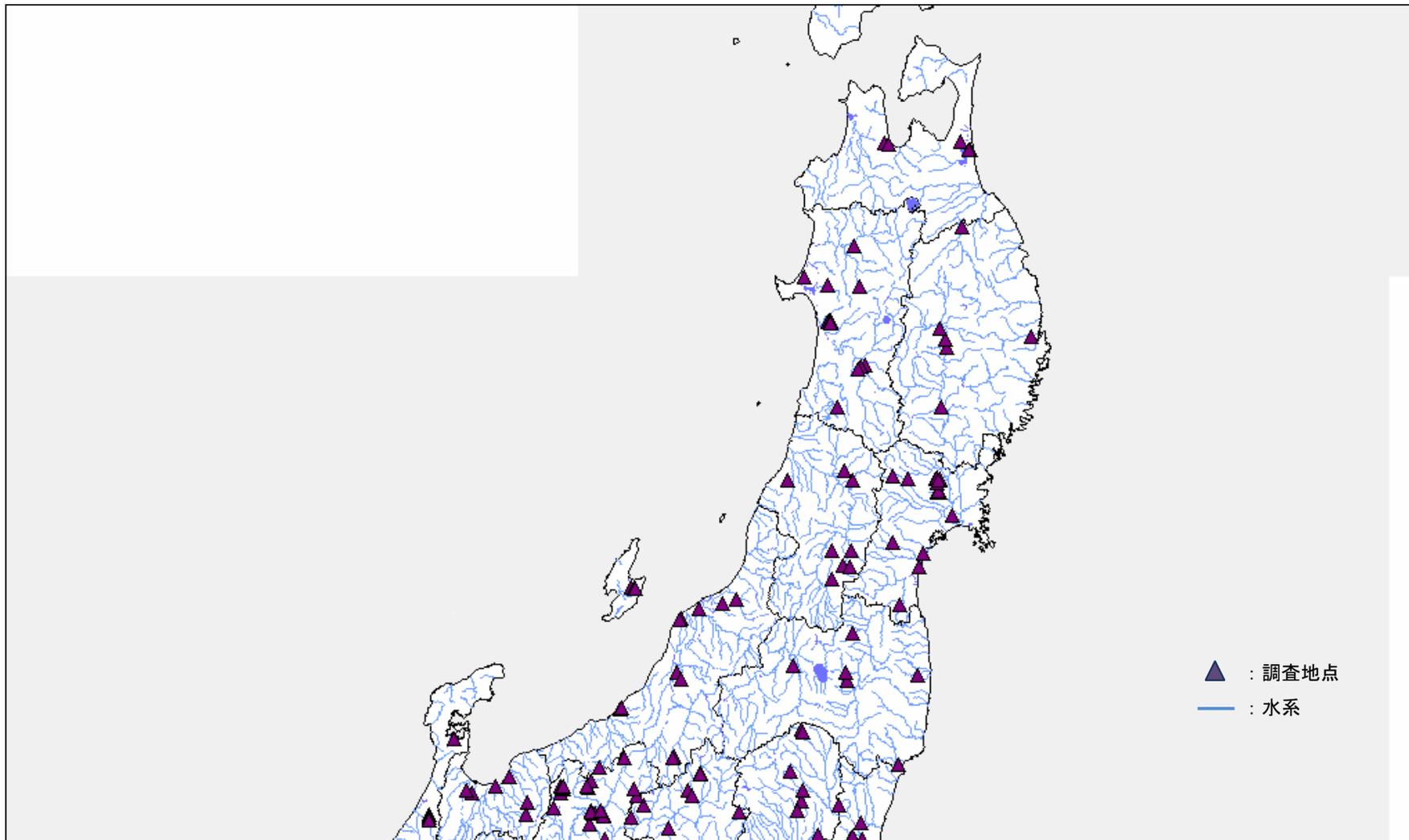


図3-7 (続き) 調査地点位置図 (東北)

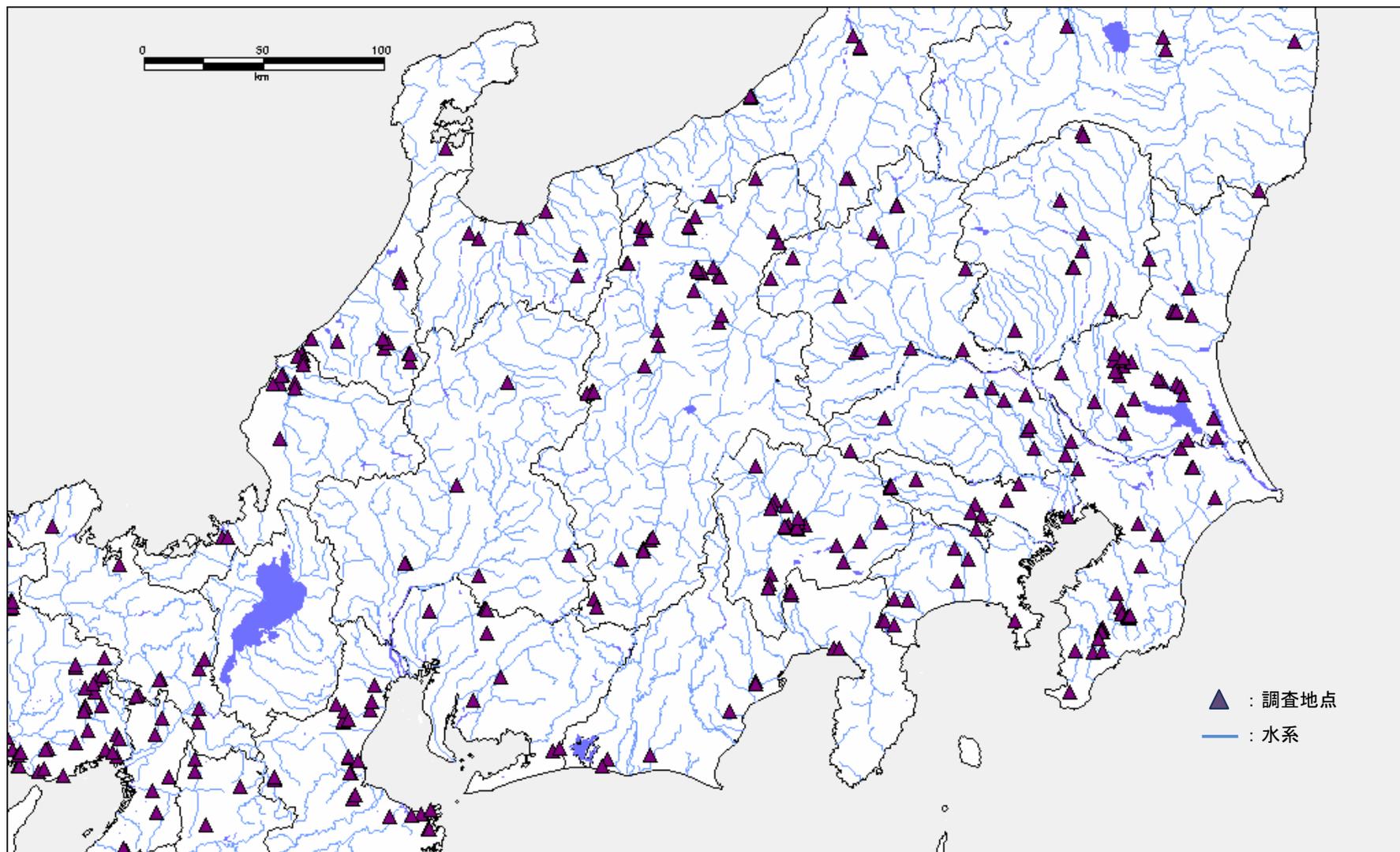


図3-7 (続き) 調査地点位置図 (関東・中部)

