

平成 20 年度

カエルツボカビ実態把握調査検討業務報告書

平成 21 年 3 月

環境省自然環境局 野生生物課

はじめに

両生類の体表に寄生する真菌であるカエルツボカビは、20 世紀中に世界の他の地域に拡散し、21 世紀に入りオーストラリアや中南米などの地域でカエル等の個体群密度を劇的に減少させるなど、世界の両生類の減少の大きな要因と考えられている。日本においては、平成 18 年 12 月に飼育下のカエルにおいて初めてカエルツボカビへの感染が確認された。さらに平成 19 年 6 月には野外由来のカエル体表からカエルツボカビのものと思われる遺伝子が検出されたとの報国がなされ、これまで十分な知見のないカエルツボカビの実態及びわが国における両生類への影響を把握し、わが国の両生類の保護対策の必要性等を検討することが必要となっている。

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。本報告書が、国内の両生類の危機を軽減させ、カエルツボカビをはじめとする非意図的に導入される外来生物への対策の一助となれば幸いである。

なお、日本におけるカエルツボカビの実態を把握、検討する上で、大学等の研究機関に所属する 5 名の専門家の方々、並びに、全国の野外サンプルの採取を実施していただいた地域専門家、関係者の方々に、感謝の意を表する次第である。

平成 21 年 3 月
環境省自然環境局 野生生物課

平成 20 年度カエルツボカビ実態把握調査検討業務・協力専門家

稲 葉 重 樹 (独)製品評価技術基盤機構 生物遺伝資源開発部門研究員
宇 根 有 美 麻布大学獣医学部准教授
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・リーダー
松 井 久 実 麻布大学獣医学部講師

要 約

○目的

本業務は、カエルツボカビの国内野外分布を明らかにすること、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を調べること、カエルツボカビの消毒等に関する情報を取りまとめること、その他の両生類の感染性疾患に関する情報を取りまとめることにより、カエルツボカビを含む病原体が日本の両生類に及ぼす影響についての検討に資することを目的として実施された。

○カエルツボカビの国内野外分布の把握

昨年度の調査で陽性個体が確認された地点において、引き続き陽性個体が見られるかどうかの検証を行った。昨年度陽性個体が確認された計 16 地点のうち、昨年度と同一地点でサンプルの採取が可能であった 10 地点に加え、上記 16 地点の周辺箇所でもサンプルの採取を試み、合計 27 地点で合計 19 種（亜種を含む）の両生類から 168 サンプルが採取された。PCR 検査の結果、陽性とされたものは 30 サンプル（陽性率は $30/168=18\%$ ）であった。

陽性個体が見られた種はウシガエル、シリケンイモリ、アフリカツメガエル、ヌマガエルの 4 種であった。種ごとの陽性率は、ウシガエル 82%（18 個体／22 個体）、シリケンイモリ 45%（9 個体／20 個体）、アフリカツメガエル 20%（2 個体／10 個体）、ヌマガエル 20%（1 個体／5 個体）であり、特にウシガエルとシリケンイモリの陽性率が高かった。陽性とされた 30 サンプルのうち、DNA 配列が判明したものは 7 サンプルであった。これらはいずれもシリケンイモリのサンプルであり、海外で高い病原性を有することが報告されている A タイプは 5 例確認され、E タイプと W タイプがそれぞれ 1 例ずつ確認された。これまでの海外の研究ではこのように多様なハプロタイプは確認されておらず、日本におけるカエルツボカビの分布状況は、両生類の大量死が確認されているオーストラリアや中南米とは異なっていることが示唆された。例えば、以前から国内にカエルツボカビが分布し、徐々に多様化してきた可能性が考えられた。

地域ごとの陽性率が最も高いのは中国地方の 80.0% であり、次いで九州（除く南西諸島）の 46.7%、南西諸島の 45.0% となっており、全国的には、中国以西について高い傾向が認められた。しかし、カエルツボカビが検出された全地点において両生類の不審死体は認められなかった。

○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

カエルツボカビ菌の生物学的特性について指摘した海外の研究を中心に、情報を取りまとめた。

○カエルツボカビの消毒等に関する情報の取りまとめ

推奨される消毒方法について有識者へのヒアリング及び文献調査を行った。その結果、「化学的処理等がなされる下水に流すのであれば、飼育水を消毒せずとも問題はない」との指摘がある一方、「予防原則に従えば、消毒を行うことが望ましい」との意見もあった。両生類飼育排水の消毒や野外調査等の器材の消毒の方法については、60℃以上の温水で15分以上放置することや、塩素系漂白剤、次亜塩素酸ナトリウムの使用などが推奨された。カエルツボカビ症に罹患した両生類の治療には、ヒトの真菌症の治療薬であるイトラコナゾールが有効であるとされた。

○その他の両生類の感染性疾病に関する情報の取りまとめ

既存文献に基づき両生類の感染性疾病に係る情報を取りまとめた。具体的には、北米、オーストラリア、イギリスの各国におけるラナウイルスによる両生類の被害状況、ラナウイルスの検出方法、ラナウイルス及びその他の病原性ウイルスに係る近年の基礎的研究などについてレビューした。

英文要約

Chitridiomycosis in Japan: a status report for 2008 and 2009

Executive Summary

The aim of our study was to examine effects of pathogens, including *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), on Japanese amphibians. We investigated the distribution, ecology and potential effects of *Bd* on these animals, sterilization methods for *Bd* in the laboratory and other reported infectious disease of amphibians.

Japanese distribution of *B. dendrobatidis*

In 2008, we obtained 168 swab samples from 19 amphibian species (including subspecies) in 27 plots of the country, including 16 plots where animals positive for *Bd* had been collected in 2007. PCR analysis showed that 18% of samples were *Bd* positive. *Bd* was detected in four species, viz. 82% (18/22) of bullfrog *Rana catesbeiana* samples, 45% (9/20) of sword tailed newt *Cynops ensicauda* samples, 20% (2/10) of African clawed toad *Xenopus laevis* samples, and 20% (1/5) of Indian rice frog *Fejervarya limnocharis* samples.

We determined seven DNA sequences for *Bd* detected in sword tailed newt samples. Five were type A sequences with high pathogenicity in other countries, one was type E, and one was type W. Several haplotypes found had not been reported previously from Australia, Central America, or South America, where there are *Bd* pandemics. This suggests that the spreading process of *Bd* in Japan differs from those in regions. It is very likely that *Bd* was distributed throughout Japan, and that its haplotypes were already diverse prior to first reports in the country.

The *Bd* positive rate was high from the Chugoku region westward [80.0% in Chugoku, 46.7% in the Kyushu region (except Nansei Islands), and 45.0% on the Nansei Islands]. No suspicious amphibian carcass was found in any of the sampling plots.

***B. dendrobatidis* ecology and effects on Japanese amphibians**

We gathered information on *Bd* biological characteristics from the literature.

***B. dendrobatidis* prevention and sterilization**

We held expert hearings and reviewed published literature to assemble a body of information on methods to prevent *Bd* infection in wild amphibians. One expert suggested that

the sterilization of amphibian breeding water is unnecessary when it is drained into sewage destined for chemical treatment, but others suggested that water should be always sterilized according to the principles of infectious disease prevention. Methods considered effective for sterilizing field equipment and breeding water included soaking equipment in water $>60^{\circ}\text{C}$ for more than 15 min, or application of chlorine-based bleach or sodium hypochlorite. In addition, itraconazole was considered an effective treatment for amphibians with chitridiomycosis.

Other infectious diseases of amphibians

We assembled and reviewed information on infectious disease of amphibians (including damage caused by ranavirus in North America, Australia, and UK), detection methods for ranavirus, and recent fundamental studies on ranavirus and other pathogenic viruses.

目 次

はじめに

要約・英文要約

第1章：調査の背景と目的----- 1

第2章：カエルツボカビの国内野外分布の把握----- 3

1. 野外におけるカエルツボカビ確認地点における分布概況の調査----- 3

2. カエルツボカビの感染率が高い可能性のある両生類の調査----- 13

第3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 -- 16

1. カエルツボカビの消毒方法に関する情報の収集及び取りまとめ----- 16

2. 国内に生息する両生類のカエルツボカビへの感受性に関する情報収集----- 19

第4章：カエルツボカビに関する情報の取りまとめ----- 21

第5章：その他の両生類の感染性疾患に関する情報の取りまとめ ----- 31

引用・参考文献----- 66

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----- 68

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	野外におけるサンプル採取の手順	4
図 2 - 2	綿棒によるスワブサンプルの採材・保管方法	5
図 2 - 3	調査地点図の例	7
図 2 - 4	1 次 PCR によるカエルツボカビ DNA の ITS 領域合成の原理	8
図 2 - 5	2 次 PCR によるカエルツボカビ DNA の ITS 領域合成の原理	9
図 2 - 6	ゲノム PCR 法による検査結果の一例	9
図 2 - 7	地方ブロック別サンプル採取月	10
図 2 - 8	採取時期別感染率	13
表 2 - 1	野外調査における記録票の例	7
表 2 - 2	地方ブロック別サンプル数	10
表 2 - 3	両生類の種ごとのサンプル数と解析状況	11
表 2 - 4	地方ブロックごとの陽性個体の率	12
表 2 - 5	地方ブロック別サンプル数	14
表 2 - 6	ウシガエルの感染状況（地方ブロック別）	15
表 2 - 7	アフリカツメガエルの感染状況（地方ブロック別）	15
表 2 - 8	シリケンイモリの感染状況（地方ブロック別）	15

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、すなわち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、また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、宿主（ホスト）と寄生生物（パラサイト）との間には長い共存の歴史の中で共進化が認められ、宿主は寄生生物による影響に抵抗性を具える方向に、また寄生生物は宿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おらず、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、宿主に対して致死的で、宿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も、この病原体が両生類に対して新興感染症を引き起こすもの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、生きた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。一説には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、国内における分布状況を把握すること、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。

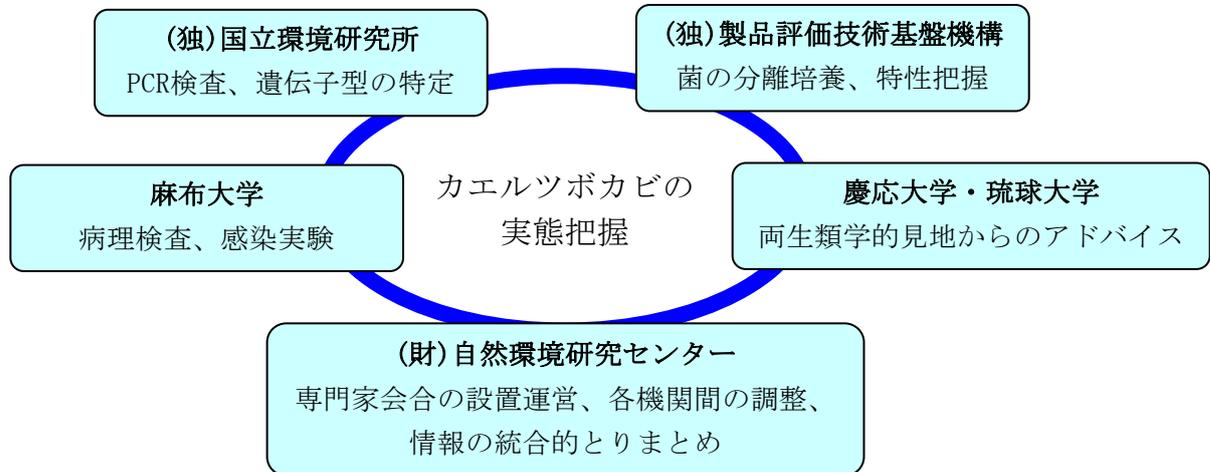


図 1 - 1 カエルツボカビ実態把握調査検討業務の体制

第2章：カエルツボカビの国内野外分布の把握

1. 野外におけるカエルツボカビ確認地点における分布概況の調査

(1) 背景

平成19年度の調査として、(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、環境省は平成19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。これらの結果から、野外における両生類のカエルツボカビ感染状況は概ね下記の通りであることが判明している。

①解析済みのサンプルに対する陽性率

全国の調査地点944地点ごとに採取できた各種1個体から解析を実施し、昨年度は全サンプルのうち31.6% (1638サンプル/全5178サンプル) の解析を行った。平成20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サンプルで、陽性率は0.98%であった。

陽性とされた16サンプルのDNA配列を調べると、高い病原性が知られ、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が多く確認された。

②両生類の種ごとの感染状況

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陽性率を見ると、ニホンアマガエル0.4% (1個体/解析済み238個体中)、トノサマガエル0.5% (1個体/同186個体中)、ヌマガエル0.4% (1個体/同229個体中)、ウシガエル7.8% (6個体/同77個体中)、ツチガエル0.9% (1個体/同108個体中)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率が高かった。

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

陽性個体は本州及び沖縄島の14地点から確認された。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ブロック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。

(2) 目的

上記の背景を受けて、本年度は下記の目的で国内分布状況の把握を実施した。

- ①昨年度にカエルツボカビのDNAが確認された地点・種において、本年度も継続的にカエルツボカビが検出されるかどうかを検証すること。
- ②カエルツボカビのDNAが確認された地点において、両生類の異常死や減少が生じていないかどうかを確認すること。

(3) 解析手法

1) 解析の2段階

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。

2) 野外におけるスワブサンプル採取の手法

スワブサンプルの採取は、平成19年度と同様に下記の方法で行った。

① 調査器具等

事務局から、サンプル採取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、地形図などを準備するよう依頼した。