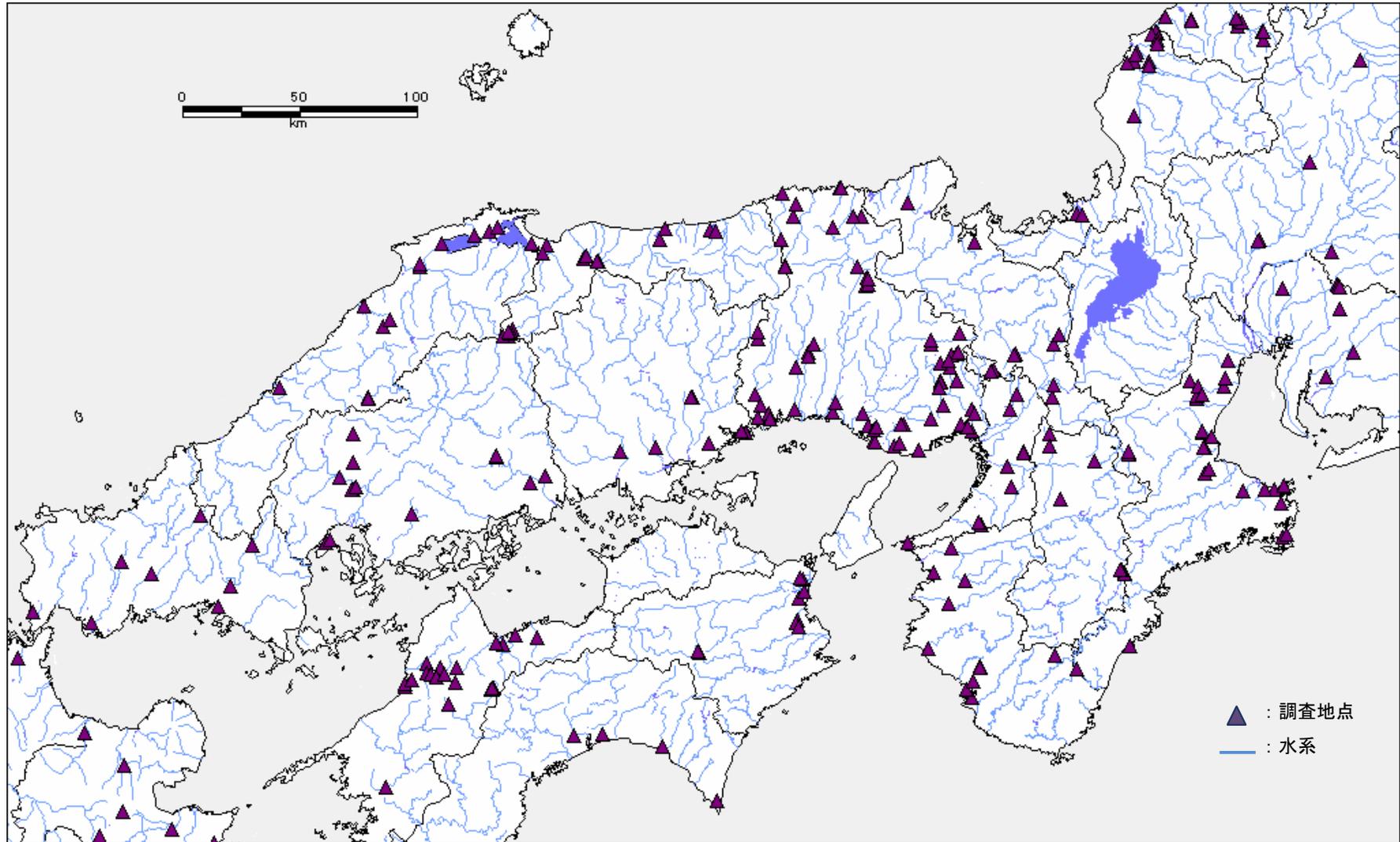


图 3-7 (続き) 調査地点位置図 (近畿・中国)

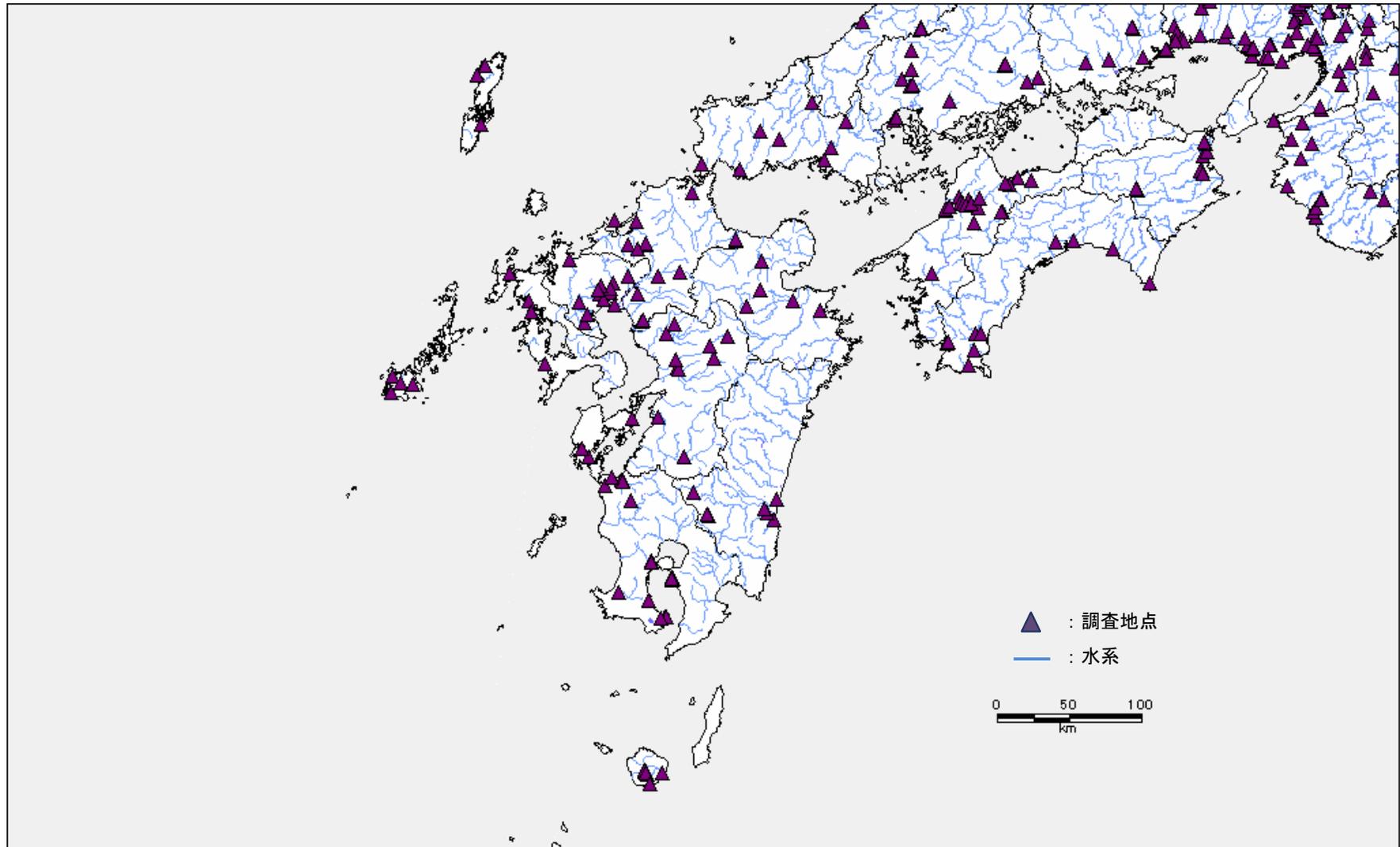


図3-7 (続き) 調査地点位置図 (四国・九州と周辺島嶼)