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2-1**の通りであった。

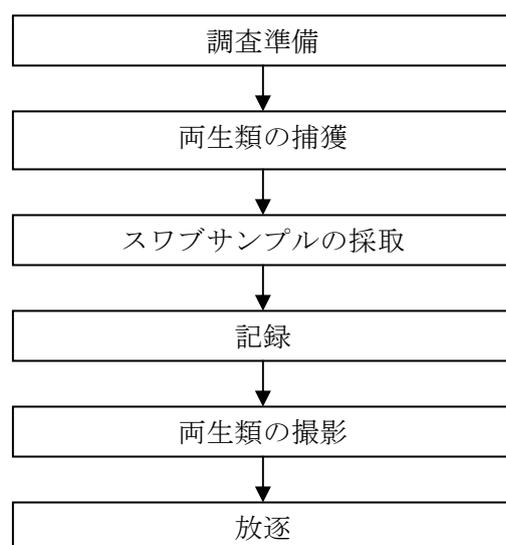


図2-1 野外におけるサンプル採取の手順

綿棒によるスワブサンプルの採材は**図2-2**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。

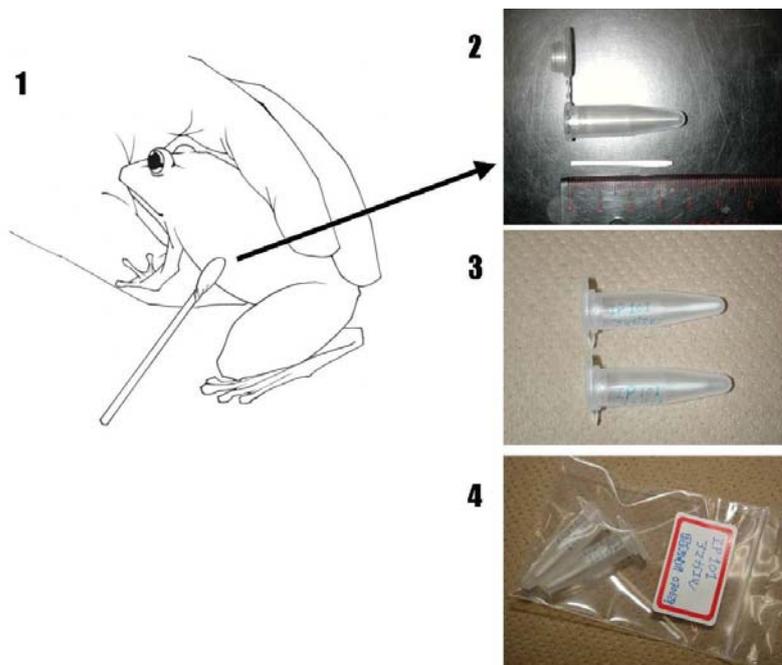


図2-2 綿棒によるスワブサンプルの採材・保管方法

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を可能な範囲

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、事務局に報告するよう依頼した。

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10人程度に協力していただいた。

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における調査では、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2-1**）及び調査地点図（**図2-3**；原則として2.5万分の1）の送付を依頼した。

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。

表 2 - 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 東京首部

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 2 - 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、タンパク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反应用の鋳型（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DNA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2-4**）、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2-5**）。

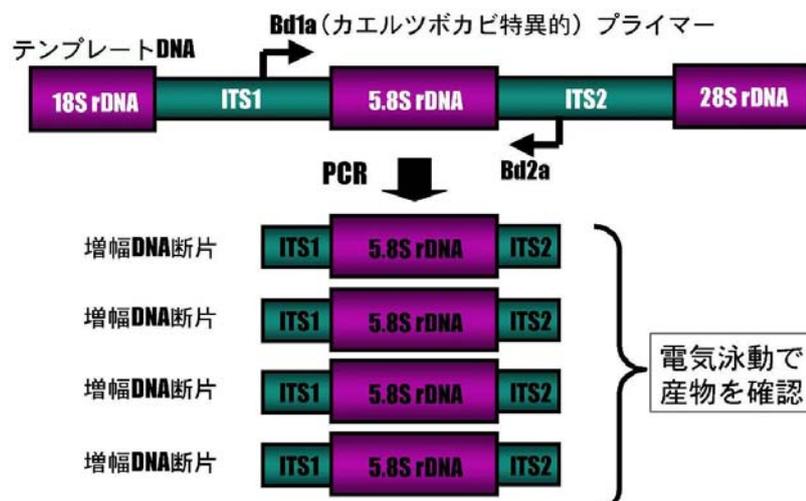


図2-4 1次PCRによるカエルツボカビDNAのITS領域合成の原理

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。

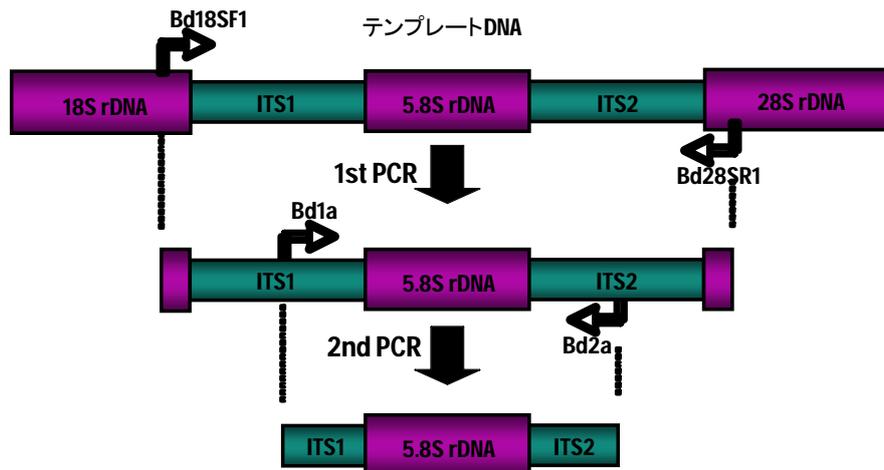


図 2-5 2次PCRによるカエルツボカビDNAのITS領域合成の原理

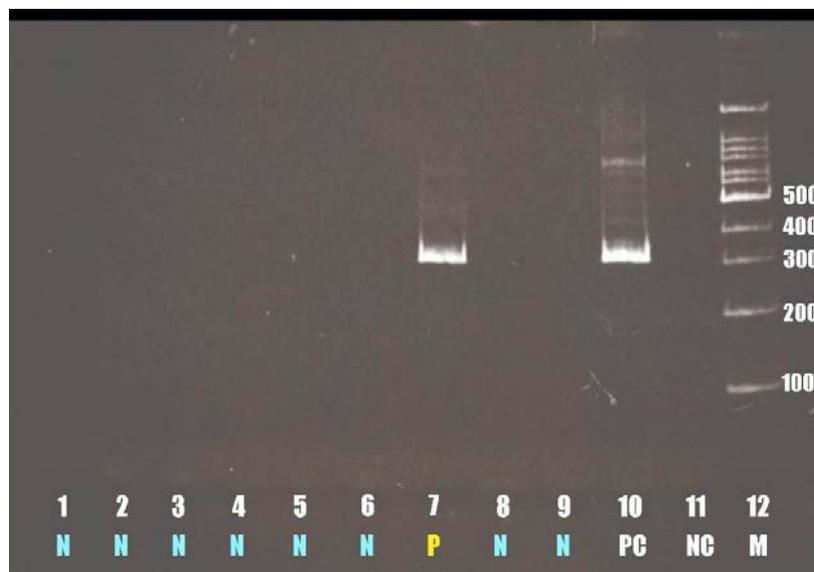


図 2-6 ゲノムPCR法による検査結果の一例

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。

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 2-6）。

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。

(4) 結果

1) サンプル採取地点とサンプル数

地方ブロックごとのサンプル採取地点数、サンプル数および陽性個体数を表2-2にそれぞれまとめた。昨年度調査で陽性個体が確認された本州から沖縄の計16地点のうち、昨年度と同一地点でサンプルの採取が可能であったのは10地点であった。さらに、陽性個体が確認された地点周辺でサンプルの採取を試み、合計27地点で168サンプルが採取された。

地方ブロック別のサンプル採取月を図2-7に示した。東北、関東は採取月がばらつくが、中部以南は採取月が集中している。

表2-2 地方ブロック別サンプル数

地方ブロック	採集地点数		サンプル数	
	同一地点	周辺地点	同一地点	周辺地点
北海道	0	0	0	0
東北	1	2	5	18
関東	1	9	6	66
中部	1	0	7	0
近畿	1	6	9	12
中国	1	0	10	0
四国	0	0	0	0
九州(除く南西諸島)	3	0	15	0
南西諸島(奄美～八重山)	2	0	20	0
全国合計	10	17	72	96

同一地点とは、昨年度調査で陽性個体が発見された地点のことを示す。

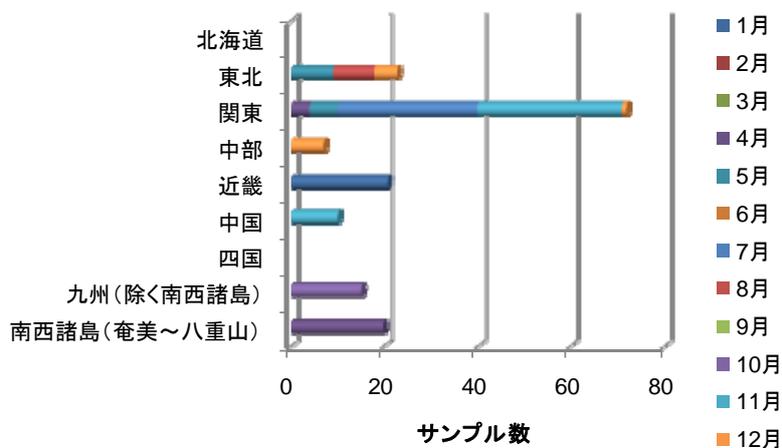


図2-7 地方ブロック別サンプル採取月

2) 種別のサンプル数

合計19種（亜種を含む）の両生類からサンプルが採取された（表2-3）。最も多くの個体が得られた種はニホンアマガエルの42個体で、全サンプルの25%を占めていた。次いで、ウシガエル（22個体・13.1%）、シリケンイモリ（20個体・11.9%）、ニホンアカガエル（16個体・9.52%）の順であった。

表2-3 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	陽性	陰性	陽性率
カスミサンショウウオ	2	0	2	0.0
ハコネサンショウウオ	3	0	3	0.0
アカハライモリ	2	0	2	0.0
シリケンイモリ	20	9	11	45.0
アズマヒキガエル	7	0	7	0.0
オオヒキガエル	10	0	10	0.0
ニホンアマガエル	42	0	42	0.0
タゴガエル	4	0	4	0.0
ニホンアカガエル	16	0	16	0.0
ヤマアカガエル	4	0	4	0.0
トノサマガエル	2	0	2	0.0
トウキョウダルマガエル	3	0	3	0.0
ヌマガエル	5	1	4	20.0
ウシガエル	22	18	4	81.8
ツチガエル	6	0	6	0.0
シュレーゲルアオガエル	3	0	3	0.0
モリアオガエル	1	0	1	0.0
カジカガエル	5	0	5	0.0
アフリカツメガエル	10	2	8	20.0
野外両生類集計	167	30	137	18.0

3) PCR検査結果

①解析済みの全サンプルに対する陽性率

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。平成20年度末の時点で解析は全て終了しており、陽性とされたものは30サンプルであり、全サンプルの18%であった。今年度のサンプル採取は、平成19年度調査によって陽性反応が見られた地点に絞って行われたために、陽性率は昨年度の0.98%（16サンプル/全1621サンプル）にくらべて大幅に上昇した。

陽性とされた30サンプルのうち、DNA配列が判明したものは7サンプルであった。これらはいずれもシリケンイモリのサンプルであり、海外で高い病原性を有することが報告されDNAデータベースに登録されているもの（Aタイプ）が5例確認され、EタイプとWタイプがそれぞれ1例ずつ確認された。これまでの海外の研究ではこのように多様なハプロタイプは確認されておらず、日本におけるカエルツボカビの分布状況は、両生類の大量死が確認されているオーストラリアや中南米とは異なっていることが示唆された。例えば、以前から国内にカエルツボカビが分布し、徐々に多様化してきた可能性が考えられた。

②両生類の種ごとの陽性率の状況

種ごとの陽性率を**表2-3**の右端の列にまとめた。解析の結果、陽性反応が見られた種及び種ごとの陽性率は、ウシガエル82%（18個体／解析済み22個体中）、シリケンイモリ45%（9個体／同20個体中）、アフリカツメガエル20%（2個体／同10個体中）、ヌマガエル20%（1個体／同5個体中）であり、特にウシガエルとシリケンイモリの陽性率が高かった。

③地域ごとの陽性個体の確認状況

地方ブロック別の陽性個体の確認状況を**表2-4**に示した。陽性個体は関東以南から確認された。両生類の種をまとめて地域ごとの陽性個体数をみると、南西諸島で9個体と最も多く、次いで中国地方（8個体）、九州（除く南西諸島）（7個体）の順であった。一方、採取したサンプル数に占める陽性率が最も高いのは中国地方の80.0%であり、次いで九州（除く南西諸島）の46.7%、南西諸島の45.0%であった。陽性個体数および陽性率については、中国以西について高い傾向が見られた。