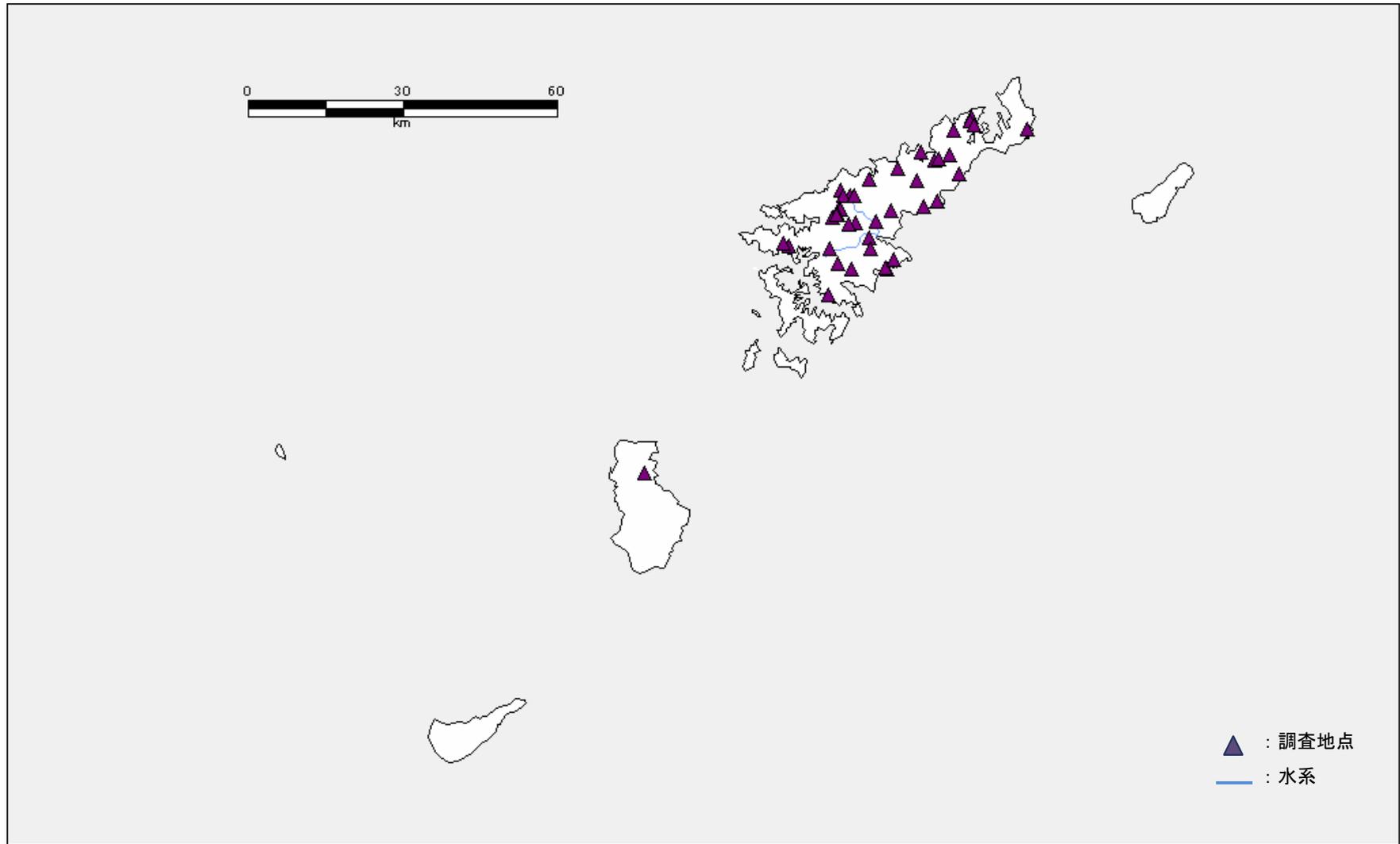


図3-7 (続き) 調査地点位置図 (奄美群島)

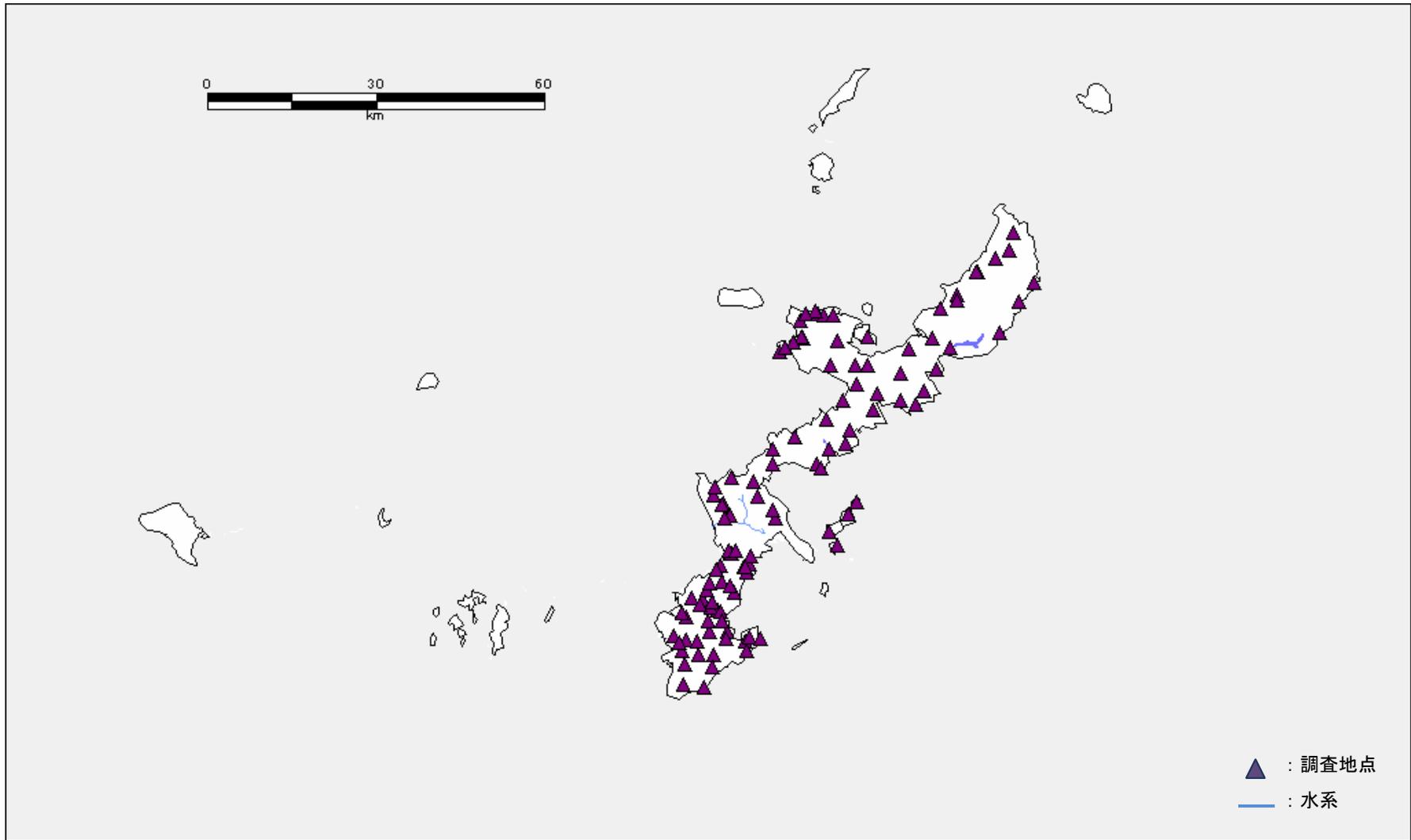


図3-7 (続き) 調査地点位置図(沖縄諸島)

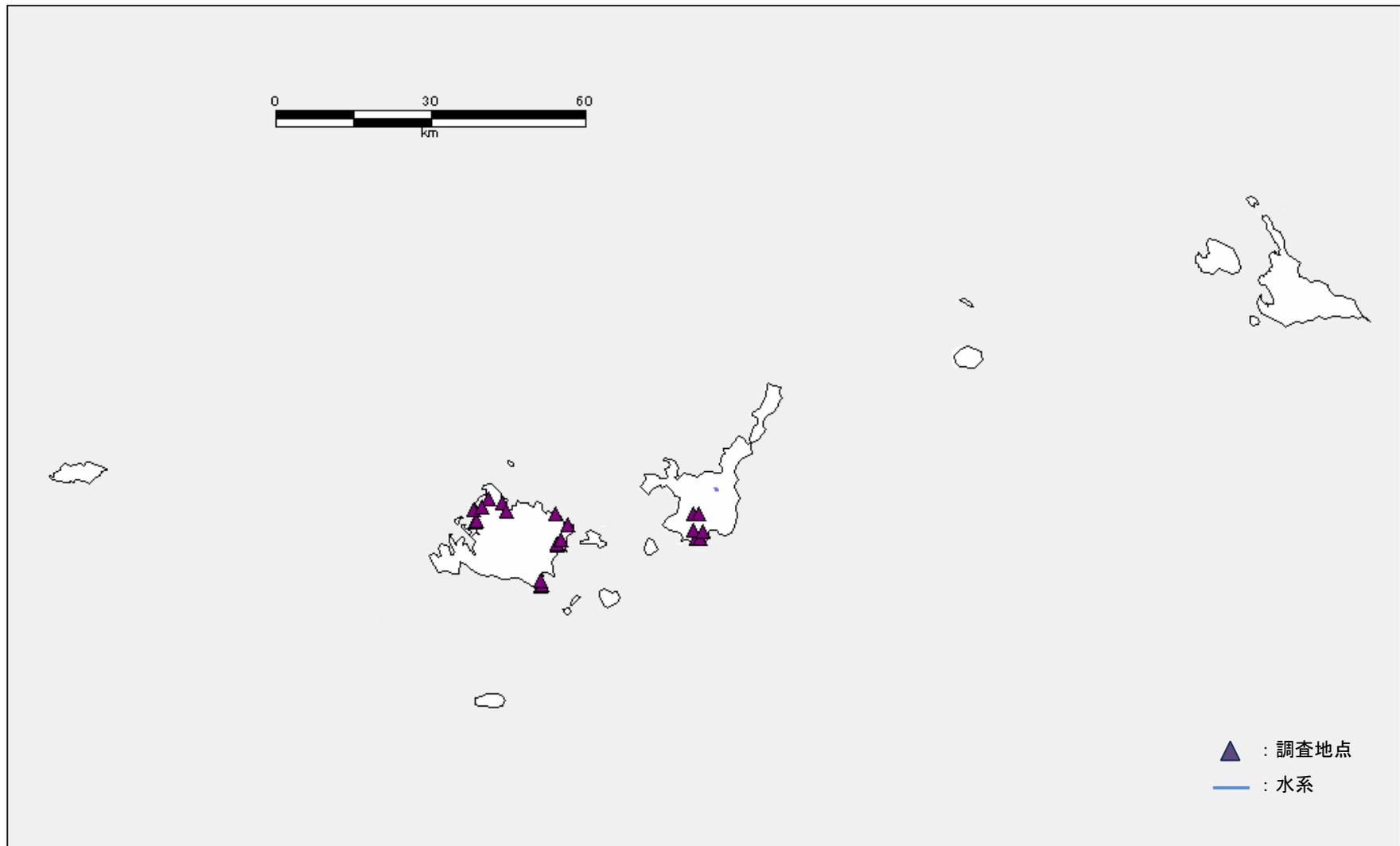


図3-7 (続き) 調査地点位置図 (先島諸島)

表3-4 両生類の種ごとのサンプル数と解析状況

種名	サンプル数	未解析	解析 済み	陽性	陰性	要 再検査
カスミサンショウウオ	8	4	4	0	4	
トウホクサンショウウオ	3	2	1	0	1	
ハクバサンショウウオ	6	3	3	0	3	
ヒダサンショウウオ	5	3	2	0	2	
クロサンショウウオ	2	0	2	0	2	
エゾサンショウウオ	3	1	2	0	2	
ブチサンショウウオ	2	0	2	0	2	
キタサンショウウオ	4	2	2	0	2	
ハコネサンショウウオ	10	6	4	0	4	
オオサンショウウオ	26	3	23	2	21	
アカハライモリ	110	73	37	0	37	
シリケンイモリ	44	21	23	2	21	
ヒキガエル ※	11	3	8	0	8	
ニホンヒキガエル	16	3	13	0	13	
アズマヒキガエル	38	16	22	0	22	
ナガレヒキガエル	11	7	4	0	4	
オオヒキガエル	13	7	6	0	6	
ニホンアマガエル	657	419	238	1	237	
ハロウエルアマガエル	7	2	5	0	5	
ツシマアカガエル	5	4	1	0	1	
タゴガエル	71	33	38	0	38	
ヤクシマタゴガエル	5	0	5	0	5	
ナガレタゴガエル	3	0	3	0	3	
アカガエル ※	18	11	7	0	7	
ニホンアカガエル	211	129	82	0	82	
ヤマアカガエル	135	88	47	0	47	
エゾアカガエル	160	82	78	0	78	
トノサマガエル	654	468	186	1	185	
ダルマガエル	65	50	15	0	15	
トウキョウダルマガエル	183	117	66	0	65	1
ヌマガエル	978	749	229	1	228	
サキシマヌマガエル	50	38	12	0	12	
ウシガエル	188	111	77	6	71	
ツチガエル	334	226	108	1	107	
アマミハナサキガエル	68	52	16	0	16	
ハナサキガエル	7	5	2	0	2	
ナミエガエル	4	2	2	0	2	
イシカワガエル	30	19	11	0	11	
オットンガエル	48	32	16	0	16	
ホルストガエル	1	0	1	0	1	
シュレーゲルアオガエル	49	17	32	0	32	
モリアオガエル	12	4	8	0	8	
オキナワアオガエル	1	0	1	0	1	
アマミアオガエル	4	0	4	0	4	
カジカガエル	13	1	12	0	12	
リュウキュウカジカガエル	686	574	112	0	112	
アイフィンガーガエル	1	0	1	0	1	
シロアゴガエル	108	80	28	0	28	
ヒメアマガエル	57	29	28	0	28	
アフリカツメガエル	11	4	7	2	5	
種不明両生類	42	40	2	0	2	
野外両生類集計	5178	3540	1638	16	1621	1