表2-4 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	0	0	-
東北	23	0	0.0
関東	72	1	1.4
中部	7	2	28.6
近畿	21	3	14.3
中国	10	8	80.0
四国	0	0	-
九州(除く南西諸島)	15	7	46.7
南西諸島(奄美～八重山)	20	9	45.0
全国合計	168	30	17.9

④採取された時期ごとの陽性個体の確認状況

野外で採取された時期別の陽性個体の確認状況を**図2-8**に示した。昨年度と比べ、サンプル採取地点数が少ないことや、月ごとのサンプル採取数に差が見られるが、陽性率が高い時期としては、10月（46.7%）と4月（37.5%）が挙げられた。

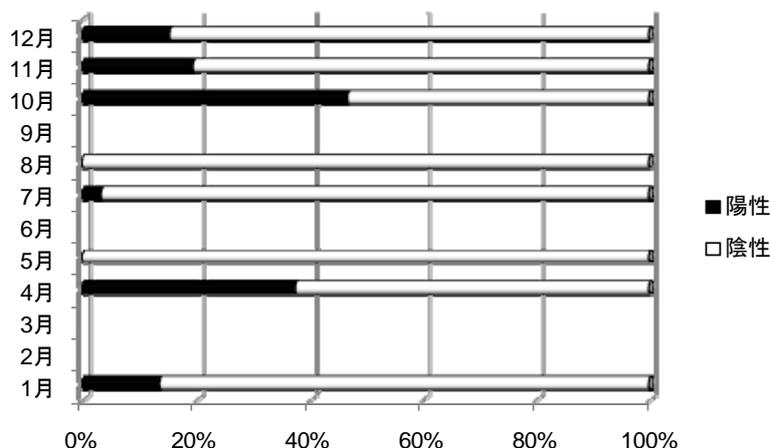


図 2-8 採取時期別の感染率

4) 両生類の不審死体の有無

感染状況調査のマニュアル（巻末資料 1）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（財）自然環境研究センターに知らせ、可能であれば死体の写真を送付するよう記載した。各地域の専門家等によってスワブサンプルが採取された合計 27 地点において、両生類の観察が実施された。

その結果、東北地方の調査地点のうち 1 点において、2008 年 11 月 15 日に、水田脇の水路でのウシガエルの死体確認が報告された。外傷はなく、捕食者や機械への巻き込み等による死亡ではないと考えられた。死体の入手はできず、病理学的な分析はできなかった。この地点のサンプルからはカエルツボカビの DNA は検出されなかった。

なお、他の 26 地点においては、両生類の不審死体の確認は報告されなかった。

2. カエルツボカビの感染率が高い可能性のある両生類の調査

(1) 背景と目的

昨年度の調査において、他の両生類に比して高率にカエルツボカビ DNA が検出されている種として、ウシガエル、アフリカツメガエル、シリケンイモリが挙げられる。このうちウシガエルは、「特定外来生物による生態系等に係る被害の防止に関する法律」により特定外来生物に指定されている。アフリカツメガエルはカエルツボカビの拡大への関与が指摘されていること、またウシガエルは国内各地に分布が拡大しており、在来のカエル類への影響が大きく、これら 2 種のカエルツボカビの野外における感染状況を把握することは重要である。また、シリケンイモリは南西諸島に分布し、我が国固有の両生類の分布が集中する地域にあたることから、今後、野外における感染状況を把握することが重要である。そこで、これらの種について、下記の情報を取りまとめた。

①カエルツボカビの遺伝子型ごとの分布状況及び全国の分布状況

平成19～20年度に環境省が実施した野外調査で採取されたサンプルに加え、過去に採取されたものも含めて可能な限り多くの野外サンプルを収集し、カエルツボカビの遺伝子型ごとの分布状況及び全国の分布状況についてとりまとめた。

②地域及び両生類の種類ごとのカエルツボカビの感染率

上記サンプルをもとに、ウシガエル、アフリカツメガエル、シリケンイモリの種ごとの感染率についてとりまとめた。

以上の調査項目における解析の手法、サンプル採取の手法、調査地点の整理と調査法およびPCR検査の手順は前項と同一である。

(2) 結果

1) サンプル数

ウシガエル、アフリカツメガエル、シリケンイモリの地方ブロックごとのサンプル採取地点数、サンプル数および陽性個体数を表2-5にまとめた。最もサンプル数が多かったのはウシガエルであり、アフリカツメガエルについては、野外での分布が確認されている関東および近畿地方においてサンプルが採取された。

表2-5 地方ブロック別サンプル数

地方ブロック	ウシガエル	アフリカツメガエル	シリケンイモリ
関東	13	3	
中部	2		
近畿	3	7	
中国	10		
九州(除く南西諸島)	7		
南西諸島(奄美～八重山)	2		20
計	37	10	20

2) 種別の解析状況

上記採取されたサンプルについて、感染状況の把握と国立環境研究所によるPCR検査の結果を表2-6、表2-7、表2-8にまとめた。

ウシガエルは、解析が済んでいない関東と、南西諸島(奄美～八重山)を除き、すべての地方ブロックにおいて60%を超える非常に高い確率で陽性個体が確認された。アフリカツメガエルは、採取地域の全てにおいて解析が終了し、関東、近畿ともに陽性個体が確認された。また、シリケンイモリは、採取サンプルの全ての解析を終了し、陽性個体が高い割合で確認された。

表 2-6 ウシガエルの感染状況（地域ブロック別）

地方ブロック	サンプル数	未解析	解析済み	陽性	陰性	陽性個体率 (%)
関東	13	13	0	0	0	
中部	2	0	2	2	0	100.0
近畿	3	0	3	2	1	66.7
中国	10	0	10	8	2	80.0
九州(除く南西諸島)	7	0	7	6	1	85.7
南西諸島(奄美～八重山)	2	0	2	0	2	0.0
計	37	13	24	18	6	75.0

表 2-7 アフリカツメガエルの感染状況（地域ブロック別）

地方ブロック	サンプル数	未解析	解析済み	陽性	陰性	陽性個体率 (%)
関東	3	0	3	1	2	33.3
近畿	7	0	7	1	6	14.3
計	37	0	10	2	8	20.0

表 2-8 シリケンイモリの感染状況（地域ブロック別）

地方ブロック	サンプル数	未解析	解析済み	陽性	陰性	陽性個体率 (%)
南西諸島(奄美～八重山)	20	0	20	9	11	45.0

第3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. カエルツボカビの消毒方法に関する情報の収集及び取りまとめ

(1) カエルツボカビの生物学的特性

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 μ m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。カエルの幼生では、ケラチンは口器にのみ分布しているので、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、症状が現れるようになり、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の種によって異なり、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。

○ハプロタイプ

カエルツボカビには、様々な遺伝子型があることが明らかにされつつある。昨年度までに飼育個体から検出されたスワブサンプル、野外調査によって全国から収集されたスワブサンプル、および博物館や動物園、水族館などで飼育展示されている個体から提供されたスワブサンプルについて、国立環境研究所において解析が進められた。その結果、全国から収集された5,300検体から、数十のハプロタイプが検出されている。このうち、オーストラリアや南米などで両生類の個体数減少を引き起こしたカエルツボカビはAタイプとされている。また、塩基配列がAタイプと類似しており、飼育下のカエルに対して強い病原性が確認されているものとしてCタイプがある。多様な遺伝子型をもつカエルツボカビのそれぞれの特性や危険性については、研究が緒に就いたばかりであるため、本報告書では現在までに得られた知見をもとにカエルツボカビの特性についてまとめた。

(2) カエルツボカビ菌の分離培養の試み

カエルツボカビ菌の分離培養は、昨年度に引き続き、独立行政法人製品評価技術基盤機構において分離培養実験を実施した。その結果、パナマ由来のカエルからAタイプ、ペット等流通個体からCタイプの培養菌株の確立に成功した。

(3) カエルツボカビの消毒方法に関する情報

カエルツボカビの防除に際しては、カエルを取り扱うことが多い、または希少種が生息する以下の各主体及び地域において、必要な検疫の強化と消毒方法の確立が重要となる。

- ・動物園飼育施設
- ・両生類の野外調査者
- ・両生類を扱うペットショップ
- ・両生を飼育している一般市民
- ・アフリカツメガエル飼育施設
- ・離島の発着口

カエルツボカビの生活史は遊走子と遊走子嚢の2段階からなるが、それぞれの温度、薬剤、塩分、乾燥などへの耐性をまとめ、菌が死滅する温度や薬剤の最低濃度等の条件を把握することが重要である。また、先述したように、カエルツボカビの遺伝子型には様々なタイプが存在することが明らかにされつつあるが、現在のところ各遺伝子型の病原性や在来種への影響については分からない部分が多い。このため、予防原則の観点から、カエルツボカビを含めた病原体を総合的に防除できる手法について確立することが重要である。

以下、既存のマニュアルで推奨されている内容に専門家の知見を加え、推奨される消毒

方法についてとりまとめた。

①両生類飼育排水の消毒

- ・60℃以上に温めた状態で15分以上放置する。
- ・100倍に希釈した塩素系漂白剤（キッチンハイターの場合は1リットルの水に対して10mlを加える）を用い、15分以上放置する。
- ・次亜塩素酸ナトリウムを用い、200ppmで15分以上放置する。

②野外調査等の器材の消毒

- ・カエルツボカビが濡れた靴や靴底に付着した土に混ざって運ばれるため、同じ靴や長靴で長距離の移動をしない。
- ・野外で使った靴や長靴は、新聞紙等の上で土を落とし、靴底にドライヤーの熱風を当てて完全に乾燥させる。
- ・カエルツボカビが付着している可能性のある道具（網など）は使い捨てにするか、使う度にビルコンS（輸入・販売元バイエル、主成分：過酸化化合物）を用い、0.1%溶液で5分以上放置して、消毒する。

③手指、飼育容器および器具等の消毒

- ・石鹼で手を洗い、洗い流した後に塩化ベンザルコニウム、グルコン酸クロルヘキシジンの希釈液（前者は0.05～0.1%溶液となるように、原液を100～200倍（水1Lに、本剤キャップ1～2杯）に薄めて使用し、後者は5%ヒビテン液を0.1～0.5%に希釈した水溶液として使用する）に浸して消毒する。
- ・飼育容器および器具等は、塩素系消毒薬の塩素濃度200ppm以上になるように希釈し、15分間浸漬した後に水洗する。
- ・飼育容器および器具等は、60℃以上の温水に15分以上の浸漬によっても消毒が可能である。

④罹患した両生類の治療

- ・ヒトの真菌症の治療薬（イトラコナゾール、フルコナゾール）を用い、1日1回15分の薬浴を5回繰り返す。ただし、罹患した両生類の治療については専門知識を要するため、薬浴の濃度等を含め、両生類の知識を有する獣医師（コア獣医師¹）に相談し、治療を行うことが望ましい。

⑤海外事例

- ・環境細菌（バクテリア）の1種で、ツボカビ菌を抑制する働きをもつことが報告された。
- ・オーストラリアで治療に用いられている方法で、クロラムフェニコールという抗生物

¹ カエルツボカビに係る地域ごとの情報センターの役割を果たす獣医師。一般の獣医師よりツボカビに関する多くの知識を持ち、最新あるいは詳細な情報をいつでも入手できる立場にある。活動は全てボランティアで実施されている。社団法人日本獣医師会のHPで公開されている（下記URL）。

<https://www.nichiju.or.jp/ippan/info/19.5.30.pdf>

質の効果が確認されている。

・海外で消毒薬として販売されている薬剤 (TriGene・F10・Betadine) が、調査用具や実験室内の器具および家庭の飼育用具の除菌に有効であることが報告されている。

2. 国内に生息する両生類のカエルツボカビへの感受性に関する情報収集

(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、19年度は在来のカエル類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。その結果、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。

今年度は、分離培養によってツボカビの菌株が得られたため、在来種25種262個体に対して、カエルツボカビの遊走子濃度を一定にした飼育水の中での感染実験を実施した。

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2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)

(2) 実験個体の飼育条件および感染実験

感染実験に用いたカエルは野外で採集されたものであった。カエルは感染群と対照群の2群に分けて実験に供した。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。飼育水は、カエルツボカビCタイプの遊走子濃度を 10^4 個/individualに設定した。感染群は、温度を23°Cで24時間の浸漬後、通常飼育した。また、予備的実験により感染、発症が確認されたヌマガエルについては、遊走子濃度を 10^0 ~ 10^6 に調整した飼育水に24時間浸漬後、通常飼育した。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。

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

実験終了時点で、感染群および対照群ともに死亡個体が確認されたことから、本実験では目的とする成果は得られなかった。なお、今回の実験で使用したカエルツボカビCタイプの遊走子は、分離培養した株を実験室内でさらに培養を繰り返して確保したものである。しかし、長期間にわたる人工培地上での培養によって、ツボカビ菌の形態変化が認められていることから、感染性への影響についても懸念される。

感染が確認された種差や個体差はあるものの、昨年度の結果を合わせてヌマガエル、ヒメアマガエル、ハナサキガエル類について感染が認められたことから、南日本に生息するカエルが感染しやすい可能性が示唆された。

第4章：カエルツボカビに関する情報の取りまとめ

ここでは、病理学、遺伝学等の観点からカエルツボカビを研究している専門家に対してヒアリングを実施して、カエルツボカビの生態や日本産の両生類への影響に係る最新の知見を取りまとめた。