※「ヒキガエル」は亜種ニホンヒキガエルかアズマヒキガエルかが不明であったもの、「アカガエル」はニホンアカガエル・ヤマアカガエル・タゴガエルのいずれかが不明であったものをそれぞれ指す。

2) 種別のサンプル数

合計49種（亜種を含む）の両生類からサンプルが採取された（表3-4）。最も多くの個体を得られた種はヌマガエルの978個体で、全サンプルの18.9%を占めていた。次いで、奄美大島と沖縄島で多数を得られたリュウキュウカジカガエル（686個体・13.2%）が多かった。以下、ニホンアマガエル（657個体・12.7%）、トノサマガエル（654個体・12.6%）、ツチガエル（334個体・6.5%）、ニホンアカガエル（211個体・4.1%）、ウシガエル（188個体・3.6%）の順であった。サンプルが数100個体を越えた種は、上記7種に加えてアカハライモリ、ヤマアカガエル、エゾアカガエル、トウキョウダルマガエル、シロアゴガエルであった。

カスミサンショウウオ、トウホクサンショウウオなどのサンショウウオ類や、ツシマアカガエル、ヤクシマタゴガエル、ハナサキガエル、ナミエガエル、アイフィンガーガエルなど分布が一部の島嶼に限定されている種のサンプルは少なかった。また、本州に広く分布する種の中でも、タゴガエル、モリアオガエル、カジカガエルなど山地性の種は個体数が少ない傾向がうかがえた。

今回の調査において100個体以上が記録された種は、初夏から盛夏に平地の水田などに多く、夏期の日本において比較的見つけやすい種といえる。主として夏期の調査であったにもかかわらず、早春に繁殖する両生類（アカガエル類やヒキガエル類、サンショウウオ類）についても多くの種が得られている。また、個体数は少ないものの、隠遁的で繁殖期以外にはきわめて発見し難い小型サンショウウオ類が9種確認されたことは特筆される。

3) 採取時期別のサンプル数

野外で採取された時期別のサンプル数を図3-8に示した。サンプルの大半は8月から10月に採取されており、特に8月と9月に集中していた。

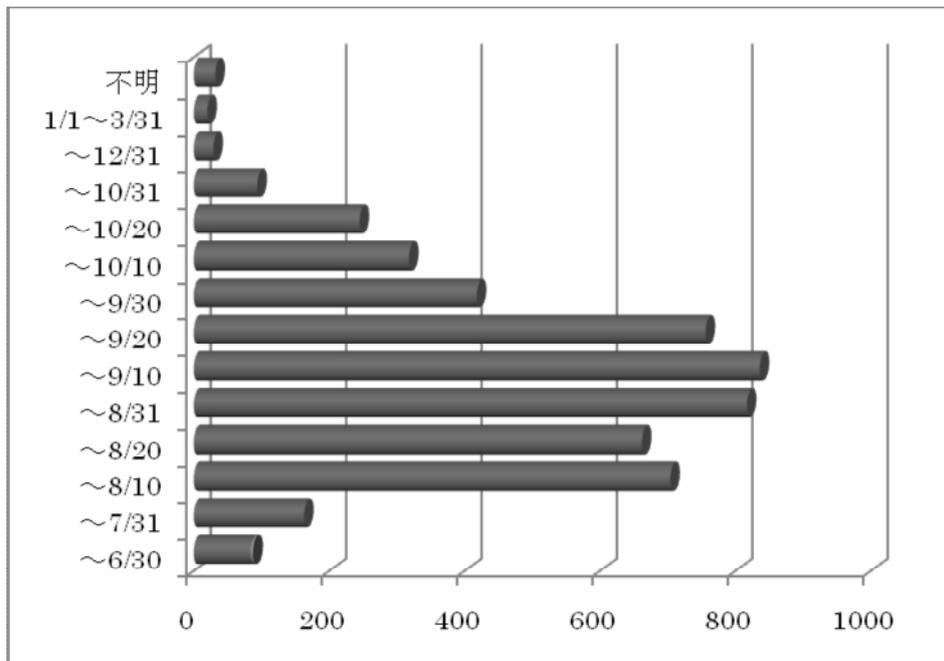


図3-8 採取時期別サンプル数

4) PCR検査結果

①解析済みの全サンプルに対する感染率

収集されたサンプルは、国立環境研究所においてPCR検査に供された。本業務では早期に全国の現状を把握することが最優先であると考え、多数のサンプルの中で解析の優先順位を設け、「1地点1種1個体ずつ」のサンプルを解析対象とした。すなわち、全国の調査地点944地点ごとに、採取できた各種1個体から解析を開始した。本年度は、全サンプル5178のうち1638(31.6%)サンプルの解析を行った。これ以外のサンプルは次年度以降の解析の対象とした。

2007年度末の時点で解析が終了した1638サンプルのうち、陽性とされたものは16サンプル、解析済みのサンプルの0.98%であった。

陽性とされた16サンプルの遺伝子配列を調べると、DNAデータベースに登録されているもの(Aタイプ)とは異なるハプロタイプとみられるものも多く確認された。

②両生類の種ごとの感染状況

種ごとの感染率を**表3-4**右欄にまとめた。100個体分以上のサンプルを解析した種について種ごとの感染率を見ると、ニホンアマガエル1個体(解析済み238個体中/0.4%)、トノサマガエル1個体(同186個体中/0.5%)、ヌマガエル1個体(同229個体中/0.4%)、ウシガエル6個体(同77個体中/7.8%)、ツチガエル1個体(同108個体中/0.9%)となっていた。在来種の陽性個体は1個体または2個体ずつであったが、外来種であるウシガエルは他の種に比して陽性の割合が高かった。陽性が確認された種はアマガエル科、アカガエル科等にまたがっており、ウシガエルを除くと、特定の種や分類群に集中する傾向は認められなかった。

解析個体数が少ない種についてみると、オオサンショウウオ23個体中2個体、シリケンイモリ23個体中2個体、アフリカツメガエル7個体中2個体がそれぞれ陽性とされた。これらの種では解析個体数に対する陽性個体の率が高く、野外において高い割合で感染している可能性も考えられる。とりわけアフリカツメガエルでは解析を実施した7個体中2個体が陽性とされ、野外で定着しつつある本種が高率でカエルツボカビを有している可能性が示唆された。

③地域ごとの感染状況

地方ブロック別の感染状況を**表3-5**に示した。陽性個体は本州および沖縄島から確認された。北海道、四国、九州などでは陽性個体の確認はなかった。両生類の種をまとめて地域ごとの陽性個体数をみると、東北地方、関東地方、中部地方、近畿地方、中国地方などから各々1から数個体の陽性個体が確認されており、特定の地域に集中する傾向は認められなかった。

表3-5 地方ブロックごとの陽性個体の率

地方ブロック	サンプル数	陽性個体数	陽性個体率(%)
北海道	275	0	0.00
東北	390	3	0.77
関東	546	2	0.37
中部	899	3	0.33
近畿	393	5	1.27
中国	465	1	0.22
四国	227	0	0.00
九州(除く南西諸島)	595	0	0.00
南西諸島(奄美~八重山)	1,388	2	0.14
全国合計	5,178	16	0.31