1. 宇根有美（麻布大学獣医学部准教授）・松井久実（麻布大学獣医学部講師）

・ 於：麻布大学獣医学部会議室

(1) カエルツボカビの生物学的特性について

○培養、感染実験等で得られた本種の生物学的特性に係る知見（宇根）

- ・ 培養株として、既にAタイプとCタイプが確立されている。Aタイプはパナマ由来のカエルから、Cタイプは発症し死亡した飼育個体のカエルから、それぞれ菌株を採取した。
- ・ (独)製品評価技術基盤機構の稲葉重樹氏がそれぞれ分離・培養方法を確立させ、麻布大学では両方の菌株を確保した。ひとたび分離されてしまえば培養・継代維持は容易であった。
- ・ しかしながら、長期間にわたり人工培地で培養したところ、形態変化が生じた。すなわち、遊走子囊の中に、さらに遊走子囊ができる状態で、振盪培養でも、短期間に同様の変化が生じた。
- ・ 長期培養で形態変化が生じたこと、他の病原体では、人工培地での長期培養により、生体への感染性が低下することも知られているので、麻布大学では長期培養は行っていない。現在は菌が必要な際に培養を開始し、実験に用いるという方向に変更している。
- ・ 培養株が確立できたことは、重要なことであるが、人工培地での株の維持については、さらに、検討する必要がある。
- ・ 飼育下における、カエルツボカビの感染性、発症、転帰は、カエルの飼育条件によってかなり異なる。感染個体の水換えを頻繁に行うと、発症が抑えられたり、症状が改善、見かけ上治ってしまう場合もあった。逆に、水換えの頻度が少なすぎても（飼育水の汚濁が高度になると）検出できなくなることがあった。この原因として、飼育水内の他のフローラの影響が考えられた。
- ・ 感染実験を行ってもなかなか発症しなかった。感受性の高いツノガエルにAタイプを暴露させても発症しない例があった。
- ・ A、Cタイプ以外のハプロタイプのリスク評価には、感染実験や消毒方法の検討など、生物学的特性の把握、評価が必要で、そのために、早急に培養株の確立が必要である。

○ハプロタイプによる特性の違い、特に感染力と病原性について（宇根）

- ・ AタイプとCタイプは、遺伝子の塩基配列が（判読された領域において）10bpほどしか異ならない。また、製品評価技術基盤機構の稲葉氏によれば、形態の差はほとんどないとのコメントであった。

- ・ AタイプとCタイプ以外のハプロタイプの病原性は明らかでない。オオサンショウウオは、Kタイプなどを有しているが、発症例の報告はなく、過去に大量死などの報告も確認できなかった。
- ・ 両ハプロタイプを用いた厳密な感染実験は行っていないが、自然発症例および予備的実験の結果では、両者の生物学的特性（病原性を含む）は、酷似していた。

(2) カエルツボカビの消毒方法について

○最新の知見を勘案した上での消毒方法（宇根）

- ・ 現状として、培養株は確立できたものの消毒効果に関する病理学的な研究は進んでいないため、消毒に関する新しい知見は得られていない。
- ・ 銅イオンの効果について実験したが、今回の実験系では、カエルツボカビはきわめて銅イオンに強く、不活化するには、5 ppm以上の濃度が必要であるため、消毒あるいは除菌には使えないことが分かった。この濃度はミズカビの不活化よりも高い濃度であり（ミズカビはppb(=10億分率)の単位でも効果がある）、カエルにも毒性を示す濃度であった。一方で、この銅イオンへの耐性を生かせば、分離培地の開発には、有用かもしれない。
- ・ ヒトの真菌症の治療薬であるイトラコナゾールを用いて、オオサンショウウオのカエルツボカビ除菌効果を検討した。1日1回15分の薬浴を5回繰り返して陰転した。同様の効果はフルコナゾールでも認められた。除菌は簡単で実用性は高いと考えた。ただし、罹患した両生類の治療については専門知識を要するため、両生類の知識を有する獣医師（コア獣医師）に相談し、治療を行うことが望ましい。

○カエルツボカビ症の日本産両生類に対するリスク評価・リスク管理の考え方（宇根）

- ・ AとC以外のハプロタイプの株が分離培養されないと、日本産両生類全体に対するリスク評価は難しい。

○主体ごとの留意点

①動物園飼育施設

- ・ 傷病動物を受け入れる際には、カエルツボカビについても検疫を徹底し、もし感染個体が発見されたら除菌してから受け入れるべきである。
- ・ ただし、現在は、商業ベースでカエルツボカビの検査を受ける検査機関がない。このため、国立環境研究所に検査依頼をしている現状である。このまま、国立環境研究所に、検査依頼をし続けるのは現実的でなく、展示施設の検疫体制をバックアップするためにも、検査体制の整備が必要である。これは病理検査体制も同様である。
- ・ 消毒には次亜塩素酸ナトリウムなどが有効で、公表されているマニュアル通り（200ppmで15分以上の消毒）で効果がある。

②両生類の野外調査を行う人

- ・ 野外調査、観察をある程度の頻度で行う研究者や一般の愛好家に関しては、複数の生息地を行き来することがほとんどである。この場合、病原体を人為的に移動させる可能性が高くなるので、調査地間の移動に際しては十分な消毒、除菌が必須である。

- ・ 野外におけるカエルツボカビとラナウイルス対策として、長靴を始めとする調査道具の消毒を励行する。次亜塩素酸ナトリウムなどが推奨される。長靴はビルコンS（0.1%溶液で5分以上の消毒）などがよい。熱湯（60℃以上の温水に15分以上浸漬）も効果がある。

③両生類を扱うペットショップ

- ・ ペットショップで扱われる海外産カエルは、ツノガエルをはじめカエルツボカビに対する感受性が高いものが多い。また、複数種を同一場所で飼育するため感染機会が多くなる。多頭飼育のため、ときに、飼育環境が不良になる場合もある。カエルへのストレスが高くなると、発症の危険性は高まる。
- ・ 平成19年に多くのツボカビ症事例が確認されたが、その後、確認事例が激減した。その理由として、カエルツボカビの存在を知った業者が輸入や販売を手控えたことが考えられる。さらに、特に検査をせず、症状のみでカエルツボカビと判断し処分するなどの理由が考えられた。
- ・ リスク評価できるほどのデータはないが、ペットショップから一般家庭へカエルツボカビ菌が拡散し、蔓延する可能性は非常に高いことから、不健康なカエルを販売しないことが重要である。

④両生類を飼育している一般市民

- ・ 健康な両生類を購入する。信用のおけるペットショップで購入する。可能であれば除菌されている個体を購入する。
- ・ 異常があれば検査をする。飼育下では除菌も治療も可能なので、最寄りの獣医師に相談する。

⑤アフリカツメガエル飼育施設

- ・ 飼育されているツメガエルからはCタイプのカエルツボカビが検出された。飼育水の消毒・除菌も、ツメガエルそのものの除菌も可能であると考えられる。ツメガエルの爪にはカエルツボカビが多く検出されるが、皮膚深層には入らないと考えられることから、除菌できるであろう。
- ・ なお、野外に定着したアフリカツメガエルはきちんと調査すべきである。その際に、スワブサンプルではなく、検出率の高い爪の組織を使うべきである。また、周囲の在来両生類も調べるべきである。

⑥西表島の船着き場（松井）

- ・ 現在、環境省により消毒マットを置いて侵入防止対策が取られているが、島内外のツボカビ分布状況を調査することも重要である。

（3）カエルツボカビの感染実験（松井）

○平成20年以降の実験の実施状況

- ・ 平成20年の実験経過を報告する。培養されたCタイプのカエルツボカビを使った。暴露遊走子数を 10^4 （個/1実験個体）に調整した水にフルコナゾールなどで除菌したカエルを24時間浸漬後、90日間通常飼育を行い、定期的にスワブを採取して感染、発症を確認する手法で行った。
- ・ 暴露後、カエルツボカビが大量に増殖して死亡した個体は確認されなかった。陽性対

照のツノガエルも実験終了時まで生存した。シナリオ通りに発症が確認されるわけではなく、対照群のカエルも多く死んでしまった。感染、死亡についての種差、個体差が大きい。なお対照群カエルについては、実験前にフルコナゾールによる消毒は行っていない。

- 平成19年度の実験によって発症、死亡が確認されたヌマガエルについては、暴露遊走子数を変えた実験を行った。遊走子数条件 $10^0 \sim 10^5$ （個/1実験個体）の6条件を検討したが、発症例に差は見られなかった。また、生存時の経時的スワブのPCRチェックでカエルツボカビに特異的なDNA領域のバンドが明らかに確認できた個体で、死亡時のスワブPCRではカエルツボカビの数が減少していた事例があった。このような事例はヌマガエル、ヒメアマガエル、タゴガエルで確認されている。この死亡個体の病性鑑定の結果では、ツボカビは検出されなかった。解析サンプルが大量にあるため、詳細は現在まだ解析中である。
- （宇根）実験で扱っている在来のカエルは野生の個体であり、飼育も難しい面がある。
- （松井）平成21年には、Aタイプのカエルツボカビで発症したツノガエルの飼育水を未発症のカエルにかける感染実験を実施したところ、2週間で発症が確認された。この飼育水をヌマガエルに暴露したところ、同様の経過日数で死亡し、死亡個体のPCRチェック、病性鑑定ともにカエルツボカビを確認した。これはツボカビの活性が高くなったことによる可能性があり、カエルツボカビ菌の病原性活性が変化するのかもしれない。
- 酵母菌は、ごく少量だとなかなか増殖しないが、ある一定量があると猛烈に増加することが観察される。これと同様に、カエルツボカビ菌も互いに成長を刺激する「成長刺激物質」のようなものがあるのかもしれない。

○日本産両生類が感染、発症する条件

- カエルツボカビ菌のRNA分解酵素の至適pHが、哺乳類同様中性であることを確認した。普通のカビ類ではこれが酸性であるが、カエルツボカビについては異なることが判明した。これは初の知見となる。

○カエルツボカビに感染しやすい種、感染に留意すべき地域

- 感染実験の結果ははっきりしないが、ヌマガエル、ヒメアマガエル、ハナサキガエル類は感染例が得られたことから、南方系のカエルが感染しやすい可能性がある。一方、本州産のカエルはPCRチェックでの陽性個体が少ないため、感染しにくいのではないかと。ただし、タゴガエルは感染事例がある。

（4）その他の両生類の感染症

○ラナウイルスについて（宇根）

- 西日本の1つの池で、ウシガエルの幼体の大量死が生じ、病理学的、微生物学のおよび分子生物学的にラナウイルス感染症(RCV-JP)と診断された。これは、国内初のラナウイルス感染症の発見である。
- 消毒法として、現在のところ一般的ウイルスに対する消毒法が有効であろう。両生類

のラナウイルス感染症の予防法や治療法は確立されていない。ラナウイルスの外界での生存期間はカエルツボカビより長い。冷凍にも不活化されない。

(5) その他

○今後実施すべきこと

- ・ IUCNのグローバルアセスメント報告書に、両生類の個体数減少の原因として4番目に感染症が挙げられており、4000種にインパクトを与え、絶滅の危機に瀕しているのは60%以上であるとコメントされている（1番目は生息地の破壊、2番目は汚染・天災、3番目は火災）。非常に憂慮すべき問題である。（宇根）
- ・ 感染実験の解析に使用する試薬は非常に高価で、研究費の補助が必要である。（松井）
- ・ 日本におけるWDCC（Wildlife Disease Control Center）体制整備の必要性について言及する。野生動物の異変に対して、官庁の隔てなく対応できる体制を整えることが、日本の生物多様性保全につながるだろう。

2. 五箇公一（国立環境研究所侵入生物研究チームリーダー）

- ・ 於：国立環境研究所

(1) これまでのスワブサンプルの解析・とりまとめの進捗と今後の見込み

○野外と飼育下、国内外のサンプルの解析状況

- ・ 野外調査昨年度までの分と、国立環境研究所が独自に集めたものも含め、約5,300検体の解析が終了した。環境省が取りまとめたものについては全て終了した。
- ・ 飼育下サンプルの集計は終わっていないが、飼育販売個体は投稿論文で出している分程度である。
- ・ 展示品に関しては単発で日本動物園水族館協会からサンプルを入手している。感染はイエアメガエルー検体、ウーパールーパー（アホロートル）一検体のみで後は全部オオサンショウウオという状況。施設内ではほとんどでは発生していない。
- ・ Cタイプは麻布大経由のサンプルからしか出ない（現在、四国・九州のヌマガエル、奄美のシリケンイモリで確認済み）。
- ・ 国立環境研究所や麻布大学の研究によれば、現在、カエルツボカビには26のハプロタイプがあることが報告されている。

○論文投稿後の状況について

- ・ 再投稿の要求に従い修正投稿中である。野外サンプルは2,200検体くらい。ITSのハプロタイプが本当にカエルツボカビの系統間の差なのかを示すデータの要求があったため、クローニングデータと同時にダイレクトシーケンスの波形データを提供した。
- ・ 波形データを見る限りヘテロで存在する訳でもなく、我々が見つけているハプロタイプは明らかに遺伝的な違いとしてカエルツボカビの系統（ストレイン）の違いを指し示しているということは間違いないだろう。
- ・ 既報によれば、多遺伝子座における分析（マルチローカスアナリシス）からは2倍体であることが示唆された。なおかつ変異があるということは、カエルツボカビが有性生