④採取された時期ごとの感染状況

野外で採取された時期別の感染状況を図3-9に示した。多くのサンプルが採取された盛夏には感染個体の率が低く、6月や10月にやや高い傾向がうかがえた。なお、1月から3月の区分で感染率が高くなっているが、これは検査個体の数が少ないことに起因している。

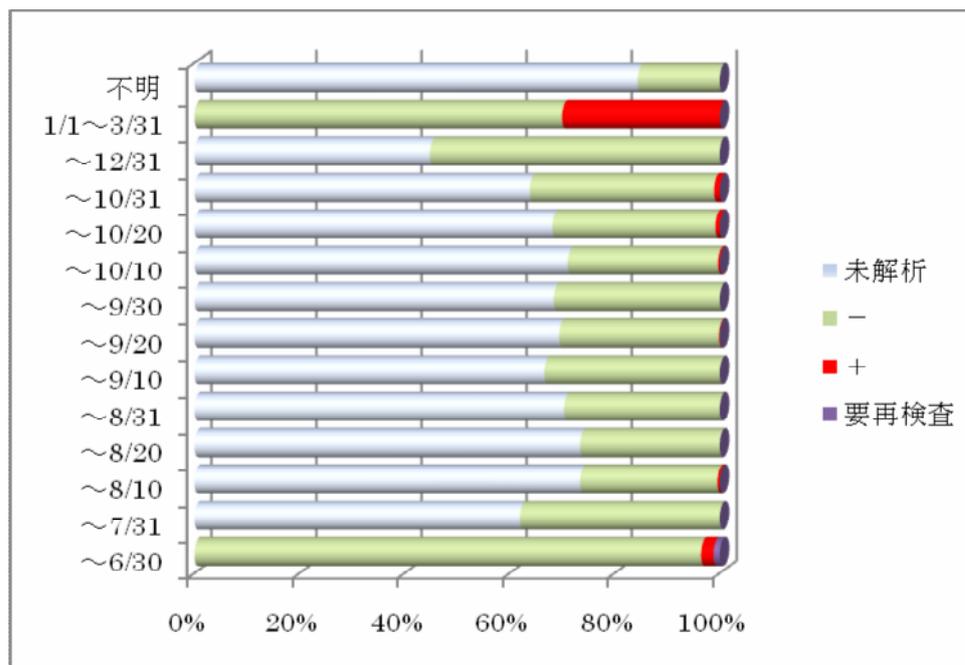


図3-9 採取時期別の感染率

2. 野外での両生類の状況に関する情報収集

感染状況調査のマニュアル（巻末資料）には、スワブサンプルの採取時に野外で両生類の不審な死体が確認された場合、状況を当センターに知らせ、可能であれば死体の写真を送っていただくよう記載した。各地域の専門家等によって、北海道から沖縄までの合計944地点でサンプル採取がなされ、その際に両生類の観察、採集が実施されたが、不審な死体や病気と思われる個体などに係る情報提供はなかった。この他、当センターへのカエルツボカビに関する問い合わせ等が何件もあったが、調査期間中に不審な死体などの情報提供はなかった。

検討委員からの情報を合わせると、日本産の両生類において、野外でカエルツボカビ症と確認された個体はない。無論、地域の専門家が調査をしていない地点は多数あり、また、日本の両生類を全種調べたわけではないが、少なくとも日本では、パナマで報告されたような集団感染や大量死が生じている状況ではないと結論される。

第4章：カエルツボカビ実態把握調査検討会の開催

カエルツボカビの実態把握に関して、環境省による野外の分布概況把握調査の実施や野外サンプルからのカエルツボカビDNA解析、また研究機関による菌の分離培養、感染試験等が進められてきた。日本産両生類に対する影響や野外における感染状況についての、現状把握と今後の対策などについての見解を取りまとめていく必要性が高いことからカエルツボカビ実態把握調査検討会を設置した。検討委員には、野生生物医学、病理学、生態学、両生類学、そして菌類学などの専門的知見を有する各方面の学識経験者（表4-1）に参画願い、調査研究の内容を共有し、我が国での現状についての認識を深め、今後調査すべき事項、当面必要な対策等を検討した。

表4-1 カエルツボカビ実態把握調査検討会検討委員（五十音順）

委員名	所属等
稲葉 重樹	(独)製品評価技術基盤機構 資源開発課 研究員
宇根 有美	麻布大学 獣医学部 准教授
太田 英利	琉球大学熱帯生物圏研究センター 教授
黒木 俊郎	神奈川県衛生研究所 微生物部 主任研究員
五箇 公一	(独)国立環境研究所 侵入生物研究チーム
平良 真規	東京大学 理学系研究科 准教授
羽山 伸一【座長】	日本獣医生命科学大学 獣医学部 准教授
福山 欣司	慶応義塾大学 生物学教室 准教授
松井 久実	麻布大学 獣医学部 講師
矢尾板 芳郎	広島大両生類研究施設 理学研究科 教授

引用・参考文献

- Annis S. L., Dastool F. P., Daszak P. Longcore, J. E., 2004. A DNA-based assay identifies *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians. *Journal of Wildlife Disease* 40: 420-428.
- Goka K., Okabe K., Yoneda M., Niwa S., 2001. Bumblebee commercialization will cause worldwide migration of parasitic mites. *Molecular Ecology*, 10: 2095-2099.
- 爬虫類と両生類の臨床と病理のための研究会, 2007. ツボカビ症に関する解説書. 爬虫両棲類学報 2007(1): 36-42.
- 爬虫類・両生類の臨床と病理に関するワークショップ事務局, 2007. 第6回爬虫類・両生類の臨床と病理に関するワークショップ・カエルツボカビ. 麻布大学病理学研究室.
- カエル探偵団, 2007. 野外でカエルツボカビを発見するための手引き. 爬虫両棲類学報 2007(1): 43-46.
- 黒木俊郎・宇根由美, 2007. 両生類のツボカビ症. 爬虫両棲類学報 2007(1): 20-31.
- 桑原一司, 2007. 両生類を救出せよーCBSG総会からの報告ー. 爬虫両棲類学報 2007(1): 31-35.
- Longcore J. E., Pessier A. P. and Nicholis D. K., 1999. *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. Nov., a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia* 91: 219-227.

卷末資料

カエルツボカビ感染状況調査実施の手順と留意点

カエルツボカビ感染状況調査実施の手順と留意点

1. サンプル採取地点の選定

● サンプル採取地点の要件

次のような地点を中心に採取を行います。

- ・市街地に近い場所：カエルツボカビが人為的にもたらされたものとする、山奥よりも市街地周辺で感染が起きていると考えられます。
- ・多くの種が生息する場所：なるべく多様な種の感染状況を把握する必要があります。
- ・ウシガエルの生息場所：この種はカエルツボカビのキャリアになることが知られており、ウシガエルと同じ場所に生息する他種のカエルのサンプルは重要です。
- ・安全に作業できる場所：両生類の生息する水辺には危険な場所もあります。安全には十分に注意してください。

● 捕獲等の手続きが必要な場所について

今回の調査は、概況調査であり、国立公園特別保護地区等の捕獲許可が必要な場所、捕獲許可が必要な種を積極的に調査対象としていただく必要はありません。自然公園の特別保護地区内での捕獲、種の保存法や条例に基づく指定種の捕獲、国や地方公共団体の指定する天然記念物（地域指定と種指定の場合がある）に関する捕獲に際しては手続きが必要です。また、自然公園、種の保存法、文化財関係以外にも捕獲、立入に自治体の条例等の規制がある場合がありますのでご注意ください。