殖をしている可能性が高い。有性生殖しているからリボソームRNA-DNAも協調進化していることが示唆される。

- ・ 今回の系統樹は、分類学的に近いツボカビ群のDNAを外群に書き換えている。カエルツボカビは単系統となり、オオサンショウウオから見つかるものは100%他のタイプと分かれた。かつAタイプ、Zタイプ、Vタイプなどウシガエルから見つかるツボカビ群がまとまる。

○今後の研究の方向性とPCRについて

- ・ 季節によって感染率が違う傾向がある。南西諸島などは真夏のサンプルが多いため、やや過小評価になっている可能性は否定できない。
- ・ 奄美と沖縄のシリケンイモリの感染率に差がある点が気になる。沖縄のシリケンイモリの感染率が特異的に高い状態であり、それが人為的なものなのか、もともと過去からのものなのかの見極めが必要である。
- ・ 「旧Dタイプ」は恐らくカエルツボカビではないのは間違いない。何故なら18Sも28Sも増えない。謝罪と訂正の情報発信は必要だと考える。発信が遅い点については事実。5.8Sがほぼ100%一致していたから、当時はカエルツボカビだと思い込んでいた。何かのDNAが存在していることは確かで、「旧Dタイプ」については、相同性（ホモロジー）検索をかけてみて、他のツボカビ門と照らし合わせてみると何か情報があるかもしれない。

(2) カエルツボカビの生物学的特性

○ウシガエルを中心に日本産両生類が多様なハプロタイプを持つことの意味、日本と他国との比較

- ・ ウシガエルのツボカビ類がアジア在来種というのを証明するためには、もっと在来種から見つけないといけない。ウシガエルは元々無菌状態だったものが、アジアに生息する様々なカエルツボカビに感染したのではないかと。恐らく、かつてウシガエルに大流行が起き、その中で生き残って淘汰を受けたものが現存していて、それが養殖品として出回っているというシナリオを考えている。
- ・ 本州の広域分布種についてはアマガエル、ヌマガエル、ツチガエルから見つかるが、感染率はごくわずかである。生息域が限られれば限られるほど、垂直感染が起こりやすいと同時に感染個体が脱落する率とのバランスは完全に感染率の方が上回る。ほぼ全集団内に寄生虫が蔓延するという事になる。広域だとそうはならず感染率が自動的に低くなる。アマガエルらの広域種を考えれば、やはり感染率は低く抑えられざるを得ない。
- ・ 潜在的にたくさんのカエルツボカビが存在するが、目に見える形で検出感度以上にカエルツボカビが検出される確率は非常に低い。そういった中で、ウシガエルがその環境に飛びこむと多く感染してそのまま分散する。
- ・ ウシガエルとアフリカツメガエルは野外個体も感染率が20%~30%と高く、2次的に感染したのであろう。ただしこれは推定であり、これから検証する為には、他の国のウシガエルがどうなっているのか、原産地のウシガエルがどうなっているのかなどを

調べていかないといけない。

- ・ 北米にも様々なタイプがあるという可能性は調べてみないと分からない。北米のウツガエル自体の流通の動きは激しく、台湾などからアメリカに大量に出荷されている。そう考えると北米ではすでに、アジア型が蔓延しているかもしれない。
- ・ 状況証拠として、シリケンイモリをとってもオオサンショウウオをとっても、感染率が高いが発病することは一切ない。これまでも日本国内で、ほぼカエルツボカビによる死亡個体は見つかっていない。

○ハプロタイプによる生物学的特性の違い

- ・ 世界で猛威を振っているのは、さまざまなカエルツボカビのごく一部と考えられる。パナマで見つかったのはAタイプとLタイプとEタイプ。オーストラリアで見つかったのはAタイプのみ。このあたりが病原性なのだろう。

(3) カエルツボカビの感染実験

- ・ 未公表であるが、在来種(野外感染/非感染)とペット用ツノガエルを同一容器で飼育し、個体の接触はないが飼育水が混ざるようにして感染実験を試行している。皮膚の顕微鏡写真及びPCRでカエルツボカビ感染を確認している。
- ・ 実験区は2週間後にすべて陽性になった。対照区は陰性のままであった。陽性個体を見ると、ツノガエルだけが頻繁に脱皮するようになる。感染についての結果はクリアだが、今のところツノガエルも死亡しない。
- ・ 在来種に対する感染実験も準備中である。

(4) カエルツボカビの検疫と消毒方法

○検疫方法、消毒方法

- ・ 万が一、海外の病原性が確認されているカエルツボカビが日本のものと違っていたら、将来的なリスクはあるものの、今まで言われていたように、水を下水道に捨てるなどといった配慮はもういらないだろう。
- ・ 防除に関して言うならば、安心宣言は出すわけではないが、かつてのようにヒステリーになる必要はない。ただカエルツボカビに関しては、起源は複数あるかもしれない。これだけ変異がある以上、まだ多数の起源があるかもしれないと考えるべき。
- ・ 対策として、海外の両生類を安易に輸入して放逐することは厳に慎むべきである。これは外来種管理の原則論としてあるべき。同時に日本の両生類についても、幾つかが保菌動物として生息している以上、これらを海外に輸出するという点に関しては、再検討が必要である。

○カエルツボカビ症の日本産両生類への感染に係るリスク評価・リスク管理の考え方

- ・ それ以前に、カエルがどれだけ減少しているかという話がある。日本ではカエルツボカビによって両生類が激減する事態はどこでも知られていないし、もう少し冷静になるべき。
- ・ シリケンイモリは一部輸出され、これだけ感染していてしかも感染力を持っていると

なると、むしろ感染源となりうる。両生類の輸送は国内輸送という部分も含めて厳重に注意が必要。

- ・ さらに包括的にいうと、こういう問題はカエルツボカビに限らず、他の病原体でも起こりうる。ラナウイルスも含めて色々出てくるだろうし、両生類の輸送は可能な限り速度を緩める努力が必要である。
- ・ 野外での保全単位については、田んぼ1枚ごとというのは現実的ではない。国立公園などと限定してリスク管理するのがよい。

(5) その他

○今後実施すべきこと

- ・ シリケンイモリが海外に輸出されているというデータが、ある程度実証できるものがあれば欲しい。
- ・ 今後は、海外の動向を収集して、現実的に海外で問題になっているのかどうかと、分布域がどうかの調査、世界のカエルツボカビの採集と変異の調査、シリケンイモリ、ウシガエルの取引を追跡、カエルツボカビ感染ルートの追跡を行う。
- ・ 学術的な観点としては、日本や世界でのカエルツボカビの感染状況がだんだん見えてきたので、感染しやすい種と感染しやすい環境が分かってくるならハザードマップが作れるのではないか。また、系統毎のハザードマップも作れるのではないか。
- ・ 引き続きPCR検査は受け付けて実施する。

3. 黒木俊郎（神奈川県衛生研究所・微生物部・専門研究員）

- ・ 於：神奈川県環境衛生研究所会議室

(1) カエルツボカビの生物学的特性

○文献等に基づく本種の生物学的特性に係る知見

- ・ 環境細菌（バクテリア）の一種で、ツボカビ菌を抑制する働きがあるものが論文発表された。
- ・ クロラムフェニコールという抗生物質が効果をもつことが知られており、オーストラリアでは治療薬として使用されている。

○病原体としての特性に係る最新の知見

- ・ 国内において様々なハプロタイプの存在が確認され、非常にインパクトの大きい研究成果が得られている。しかし、まだわからないことも多く、それぞれのハプロタイプについて個別に対策を考えなければならない。
- ・ オオサンショウウオについては、固有タイプのツボカビを持ち、A・Cタイプのような強毒性のものは感染しないかもしれず、リスクを考える上で緊急的な避難は必要ないだろう。

(2) カエルツボカビの検疫と消毒方法

○検疫方法、消毒方法

- ・ ツボカビだけに特化せず、様々な病原体を全体的に考えることが必要である。

○感染実験について

- ・ どのカエルが死んでどのカエルが死なないかがわからないと、リスク評価ができない。各タイプが分離できたわけではなく、カエルの種数も多いので、全ての組み合わせを実験で確かめるのは困難。まずはA・Cタイプに的を絞る必要がある。
- ・ 日本には様々なタイプがある、ということがわかってくると、さらに日本のカエルは大丈夫だ、という意見が強くなるおそれがある。しかしそう言い切れるわけではない。
- ・ 第一段階として両生類の様々な種を対象に実験を行うのは良いが、今後は優先順位を決めて、確認したい事項をもう一度整理する必要がある。感染実験の結果がなければ、その後の理論形成ができない。

○感染のリスク

- ・ 気候的には、四季がある方が感染率が高い。オーストラリアでは気温の低い時期に死亡率が高まっているようだ。ただ、オーストラリアの気候は日本ほど温和でないので、国内はどこでも同じように危険性があるのではないか。
- ・ 水辺の方が感染しやすいが、各地でいろんなタイプのカエルに感染しているので、種によってどうかの判断は難しい。
- ・ どこに広がっているかを把握し、今検出されていない地域に入れさせないようにするための分布調査が重要である。全国規模の調査が難しいのであれば、集団発生や大量死が起こっていないかどうかの監視システムが必要である。
- ・ 検出確率の高いシリケンイモリと同所的に生息する在来のカエルからは検出されないのかどうかについても確認したい。
- ・ 沖縄でシリケンイモリの古い標本にツボカビ菌がないかどうか、確認した方が良い。

○リスク管理について

- ・ 感染していても発症しない種の移動を制限する必要性が高いが、その場合、シリケンイモリの扱いが特に問題になる。

○主体ごとの留意点

- ・ 一般的に使われている消毒薬は効果があるので、従来の対応で十分である。
- ・ 各主体の留意点は次の通りである。

①動物園等飼育施設

- ・ 動物を入れる前段階で検疫・PCR検査を実施した方がよい。治療については、投薬によりツボカビを殺すことができるが、耐性菌の発生を防ぐために薬漬けにするのは控え、治療目的にのみ抗真菌薬を使用する方がよい。

②両生類の野外調査を行う人

- ・ オーストラリアのマニュアルでは、魚類の研究者にも注意喚起している。どれぐらいの範囲を移動するかを想定するのは難しいが、原則的なところを示して、やれる範囲でやってもらうことになるだろう。

③両生類を扱うペットショップ

- ・ 検疫と消毒はペットショップの判断にまかせるしかないが、商品の品質管理の観点から普及啓発ができるのではないか。
- ・ 市販の薬剤の使用は獣医に相談してほしい。

④両生類を飼育している一般市民

- ・ 普及啓発が最重要。

⑤アフリカツメガエル飼育施設

- ・ 実験動物として流通させるのであれば、SPF（Specific Pathogen Free）化（特定の病原微生物を排除した動物）は必要であろう。マウス等、他の実験動物でもそのプロセスを経てきている。義務付けは難しくとも、努力目標は必要である。

⑥西表島の船着場

- ・ 限定された場所では最大限の努力は必要。どこにどれだけ希少なカエルがいるかがわかって対策が立てられるので、リスク評価が大事。

（3）その他の両生類の感染症

○ラナウイルスについて

- ・ ラナウイルスの対策の考え方は基本的にはカエルツボカビと同じであるが、治療法がまだよくわかっていない。魚や水の移動が危ないということも考えられ、コイヘルペスと同じような状況になる可能性もある。サンショウウオが本当にいなくなっているのかも含めて、まずは実態を把握した上で対策を考える。
- ・ ラナウイルスの影響が対外的にとりあげられているのは悪いことばかりではない。注目されることで感染拡大を防ぐ効果が期待される。
- ・ 他の感染症も含めて、中国や韓国の状況を把握することが必要だろう。

（4）その他

- ・ 今後は両生類の輸入を制限するべき。
- ・ 輸出国に対して証明証の発行を要請するという手もあるが、特定の国が証明証を発行し、全ての国がそこを通過して輸出しようとするのが懸念される。
- ・ 国内流通の制限についても検討した方がよいのではないか。

第5章：その他の両生類の感染性疾患に関する情報の

取りまとめ

ラナウイルス感染症を中心に、両生類への影響が懸念される感染性疾患について、国内外の学術論文等の文献を収集し、取りまとめを行った。なお、要旨翻訳を掲載した文献については文献1などの表記をし、それ以外の収集文献については通常の著者名と発行年の表記とした。

1. 両生類の感染性疾患について

両生類の生息数の減少や奇形が目立って始まった1970年代以降、環境汚染の影響とともに両生類の疾患、特に感染性疾患が目立つようになって調査、研究が進み、1990年代後半以降にカエルツボカビ感染症やラナウイルス感染症などが明らかになってきた。

野生生物の死亡状況のモニタリングおよびその原因の調査を継続しているアメリカの地理調査局国立野生生物健康センター (USGS National Wildlife Health Center) は1996年から両生類についても調査を実施するようになった。その2001年までの調査結果をまとめた報告 (文献2) では、両生類の感染症としてラナウイルス感染症、カエルツボカビ感染症、その他の真菌感染症、小型水生生物の寄生などが挙げられている。この報告では、ラナウイルス感染症とカエルツボカビ感染症は共に90%以上の死亡率を示し、集団死亡例の原因となるが、発生頻度はラナウイルス感染の方が多い。しかしラナウイルス感染は個体数が多く密度の高い種に発生して、種としての生息数の減少との関連性は認められなかったのに対し、カエルツボカビ感染症は希少種の生息数の減少との関連性が認められた。

その後の同センターのまとめでは、両生類の110件の集団死亡例 (5個体以上の死亡) の原因は、約43%がウイルス感染、16%は真菌感染、10%は原虫感染、6%は外傷、2-5%が中毒の疑い、と報告されており (Muths et al., 2006)、やはり、ウイルス感染は広域に分布し生息数の多い種で多く希少種の感染はまれであるが、カエルツボカビ感染は多くの希少種で認められるとしている。こうした結果から、ラナウイルス感染が希少種への脅威となる可能性は低いという考え方は定着してきているようである (Daszak et al., 2007)。

動物 (主に家畜) の移動に伴う感染症の拡大を監視、防止するための国際組織である国際獣疫事務局 (OIE) の国際水生動物衛生規約 (Aquatic Animal Health Code) には、2008年の改訂から両生類の感染症が掲載されるようになり、カエルツボカビ感染とラナウイルス感染 (文献1) が対象となっている。

2. ラナウイルス感染症について

(1) ラナウイルスの発生状況と種類

ラナウイルスはイリドウイルス科ラナウイルス属のウイルスの総称で複数の種類が報告されている。野生下の両生類でのラナウイルスによる集団死の発生は北米、オーストラリア、イギリスで報告されている (Daszak et al., 2007)。単発的な分離の報告は他の地域でもあり、また、飼育・養殖下のカエル類からも分離されている。中国でも養殖個体での

集団死の報告がある（文献5；He et al., 2002）。また、魚類や爬虫類においても野生下や飼育・養殖下の個体からラナウイルスが分離されている（文献11など）。

○北米

ラナウイルスの標準ウイルスであるフログウイルス3（FV3）は1965年に北米のレオパードフロッグ（*Rana pipens*）から分離され、その後オタマジャクシや胚を死亡させることが実験的に確認された。ほぼ同時期にやはり北米で、浮腫を呈したウシガエル（*Rana catesbeiana*）のオタマジャクシからオタマジャクシ浮腫病ウイルス（Tadpole Edema Virus: TEV）が分離され、原因ウイルスであることが確認された。TEVは現在ではFV3の型の一種と考えられている。

北米ではその後、ラナウイルスによる感染症の報告はなかったが、1995年に集団で出血性皮膚病変を発生したトラフサンショウウオ（*Ambystoma tigrinum*）からトラフサンショウウオウイルス（ATV）が分離された（Jancovich et al., 1997）。

ATV分離の後は各地でラナウイルスの感染が報告されるようになり（文献3など）、1回の発生で数千から数万個体の死亡が報告されている（文献2追加資料参照）。アメリカでは西部に主にサンショウウオに感染するATV、東部には複数種に感染するFV3の、少なくとも2種の両生類のラナウイルスが存在しているとされている（文献2）。これらのウイルスは変態前後の若い個体に時に100%に及ぶ高い死亡率で発生する。

複数種の両生類あるいは両生類と爬虫類、両生類と魚類の同所感染が観察されている（文献4、10、11）。また、商用ウシガエル繁殖施設での発生も報告されている（文献9）。

○オーストラリア

オーストラリアでは1992年に変態直後に死亡したornate burrowing frog（*Lymnodynastes ornatus*）からボールイリドウイルス（BIV）が分離された（Speare and Smith, 1992）。野生両生類からの報告はこの一例のみであるが、実験感染では多くの種に感染して死亡をもたらすことが報告されており、野生下での感染が広く存在している可能性も示唆されている（文献8など）。なお、魚類では流行性造血器壊死症（EHN）の原因となるラナウイルスが常在している。

○イギリス

イギリスでも1985年以降、ヨーロッパアカガエル（*Rana temporaria*）の集団死が報告され、FV3に類似したラナウイルスが分離されている（文献6、7など）。イギリスの発生では慢性的な皮膚潰瘍や全身性出血性疾患などの症状が成体で見られるなど、他の地域の発生とは異なった特徴がある。

（2）ラナウイルスの検出方法

ウイルスの検出方法の基本は培養によるウイルス分離であるが、近年はウイルス遺伝子検出法により、より迅速に、また条件の悪い試料からでも検出できるようになった。ラナウイルスについても、ホルマリン固定標本からウイルスDNAを検出できるようになり（文献20）、過去の試料も検査できるようになった。

遺伝子検出法が確立する前は、組織中のウイルス粒子を検出したり、感染経歴を示す血中の抗体検査が用いられていた。抗体検査は、ラナウイルスで広く交叉反応を示し、魚類で検査が確立しているEHNの抗原を用いることによって、比較的容易に検出が可能であった。オーストラリアではこの方法で外来種のオオヒキガエルがウイルスを持ち込んでいないか、調査した報告がある（Zupanovic et al., 1998など）。

現在は、ラナウイルス属の同定は、ウイルスの主要カプシド蛋白（MCP）の遺伝子のPCR検査法が主流であるが、種の同定には、さらに遺伝子配列の解読などが必要となる。試料採取方法による結果への影響に関する報告（Greer and Collins, 2007）がある。なお、OIEは現在、国際水生動物衛生マニュアルを改訂中であるが、この改訂版にはラナウイルスの国際標準検査法が記載される予定である。

（３）近年の研究の方向

近年は特に北米において感染動態の解明に関する報告が増えているようである。野外におけるウイルス保有種の検討（文献4など）や、感染経路に関する研究（文献14、16、17など）の他に、実験感染により種による感受性の差（文献12、13）や温度の影響に関する研究（文献15）などがある。例えばサンショウウオ由来のATVのカエル類への感染力について、文献12と文献13では相反する結果が出ているなど、まだ未解明の部分が多い。また、このウイルスをモデルとして、人間による環境変化の影響（St-Amour et al. 2008）など、広く両生類の感染症の動態・変化を理解しようとする考え方に基づく研究もある。

また、両生類や魚類の表皮抗菌ペプチドによる、各種病原体に対する感染防御作用に関する報告（文献18、19など）がある。

（４）主な文献要旨

収集した文献のうち、下表のものについて要旨を翻訳し、一部は本文の概要等も含めて以下に記した。

要旨翻訳等文献

番号	報告年	地域	ウイルス	生物種	内容
文献 1	2008	(世界)	Rana-virus	両生類	OIE水生動物衛生規約全訳
文献 2	2002	アメリカ	Rana-virus他	両生類	1996-2001年発生状況概要・追加資料添付
文献 3	2005	カナダ	FV3	カナダアカガエルレパードフロッグ	幼生または変態直後の個体の集団死亡例概要添付
文献 4	2008	カナダ	FV3	アカガエル科 アマガエル科 サンショウウオ イモリ	両生類複数種の同所的感染（サンショウウオが保有種である可能性）
文献 5	2001	中国	RGV (FV3の一種)	ブタノコエガエル	養殖下の集団死亡例からの分離

番号	報告年	地域	ウイルス	生物種	内容
文献 6	1996	イギリス	Rana-virus	ヨーロッパアカガエル	集団死亡例からのウイルス検出
文献 7	2008	イギリス	Rana-virus	ヨーロッパアカガエル	全身性出血性疾患と皮膚潰瘍症候群の二つの型とウイルスの感染する組織
文献 8	2002	オーストラリア	BIV	カエル類	自然感染例と実験感染
文献 9	2006	アメリカ	RCV-Z	ウシガエル	変態直前の養殖個体での集団死亡例、FV3よりも強い病原性
文献10	1999	アメリカ	FV3	アカアシガエル イトヨ	両生類と魚類の同所的感染
文献11	2008	アメリカ	FV3	爬虫類 (カメ類)	野生・飼育下個体の感染例 集団死亡例 両生類との同所感染例
文献12	2001	(実験)	ATV	ウシガエル レパードフロッグ トラフサンショウ ウオ ブチイモリ 魚類 サンフィッシュ カダヤシ ニジマス	感受性試験
文献13	2008	(実験)	FV3 ATV	カナダアカガエル レパードフロッグ パシフィックアマ ガエル トラフサンショウ ウオ	同所的感染 複数種感染
文献14	2006	(実験)	FV3	カナダアカガエル	池内と池間の感染方法の検討 死体食と汚染底質の移動
文献15	2005	(実験)	ATV	トラフサンショウ ウオ	死亡率に対する温度の影響
文献16	2007	(実験)	ATV	トラフサンショウ ウオ	感染動態 (直接感染、間接感染)
文献17	2008	アメリカ	ATV	トラフサンショウ ウオ	生息地分断 (個体数密度の変化) が疾病伝播に与える影響の検討
文献18	2004	(実験)	FV3 CCV (魚類のラナウイルス)	レパードフロッグ ウシガエル 魚類 シマスズキ雑種	表皮抗菌ペプチドの防御機能検討
文献19	2008	(実験)	ATV	トラフサンショウ ウオ	表皮抗菌ペプチドの防御機能検討
文献20	2000	(実験)	Rana-virus	爬虫類 (ミドリニシキヘビ) 魚類 (パーチ)	ホルマリン固定標本からのウイルスDNA検出

出典（番号は文献番号と対応する）

- 1) World Organisation for Animal Health (OIE), 2008. Chapter 2.4.2. Infection with Ranavirus. OIE Aquatic Animal Health Code.
- 2) Green D. E., Converse K. A., Schrader A. K., 2002. Epizootiology of sixty-four amphibian morbidity and mortality events in the USA, 1996-2001. *Annals New York Academy of Sciences*, 969: 323-339.
- 3) Greer A. L., Berrill M., Wilson P. J., 2005. Five amphibian mortality events associated with Ranavirus infection in south central Ontario, Canada. *Diseases of aquatic organisms*, 67: 9-14.
- 4) Duffus A. L. J., Pauli B. D., Wozney K., Brunetti C. R., Berrill M., 2008. Frog virus 3-like infections in aquatic amphibian communities. *Journal of Wildlife Diseases*, 44: 109-120.
- 5) Zhang Q. Y., Xiao F., Li Z. Q., Gui J. F., Mao J., Chinchar V. G., 2001. Characterization of an iridovirus from the cultured pig frog *Rana grylio* with lethal syndrome. *Diseases of aquatic organisms*, 48: 27-36.
- 6) Cunningham A. A., Langton T. E. S., Bennet P. M., Lewin J. F., Drury S. E. N., Gough R. E., Macgregor S. K., 1996. Pathological and microbiological findings from incidents of unusual mortality of the common frog (*Rana temporaria*). *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, B.*, 351: 1539-1557.
- 7) Cunningham A. A., Tams C. A., Russell P. H., 2008. Immunohistochemical demonstration of ranavirus antigen in the tissues of infected frogs (*Rana temporaria*) with systemic haemorrhagic or cutaneous ulcerative disease. *Journal of Comparative Pathology*, 38: 3-11.
- 8) Cullen B. R., Owens L., 2002. Experimental challenge and clinical cases of Bohle iridovirus (BIV) in native Australian anurans. *Diseases of aquatic organisms*, 49: 83-92.
- 9) Majji S., LaPatra S., Long S. M., Sample R., Bryan L., Sinning A., Chinchar V. G., 2006. *Rana catesbeiana* virus Z (RCV-Z): a novel pathogenic ranavirus. *Diseases of aquatic organisms*, 73: 1-11.
- 10) Mao J., Green D. E., Fellers G., Chinchar V. G., 1999. Molecular characterization of iridoviruses isolated from sympatric amphibians and fish. *Virus Research*, 63: 45-52.
- 11) Johnson A. J., Pessier A. P., Wellehan J. F. X., Childress A., Norton T. M., Stedman N. L., Bloom D. C., Belzer W., Titus V. R., Wagner R., Brooks J. W., Spratt J., Jacobson E. R., 2008. Ranavirus infection of free-ranging and captive box turtles and tortoises in the United States. *Journal of Wildlife Diseases*, 44: 851-863.
- 12) Jancovich J. K., Davidson E. W., Seiler A., Jacobs B. L., Collins J. P., 2001. Transmission of the *Ambystoma tigrinum* virus to alternative hosts. *Diseases of aquatic organisms*, 46: 159-163.
- 13) Schock D. M., Bollinger T. K., Chinchar V. G., Jancovich J. K., Collins J. P., 2008. Experimental evidence that amphibian ranaviruses are multi-host pathogens. *Copeia*, No.1: 133-143.
- 14) Harp E. M., Petranka J. W., 2006. Ranavirus in wood frogs (*Rana sylvatica*): Potential sources of transmission within and between ponds. *Journal of Wildlife Diseases*, 42: 307-318.
- 15) Rojas S., Richards K., Jncovich J. K., Davidson E. W., 2005. Influence of temperature on ranavirus infection in larval salamanders *Ambystoma tigrinum*. *Diseases of aquatic organisms*, 63: 95-100.

- 16) Brunner J. L., Schock D. M., Collins J. P., 2007. Transmission dynamics of the amphibian ranavirus *Ambystoma tigrinum* virus. *Diseases of aquatic organisms*, 77: 87-95.
- 17) Greer A. L., Collins J. P., 2008. Habitat fragmentation as a result of biotic and abiotic factors controls pathogen transmission throughout a host population. *Journal of Animal Ecology*, 77: 364-369.
- 18) Chinchar V. G., Bryan L., Silphadaung U., Noga E., Wade D., Rollins-Smith L., 2004. Inactivation of viruses infecting ectothermic animals by amphibian and piscine antimicrobial peptides. *Virology*, 323: 268-275.
- 19) Sheafor B., Davidson E. W., Parr L., Rollins-Smith L., 2008. Antimicrobial peptide defenses in the salamander, *Ambystoma tigrinum*, against emerging amphibian pathogens. *Journal of Wildlife Diseases*, 44: 226-236.
- 20) Kattenbelt J. A., Hyatt A.D., Gould A.R., 2000. Recovery of ranavirus dsDNA from formalin-fixed archival material. *Diseases of aquatic organisms*, 39: 151-154.