● 河川での調査について

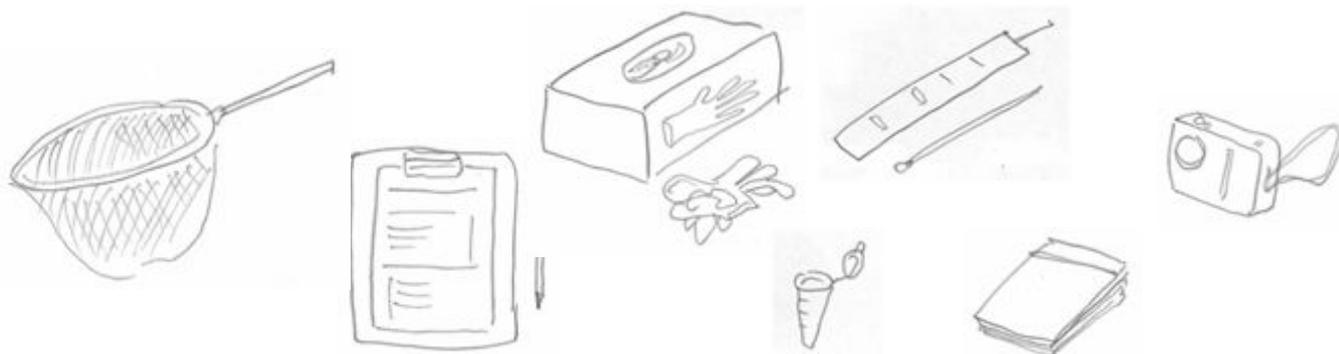
河川での調査を予定されている場合には、環境省外来生物対策室まで、対象河川名についてご連絡ください。河川管理者（国土交通省河川局）さんと、当該調査に関しご相談することとしております。

2. 調査器具等

事前に送付する綿棒、送付用チューブ、送付用ビニル袋、サンプル採取用の手袋以外の、各人に準備していただく器具等を以下に示します。

- ・ **網（たも網等）**：両生類捕獲用。場所により網の種類を検討ください（たも網、水槽用の小型の網など）。
- ・ **長靴等**：カエルツボカビ菌の分布拡大防止のため調査地で使う靴を用意。水辺での調査が多いと想定され、消毒のしやすさも考えると長靴が良いと思われます。
- ・ **大型のビニル袋**：使い捨てる手袋等を入れる、移動時に網にかける、靴を運ぶ等に使うため数枚必要です。
- ・ **デジタルカメラ**：種の同定用の写真撮影用。3－3）◆写真の撮影を参考に必要な写真が撮れているかどうか、その場で確認してください。
- ・ **記録票**：サンプルに関する情報を記載するもの。
- ・ **筆記用具**：サンプルへの記入用に油性サインペン、調査票への記入用に鉛筆など。
- ・ **調査地点を含む地形図のコピー**：サンプル送付時には地図のコピーに採取場所を記入したものを同封します。野外で必須ではありませんが、予想外の場所で捕獲した場合などのために準備した方がよいです。

- ・ **消毒液**：家庭で使う塩素系漂白剤（キッチンハイターなど）、または塩化ベンザルコニウム消毒薬（オスバンSなど）。帰所してから消毒する場合には現地に持ってゆく必要はありません（→3の1）を参照）。
- ・ **バケツ**：長靴や網の消毒用。現地で消毒をする場合はフタ付きで密閉できるものが便利。帰所してから消毒する場合には現地に持ってゆく必要はありません。
- ・ **柄付きたわし**：長靴等を消毒する際にあると便利です。帰所してから消毒する場合には現地に持ってゆく必要はありません。



3. サンプル採取について

1) カエルツボカビ菌の拡散防止のための配慮

◇現時点ではカエルツボカビ菌の野外での分布は不明ですが、調査を行うことによりカエルツボカビ菌を不用意に拡散させる可能性は極力避ける必要があります。

◇カエルツボカビ菌は感染した両生類の表皮に存在しており、その周囲の水や泥にも含まれる可能性があります。菌は水や湿った泥の中である程度生きていることが分かっています。したがって、拡散防止のためには、第一に生きた両生類（オタマジャクシを含む）を決して移動させないこと、第二に野外の泥や水を移動させないことが重要です。

◇同一日に2箇所以上の調査地点で調査をする場合で、同じ長靴、網等を用いる場合は現地（駐車した場所等）での消毒作業が必要になってきますが、現地での消毒作業は消毒液の野外への放出等の心配もあることから、複数地点で調査を行う場合は複数の長靴、網を用意するなど、なるべく消毒は帰所してから行うようにしてください。帰所してから消毒する場合は、長靴は大きな泥は現地で落としビニル袋に入れて持ち帰ってください。網（特に先端の網の部分）も同様です。

◇消毒の一般的な方法として以下のような方法が推奨されていますので、消毒の対象物の材質などに応じて使い分けください（例：塩素系漂白剤は金属を腐食し衣類などを漂白してしまいます）。

①、②とも器具を浸けるための容器が必要ですが、長靴や網（特に編目の部分）がある程度浸るような大きさのバケツなどが便利です。どうしても浸からない部分は柄付きたわしで消毒液をかけながら消毒します。また、駐車した場所で消毒液に浸ける場合はフタ付きの容器が便利です。使用した消毒液は野外に流さず、下水に流してください（特に駐車スペースで実施する際には注意）。

① 下記の消毒液に15分程漬け置きの後水洗い。

- ・キッチンハイター50ml に対し水5リットルかそれ以上の濃度＝塩素濃度200ppm以上
- ・オスバンS（薬局で入手可能）10ml に対し水2～5リットル＝200～500倍希釈液

② 50℃以上の熱湯に5分程漬ける。

2) サンプル採取日・採取対象について

◇サンプル採取は各地点同日に行う必要はありません。同一地点でも種によって日が違っていても

構いません。同一種を別の日に捕獲することも可です。

◇ウシガエルについては、捕獲が容易でない場合が多いため、無理に捕獲しサンプル採取する必要はありません。駆除等で捕獲個体が得られる場合などにサンプルを採取してください

3) サンプル採取の具体的手順

◆調査準備（持ち物チェック、現地（駐車した場所）で消毒が必要な場合は消毒液の準備）

◆両生類の捕獲

◇両生類を発見したら、捕獲する方はまず手袋をしてください。

◇手捕りを推奨しますが、種や場所によっては困難なこともあります。手捕りが困難と思われる場合は網を使って捕まえます。

◇綿棒（両生類1匹につき2本）、チューブ（同）、ビニル袋（小：両生類1匹につき1枚）、油性サインペン、記録票を準備。

◇両生類を1人が持ち、もう1人が綿棒、チューブなどを準備してください。

※複数人で行う場合、例えば、調査者甲が両生類の捕獲と保定専門、乙は綿棒でのサンプル採取、チューブ・ビニル袋への保存、写真撮影、記録票記入等と分担を決め、乙は両生類に直接触れなければ手袋を装着する必要はなくなり、その他の作業も効率よく実施できます。

◇オタマジャクシや変態前のエラが外から見えるイモリの幼生はサンプル採取の対象外です。

◇両生類についている土や泥を綿棒で一緒にかき取ると DNA 検査に支障が生ずることがありますので、捕獲時に両生類に土や泥が付着していたら、現場の水で簡単に洗い流してください。

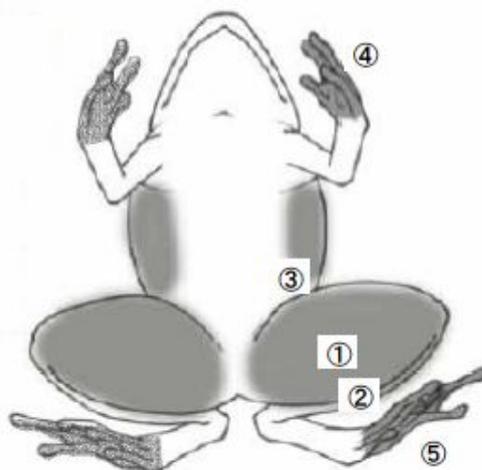
◆サンプルの採取

◇下図に従い綿棒で体表面を拭きます。

サンプルの取り方

・手袋をつけて、肢を伸ばして裏返しの状態にして持ち、綿棒で以下の部分を軽くこすってください。綿棒は片面だけにならないように、たまに回転させてください。

- ① 太ももの裏を数回
- ② そのまますねの裏も数回
- ③ 足の付け根から下腹にかけて数回
- ④ 綿棒の先を手に持たせる感じ
- ⑤ 後肢裏側の指、水かきを広げるように



・大型で固定するのが難しい種の場合は、大きめのビニル袋を裏返して手をいれ、両生類を捕まえて元に戻しビニル袋に入れてしまった後（イヌの糞を拾うのと同じ）、綿棒の中に入れてサンプルをとります

・力が強く、大きく跳躍する種は、捕獲網から直接ビニル袋に入れてしまったほうが良いでしょう

- ◇イモリの場合は腹部、足の指の他に、あごの下、背中なども拭い、陰部は拭わないように気を付けましょう（陰部を刺激すると尿によりサンプルの質が低下します）。
- ◇1個体から必ず綿棒2本分のサンプルを取って、別々のチューブに入れてください。1本目と2本目は両生類の体の左右で分けるのがよいでしょう。
- ◇綿棒の先端 **3.5cm**（チューブにちょうど収まる長さ）を折りとってチューブに入れ、蓋を閉めます。柄が長すぎるとチューブの蓋が開いてしまい、短かすぎると DNA 抽出作業上支障がありますのでご注意ください。
- ◇それぞれのチューブの側面に油性マジックで標本番号のうち個体の通し番号を書きます（1, 2, 3, 4・・・番号の付し方は「◆記録票の記入」参照）。
- ◇ビニル袋（小）の表面に同一の標本番号を記入し、2本のチューブをまとめて入れます。
- ◇「記録票の番号」「ビニル袋の番号」「写真記録の番号」がそれぞれ一対一で対応できるよう、記録票に必要なデータを記入します。必要に応じ現地で地図に採集地点を記録します。
- ◇手袋は捕獲個体毎に使い捨ててください。

◆両生類の撮影

- ◇両生類の撮影をします。撮影した両生類の記録票の番号が判るようにしておいてください。
- ◇1匹の両生類について、下の例のように撮影してください。
 - カエル類：斜め上から1点、腹面を1点、計2点。
 - イモリ：真上から1点。
- ◇写真をもとに種の同定をしますので、デジカメで撮影し現地で画像を確認し、ピントの合ったものを選んで送ってください。
- ◇暴れて撮影が難しい場合には、後足を押さえて撮影します。
- ◇画像データのファイル名と記録票の番号が後から対応できるようにしてください。
- ※現地調査の経験が豊富で確実に種を判定できる方は、撮影は必要ありません。



背面:斜め上から(真上からではない)



腹面:のどから腹の様子が分かるように

◆サンプル採取・写真撮影後

- ◇全て終了したら捕獲地点で両生類を速やかに放します。
- ◇帰所するまでの間、サンプルは直射日光の当たらない場所で保管してください。
- ◇移動の前に、靴裏や網などの泥をよく落としてください。
- ◇同一日に別の調査地点へ移動して調査を実施する場合には、網はそれぞれ別のものでお使いください。長靴は駐車した場所で消毒するか別のものを用いてください。
- ◇帰所後、網、長靴など再使用するものは、消毒した後、水洗して風乾しておきましょう。
- ◇持ち帰ったゴミ類はゴミ袋ごと燃えるゴミとして廃棄します。

調査日 : 2007年 7月12日

調査者 ○○ ○○、○○ ○○

地形図名 2.5万分の1 東京首都

標本番号	種名(わかれば)	採集場所(調査地点名、市町村名までの所在、わかれば通称など)	写真の有無	備考
070712-1	アマガエル	調査地点A 東京都千代田区 日比谷公園内	あり	
070712-2	"	"	あり	
070712-3	"	"	あり	
070712-4	アマガエル	"	あり	
070712-5	"	"	あり	
070712-6	アズマヒキガエル	調査地点B 東京都千代田区 日比谷公園内	あり	
070712-7	"	"	なし	

種名が不明の場合は空欄でも結構です

◆調査地点図

国土地理院発行の地形図(2万5千分の1か5万分の1)のコピーに、サンプル採取地点を丸で囲み、調査票の調査地点名(アルファベット)と対応できるよう名称を記載してください。地形図は調査地点の位置がわかれば、必ずしも最新のものである必要はありません。

調査地点図(例)



◆写真：各サンプル毎カラープリントして、裏面に対応する標本番号を明記してください。カエルは1匹につき2枚（斜め上から、腹面）、イモリは1匹1枚です。

◆サンプルの発送

◇記録票に必要事項が記入されているか確認。

◇調査地点図、写真のプリント（写真の裏に標本番号を記入）を確認

◇ビニル袋（小）に入っているサンプル、記録票、調査地点図、写真をセットにしてビニル袋（大）（チャック付き）に入れる

※1調査地点のものを1つのビニル袋（大）にまとめる、調査日が同じものを1つのビニル袋（大）にまとめる等、サンプルをいくつかまとめてください。

◇梱包にあたっては、発泡スチロールなど断熱する素材の箱に入れなくてください。冷凍で送っても輸送中箱の中まで冷気が届きません。

◇送付状に発送者名を記入の上、クール便の冷凍（-18℃）で送付。着払いで下記宛先までお送りください。なお、通常、最寄りの営業所に連絡すると集荷サービスがあります。

◇1月に1～2回程度、ある程度サンプルがまとまった段階でお送りください

サンプル送付先：〒305-8506 茨城県つくば市小野川 16-2

国立環境研究所 環境リスク研究センター（五箇公一・鈴木一隆宛）

電話：029-850-2480

4 その他

◆両生類の死体の取扱いについて

◇死体からのサンプリングは死体の鮮度により判断が難しいと予想されるため対象としません。
また、死体を送付いただいても対応が出来ませんので死体は送らないようお願いいたします。

◇死体が発見された場合は、周辺で生きた個体（可能であれば弱っている個体）を見つけてサンプリングを実施して下さい。

◇一箇所で複数の死亡個体が見つかった場合は、カエルツボカビ感染の疑いがある一方、他の原因での死亡も十分考えられるので、両生類以外の生物も合わせて死亡していないか、最近農薬等の散布が行われた事実がないかなど可能な範囲でご確認ください。あわせて、下記の問い合わせ先宛にご連絡ください。

問い合わせ先：〒110-8676 東京都台東区下谷 3-10-10

財団法人 自然環境研究センター・カエルツボカビ係（担当・戸田、中山、加納）

電話：03-5824-0969 ファクス：03-5824-0970

平成19年度

カエルツボカビ実態把握調査検討業務報告書

平成20年3月

財団法人 自然環境研究センター

〒110-8676東京都台東区下谷 3-10-10

Tel 03-5834-0960

Fax 03-5824-0961