Aquatic Animal Health Code 2008
Chapter 2.4.2. Infection with Ranavirus
国際水生動物衛生規約2008
第2.4.2章 ラナウイルスによる感染

The World Organization for Animal Health (OIE)
国際獣疫事務局 (OIE)

(訳註：ゴシック体は本規約の第1章で定義されている言葉で、原文ではイタリック表記。定義は本項の最後に参考として添付した。)

第2.4.2.1条

この**国際水生動物衛生規約** (*Aquatic code*) においては、ラナウイルス感染とは、伝染性造血器壊死症ウイルスとヨーロッパナマズウイルスを除く、イリドウイルス科ラナウイルス (*Ranavirus*) 属に属する何れかのウイルスの**感染**を意味する。

本**感染**とカエルツボカビ *B. dendrobatidis* による**感染**の監視 (サーベイランス) 方法と診断方法については**水生動物マニュアル** (*Aquatic Manual* (改訂版を作成中)) に記載されている。

第2.4.2.2条

対象範囲

この章における勧告は：無尾目 (カエルおよびヒキガエル)、有尾目 (サンショウウオおよびイモリ) に属する全ての種に適用される。また、この勧告は国際取引においては (輸出入の際には) **水生動物マニュアル** で述べられている、その他のすべての**感受性種**¹ に適用される。

第2.4.2.3条

製品

1. 以下の**製品**を輸入あるいは通過を認める場合には、**当局は輸出国、ゾーン又はコンパートメント**のラナウイルスの存在如何にかかわらず、ラナウイルスに関連する条件を課してはならない。
 - a) 第2.4.2.2条によって記された種については、如何なる目的で使用される**製品**であっても：
 - i) **病原体**を非活性化処理した**製品**、例) 缶詰、両生類の革製品。
 - ii) **病原体**を非活性化するように保存された検査用の生物検体。
 - b) 第2.4.2.2条に示される種で生産された人によって食用に供される目的の**製品**で、直接小売り用に処理・パックされた以下の**製品**：

¹ 自然経路または実験的に感染が報告されている種

- i) 皮をはいだカエルの脚
- ii) 皮をはいだ両生類の肉あるいは死体

1b)で述べた**製品**については、人における消費以外の目的で**製品**が使用されることを防ぐような国内対策の導入の検討が必要かもしれない。

- 2. 第2.4.2.3条の1項に示す条件以外の状況において第2.4.2.2条で記載される種の**製品**の輸入、あるいは通過を認める場合、**当局は輸出国、ゾーン又はコンパートメント**のラナウイルスの状況に関する第2.4.2.7から2.4.2.12条までに示した条件を要請すべきである。
- 3. 第2.4.2.2条に示された種以外であるがラナウイルスを機械的に媒介する可能性があると合理的に考えられる生体の**製品**をラナウイルス清浄宣言をしていない**国、地域あるいは地区**からの輸入あるいは通過を考慮する場合には、**当局は本水生動物衛生規約**の勧告に従い**リスク解析**を実施しなければならない。この解析の結果は**輸出国**に通知されるべきである。

第2.4.2.4条

ラナウイルス清浄国

下記の1, 2, 3, あるいは4項のいずれかの条件を満たせば、各国はラナウイルス清浄宣言をすることができる。

もし、他の国あるいは国々と**ゾーン**がまたがる場合には、その**ゾーン**の中のすべての場所がラナウイルス清浄宣言をした場合にのみ、ラナウイルス清浄宣言ができる（第2.4.2.5条参照）。

- 1. 第2.4.2.2条に示す**感受性種**が国内に存在しない国は、少なくとも過去2年間以上継続して**基本的バイオセキュリティの要件**を満たしてきた場合はラナウイルス清浄宣言ができる。

あるいは、

- 2. 第2.4.2.2条に示す**感受性種**（罹患の可能性のある種）が国内に存在するが、**水生動物マニュアル**の第XXX章に示されるような臨床的症状を発現する状況であったにもかかわらず、過去10年以上、**本疾病**の発生が認められていない国は、**基本的バイオセキュリティの要件**を少なくとも過去2年間以上継続して満たしてきた場合には、ラナウイルス清浄宣言ができる。

あるいは、

3. 過去 10 年以内に発症が見られた場合、あるいはラナウイルスに対する監視体制実施以前の感染状況が不明（例：水生動物マニュアルの第 XXX 章に示すような臨床的症状を発現する状況がなかった場合）であった場合には、以下の条件を満たせば、ラナウイルス清浄宣言ができる。
 - a) 基本的バイオセキュリティの要件が最低過去 2 年間以上継続して満たされる。
 - b) 水生動物衛生規約の第 3.3.1 章と水生動物マニュアルの第 XXX 章に示されたラナウイルスに対する監視体制が過去 2 年間以上継続して実施されており、ラナウイルスが認められていないこと。

あるいは、

4. 過去にラナウイルス清浄宣言を行ったが、その後、本疾病の発生が認められた場合には、以下の条件がすべて満たされた場合に、再度、清浄宣言できる。
 - a) 本疾病の発生が認められ次第、罹患地域を感染地域に指定し、さらにバッファゾーンが設置される、
 - b) 本疾病の感染拡大のリスクを最小限に抑える方法によって、感染個体群を感染地域から淘汰あるいは排除し、適当な消毒（水生動物マニュアル参照）を実施する、
 - c) 水生動物衛生規約の第 3.3.1 章と水生動物マニュアルの第 XXX 章に示されているラナウイルスに対する監視体制が過去 2 年間以上実施されており、ラナウイルスが認められていない、
 - d) 必要に応じて既存の基本的バイオセキュリティの要件の見直しや改正が行われ、過去 2 年間以上継続して要件が実施されている。

それまでの間、非罹患地域の一部を、第 2.4.2.5 条、第 3 項の条件を満たした場合には清浄地域と宣言することができる。

第 2.4.2.5 条

ラナウイルス清浄のゾーン又はコンパートメント

ラナウイルス清浄宣言していない 1 つの国あるいは複数国の領土にまたがるゾーン又はコンパートメントについて、以下の第 1, 2, 3, あるいは 4 項の条件を満たした場合には、一国あるいは複数国の当局はそのゾーン又はコンパートメントは清浄であると宣言できる。

一つのゾーン又はコンパートメントが複数国にまたがる場合には、すべての国の当局によって条件が満たされていることが確認された場合のみ清浄と宣言できる。

1. 当該ゾーン又はコンパートメントに第 2.4.2.2 条に示された感受性種が存在しない場合は、基本的バイオセキュリティの要件を少なくとも過去 2 年間以上継続して満たせば、清浄と宣言できる。

あるいは、

2. 当該ゾーン又はコンパートメントに第 2.4.2.2 条に示す感受性種が存在し、水生動物マニュアルの第 XXX 章に示される臨床的症候を発現する状況があるにもかかわらず、過去少なくとも 10 年間以上、疾病の発生がみられなかった場合には、**基本的バイオセキュリティの要件**が少なくとも過去 10 年間以上継続していれば、ラナウイルス清浄と宣言しても良い。

あるいは、

3. 当該ゾーン又はコンパートメントにおいて、**疾病**の最後の発生が過去 10 年以内であった、あるいは**ラナウイルスに対する監視体制**実施以前の感染状況が不明（例：水生動物マニュアルの第 XXX 章に示された臨床症候を発現する状況がなかった場合）であった場合、以下の条件を満たした場合、ラナウイルス清浄であると宣言しても良い。
 - a) **基本的バイオセキュリティの要件**が過去 2 年間以上継続して満たされ、なおかつ
 - b) **水生動物衛生規約**の第 3.3.1 章と**水生動物マニュアル**の第 XXX 章に示された**ラナウイルスに対する監視体制**が過去 2 年間以上継続して実施されており、ラナウイルスが認められていないこと。

あるいは、

4. 過去にラナウイルス清浄を宣言したが、その後、**疾病**が認められたゾーンにおいては、以下の条件が満たされた場合、再度、ラナウイルス清浄であると宣言できる。
 - a) **疾病**の発生が認められ次第、**疾病**の影響がある地域を**感染地域**と指定し、**バッファゾーン**が設置される、
 - b) 感染個体群が感染拡大の**リスク**を最小限に抑えるような方法で感染地域から淘汰あるいは排除され、**適当な消毒措置**（水生動物マニュアル参照）が完了している、
 - c) **水生動物衛生規約**の第 3.3.1 章と**水生動物マニュアル**の第 XXX 章に示されている**ラナウイルスに対する監視体制**が過去 2 年間以上実施されており、ラナウイルスは認められていない、
 - d) 必要に応じて既存の**基本的バイオセキュリティの要件**の見直しや改正が行われ、少なくとも過去 2 年間以上継続して実施されている。

第 2.4.2.6 条

清浄状態の維持

第 2.4.2.4 条または 2.4.2.5 条（該当する方）の第 1 項あるいは第 2 項に基づいてラナウイルス清浄が宣言された国、ゾーン又はコンパートメントにおいては、**基本的バイオセキュリティの要件**が継続的に維持されていれば、清浄状態が継続していることとみなされる。

第2.4.2.4条または2.4.2.5条(該当する方)の第3項によりラナウイルス清浄と宣言した国、ゾーン又はコンパートメントにおいては、水生動物マニュアルの第XXX章に示すようなラナウイルスによる臨床症状が発現する状況で、**基本的バイオセキュリティの要件**が継続していれば、**ラナウイルスに対する監視体制**を解除し、ラナウイルス清浄の状態を維持しているとしても良い。

しかしながら、感染国内の清浄宣言されたゾーン又はコンパートメントにおいてや、ラナウイルス感染による臨床症状の発現が見られない状況の場合においては、**当局が感染の可能性に基づき定めた一定レベルまで、ラナウイルスに対する監視体制**を継続する必要がある。

第2.4.2.7条

ラナウイルス清浄が宣言された国、ゾーン又はコンパートメントからの水生動物の生体の輸入

第2.4.2.2条に示された水生動物の生体をラナウイルス清浄宣言された国、ゾーン又はコンパートメントから輸入する際には、輸入国の**当局は輸出国の当局あるいは輸入国によって承認された証明発行者発行の国際水生動物衛生証明書**が必要である。

この**証明書**は、第2.4.2.4あるいは2.4.2.5条(該当する方)に示される手続きに基づき、水生動物の産地が、ラナウイルス清浄宣言された国、ゾーン又はコンパートメントであるか否かを証明しなければならない。

証明書はAppendix 4.X.Xの書式見本に沿うこと。

この条項は第2.4.2.3条、第1項の**製品**には適用されない。

第2.4.2.8条

ラナウイルス清浄宣言をしていない国、ゾーン又はコンパートメントから養殖目的での水生動物の生体の輸入

1. 第2.4.2.2条に示された水生動物の生体を養殖目的でラナウイルス清浄宣言をしていない国、ゾーン又はコンパートメントから輸入する際には、**輸入国の当局はリスクを評価し、以下の感染のリスク緩和措置を、妥当と承認された場合には実施しなければならない。**
 - a) 周辺環境から継続的に隔離されるよう、生物学的に安全な施設に直接搬送し、そこで生涯にわたり飼育する。
 - b) すべての排出される汚水・汚物は確実にラナウイルスを非活性化する方法で処理する。

2. 新たな個体群確立のために個体を導入しようとする場合には、国際海洋探査委員会の海洋生物種の導入と移送に関する規約（the Code of Practice on the Introductions and Transfers of Marine Organisms of the International Council for the Exploration of the Seas (ICES)）に従うこと。
3. 水生動物衛生規約の目的に沿うと ICES Code（全文は <http://www.ices.dk/indexfla.asp>を参照）は以下のように要約される。
 - a) 関心の対象となる個体群（養殖あるいは野生個体群）をその現在地（採取地）において特定する。
 - b) 個体群の健康状態・病歴を評価する。
 - c) ラナウイルス、寄生虫、全身的健康状態に関してサンプルを採取し、検査する。
 - d) ファウンダ（創始）個体群（F-0）を輸入し、安全な施設で検疫する。
 - e) 第一世代（F-1）は検疫施設においてF-0から生産する。
 - f) F-1を養殖し、成長段階（ライフサイクル）の重要な時期（感染しやすい時期）にサンプルを採取し、ラナウイルス検査と寄生虫・健康状態の全身診断を実施する。
 - g) ラナウイルスが検出されず、寄生虫も存在せず、その個体群の健康状態が輸入国、ゾーン又はコンパートメントにおける**基本的バイオセキュリティの要件**を満たしていると考えられる場合には、そのF-1個体群はラナウイルス清浄あるいはラナウイルスに対して**特定病原体未感染（SPF）**であると定義される。
 - h) SPFのF-1個体群は、国、ゾーン又はコンパートメントにおける**養殖**または**個体数確保**の目的のために検疫施設から出すことができる。

この条項は第2.4.2.3条、第1項の**製品**には適用されない。

第2.4.2.9.条

ラナウイルス清浄宣言をしていない国、ゾーン又はコンパートメントから人の食用の目的での水生動物の生体の輸入

ラナウイルス清浄宣言をしていない国、ゾーン又はコンパートメントから食用の目的で第2.4.2.2条に示された水生動物の生体を輸入する際には、屠殺および第2.4.2.3条、第1項に示される**製品**の一つ、あるいは**当局**によって許可された他の**製品**の**加工過程**において、**検疫施設**に直接搬入し飼育すること、そしてすべての汚水・汚物はラナウイルスを確実に非活性化するように処理することを、**輸入国の当局**は要請しなければならない。

この条項は第2.4.2.3条、第1項の**製品**には適用されない。

第2.4.2.10条

ラナウイルス清浄宣言をしていない国、ゾーン又はコンパートメントから家畜飼料、農業、研究、動物園、ペット、工業あるいは医薬品用の目的での水生動物の生体の輸入

第2.4.2.2条、第1項に示される**水生動物**の生体を、ラナウイルス清浄宣言をしていない国、**ゾーン又はコンパートメント**から輸入する際には、**輸入国の当局はリスク**を評価し、以下のような**リスク緩和措置**をしなければならない。

1. 周辺環境から継続的に隔離されるよう、生物学的に安全な施設に直接搬送し、生涯にわたりそこで飼育すること。
2. すべての汚水・汚物を確実にラナウイルスを非活性化するように処理する。

この条項は第2.4.2.3条、第1項の**製品**には適用されない。

第2.4.2.11条

ラナウイルス清浄宣言をしている国、**ゾーン又はコンパートメント**からの**水生動物製品の輸入**

ラナウイルス清浄宣言をしている国、**ゾーン又はコンパートメント**から、第2.4.2.2条の示す**水生動物の製品**を輸入する際には、**輸入国の当局**は、第2.4.2.4条あるいは第2.4.2.5条（該当する方）の記載に基づいて製造された国、**ゾーン又はコンパートメント**がラナウイルス清浄であることを証明する、**輸出国の当局**あるいは**輸入国**によって承認された**証明発行者発行の国際水生動物衛生証明書**を要請しなくてはならない。

証明書はAppendix 4.X.Xの書式に沿うこと。

この条項は第2.4.2.3条、第1項の**製品**には適用されない。

第2.4.2.12条

ラナウイルス清浄宣言をしていない国、**ゾーン又はコンパートメント**からの**水生動物製品の輸入**

1. 第2.4.2.2条に示される**水生動物製品**を、ラナウイルス清浄宣言をしていない国、**ゾーン又はコンパートメント**から輸入する際には、**輸入国の当局はリスク**を評価し、適切な**リスク緩和措置**を取らなければならない。
2. **水生動物**の死体の場合は、内臓除去の如何にかかわらず、以下のような**リスク緩和措置**を行う。
 - a) 第2.4.2.3条、第1項に示された**製品**、あるいは**当局**によって許可された他の**製品の加工過程**において、生物学的に安全な施設に直接搬入し、保存する。
 - b) すべての排水・汚物はラナウイルスの非活性化処理を行う。

この条項は第2.4.2.3条、第1項の**製品**には適用されない。

〈 参考一定義 〉

ゾーン：一つまたは複数の国の一部分で以下のものから成るもの

- a) 水路の源から河口または湖に至る一つの**集水域**全体、または
- b) 複数の集水域、または
- c) 水路の源から特定の**疾病**または**疾病群**の導入を妨げるような障壁までの、集水域の一部分、または
- d) 正確に地理的に区切られた一部分の沿岸域、または
- e) 正確に地理的に区切られた一つの河口域

であって、連続した水系から成り、特定の疾病または疾病群に関して独自の健康状態を持っているもの。**ゾーン**は**当局**により明確に示されなければならない（例えば地図や、GPSによる緯度経度表示など）。

コンパートメント：共同のバイオセキュリティ管理体制の下にある一つまたは複数の養殖施設で、必要とされる監視や管理対策が適用され、**国際取引のための基本的バイオセキュリティの要件**が満たされており、特定の疾病または疾病群に関して独自の健康状態を持った**水生動物個体群**を収容しているもの。**コンパートメント**は当局により明確に示されなければならない。

基本的バイオセキュリティの要件：適切な疾病安全確保のために必要とされる、特定の疾病や特定の**ゾーン**または**国**に適用される一連の条件で、例えば以下のものがある。

- a) 当該疾病の発生を疑い例を含めて当局へ報告する義務がある。
- b) **ゾーン**または**国**の中で早期検出体制が実施されている。
- c) **国**または**ゾーン**への疾病の導入を防ぐために**水生動物衛生規約**で概説されているような輸入時の条件が実施されている。

文献 2

Epizootiology of sixty-four amphibian morbidity and mortality events in the USA, 1996-2001.

アメリカ合衆国における1996-2001年の64例の両生類の集団疾病と集団死の動物疫学的検討

D. Earl Green, Kathryn A. Converse, and Audra K. Schrader
Ann NY Acad Sci, 2002, Vol. 969: 323-339.

要約

合計44件の両生類の集団死亡例と20件の集団疾病例について遡及的検討を行った。両生類

の集団死亡例でもっとも一般的な原因はラナウイルス（イリドウイルス科）による感染であった。ラナウイルスの流行は突発的に発生し、後期幼生と変態直後が罹患した。ラナウイルス感染による集団死は、広く分布して個体数の多い両生類種にのみに発生し、個体数が高密度である状況と明らかに関連している。カエルツボカビの感染は変態後の無尾類における7例の集団死のみの原因であった。カエルツボカビの流行は潜行性であり、野外では見落とされやすい。ラナウイルスの流行もカエルツボカビの流行も感染地では90%以上の死亡率であったが、カエルツボカビ感染のみが複数種の両生類の個体数減少と関連していた。新たに設立されたメソミセトゾア（Mesomycetozoa）のクレード（分岐群）に属する3つの原始的な真菌が、無尾類とサンショウウオ類の集団疾病と集団死を引き起こしていた。

概要

事例内訳

病因*	例数	備考
集団死亡例	44	
ラナウイルス感染	21	24/25例は幼生 22/25例は6-8月に発生
1) +デルモシスチジウム感染	2	サンショウウオ、frogで発生
2) +セレン中毒	2	突然発生し、1日に3-数百匹死亡 5-50日間継続（複数種が罹患すると長期化の傾向） 死亡率は常に90%以上 個体数が多い種で発生
カエルツボカビ感染	7	変態後のカエル類のみ、幼生の感染報告はあるが死亡例はなし 発生時期はバラバラ 死亡率は2-3回調査に1匹見つかる程度に低い 調査翌年も死体が見つかり、1年以上継続すると推測される 個体数は12-18ヶ月で激減する、95%以上の減少例もある（希少種で脅威）
デルモシスチジウム全身感染	2	アカガエル属Ranidの幼生のみで発生 死亡率は95%以上 発生月の傾向なし
イクチオフォヌス感染	2	5月に成体で発生
カイアシ類寄生	1	ウシガエル
不明	7	4/7例は死後変化が進み（中毒を疑ったが） 解明できず 5/7例は変態後（成体のみが4例） 4/7例は6-7月に発生

病因*	例数	備考
集団疾病例	20	
吸虫メタセルカリアの皮膚寄生	6	4/6例はサンショウウオ 1/6例はサンショウウオとイモリの同時感染 1/6例はカエル4種同時感染
デルモスポリジウム感染（皮膚疾患）	3	2例は3-5月に発生 罹患率は5%以下
イクチオフォヌス感染	1	腰背部筋肉の腫脹、カエル類
コクシジウム寄生による成長阻害	1	カエル類幼生
フィラリア寄生による腫大（皮膚）	1	イモリ、サンショウウオ同時感染
外来ザリガニによる外傷+カエルツボカビ感染	1	サンショウウオ、カエル同時感染
色素異常・大型化	1	カエル2種同時感染、原因不明
複数原因：筋肉・骨格系の奇形	6	イリドウイルスやカエルツボカビ感染もあり 1/6例はサンショウウオ、他はカエル類

*デルモシスチジウム：真菌の一種としてメソミセトゾアに分類され、コイなど魚類の病原菌として知られる。

*イクチオフォヌス：真菌の一種としてメソミセトゾアに分類され、ニジマス、ブリなど魚類の病原菌として知られる。

*カイアシ類：ケンミジンコなど微小な甲殻類。一部、寄生性の種類があり、魚類、無脊椎動物、海棲哺乳類などに寄生することが知られている。

*デルモスポリジウム：真菌

考察から

- 両生類の集団死亡の原因として 1995 年までの文献で真っ先に挙げられた Red leg disease（アエロモナス属などのグラム陰性細菌による）は検出されなかった。今まで安易にこの病気のせいにされてきた可能性がある。
- 化学物質中毒について、判明できたのはリン酸塩採掘場の廃石場の池におけるセレン中毒（ラナウイルス感染と併発）のみであった。

ラナウイルスについて

- 欧州では成体の死亡例も知られているが、今回の米国調査では成体の発生は見られなかった。
- 米国西部ではサンショウウオ 1 種で見られたが、東部では複数種での死亡が見られ、国内に少なくとも 2 種類のラナウイルスが存在していると考えられた。
- 繁殖のために集合する 2-5 月に発生がなく、成体は抵抗性があると推測された。
- 3 年連続発生事例が複数あり、どこかにウイルスが持続的に存在しており、死亡する

のは変態期と考えられた。

カエルツボカビについて

- 変態後のカエル類でのみ死亡例が見られ、サンショウウオや無尾類の幼生では本症による死亡例はみられなかった。

追加資料

本報告後の2002-2008年（第3期まで）のUSGSによる野生動物集団死亡例報告によると、ラナウイルス（R）感染例は11例、イリドウイルス（I）感染例（疑い含む）は10例ある。

ウイルス	死亡動物種	死亡数 (推定)	発生時期	発生州
R	ハコガメ	6	2008年7-8月	メリーランド
R	ヒョウガエル類	200	2008年7-8月	ネバダ
R	サンショウウオ類、カナダアカガエル	81,000	2008年5-6月	ロードアイランド
R	カエル類	75	2007年8-10月	ワイオミング
I	ブロンズガエル、カナダアカガエル	—(多くは卵)	2007年5月	ロードアイランド
R	アマガエル類	550	2006年5-6月	カリフォルニア
I	ブロンズガエル	150	2006年1-2月	フロリダ
I	カエル類	100	2005年7-8月	ワイオミング
R	カナダアカガエル、ブロンズガエル	50	2005年7月	メイン
I	ヒキガエル類	2	2005年6月	ワイオミング
R	カエル類	25	2005年6-7月	テキサス
R	カナダアカガエル、ニシキガメ、サンショウウオ	5,000	2005年6月	ロードアイランド
R	ヒョウガエル類	110	2004年6-7月	ロードアイランド
R	カナダアカガエル	10,000	2004年6月	ミネソタ
I	サンショウウオ、カエル類	500	2004年4-5月	ケンタッキー
R	トラフサンショウウオ	100	2004年4-5月	ニューメキシコ
I	ウシガエル、ブロンズガエル	3,500	2003年7-9月	メイン
I疑	アマガエル類	2	2003年8月	フロリダ
I疑	ウシガエル	2,000	2002年8月	インディアナ
I	カナダアカガエル、ニシキガメ	100	2002年6-7月	ロードアイランド
I	アマガエル類	15	2002年2-3月	フロリダ

Five amphibian mortality events associated with ranavirus infection in south central Ontario, Canada.

カナダ・オンタリオ州中南部におけるラナウイルス感染に関連した5例の両生類の集団死亡例

Amy L. Greer, Michael Berrill, and Paul J. Wilson
 Diseases of Aquatic Organisms, 2005, Vol. 67: 9-14.

要約

野外調査および分子生物学的手法、組織学的手法により、カナダ・オンタリオ州南部の3カ所において、カナダアカガエル (wood frog *Rana sylvatica*) の幼生、レオパードフロッグ (leopard frog *Rana pipens*) の変態直後個体において、死亡をもたらした流行性の全身疾患について検討した。この疾患の原因はラナウイルスである可能性を示した。罹患した両生類は造血細胞内の壊死を呈していた。ラナウイルス (イリドウイルス科) の主要カプシド蛋白 (MCP) のPCR増幅により、肝臓組織試料はウイルス陽性であった。陽性検体はシーケンス解析により確認した。卵から孵した実験室飼育の臨床的に正常なカナダアカガエルもラナウイルスに弱陽性を示した。疾病の両生類に与える集団効果が両生類の個体数減少と関連すると結論づけられたわけではまだないが、より焦点を絞った配慮をする必要がある。

概要

発生状況

場所名	Oliver Pond	Kortright Pond	Gannon's Narrows
罹患種	カナダアカガエル (後期幼生)	カナダアカガエル (後期幼生)	レオパードフロッグ (変態直後)
1999年	6月に100個体以上死亡		
2000年	6月に100個体以上死亡 (変態直後個体は観察されず=幼生は全滅に近い)		
2001年	6月に100個体以上死亡 (変態直後個体は観察されず=幼生は全滅に近い) PCR陽性	6月に50個体以上死亡 PCR陽性	
2002年	死亡発生なし 産卵後12時間以内の卵塊を実験室でふ化、生育 野外採取個体、実験室個体ともPCR陽性		8月に100個体以上死亡 PCR陽性 病理組織学的変化

*発生はいずれも1種のみ (他にも両生類は生息していたが。)

*発生期間は数日～数週間

* 肝臓の病理組織学的変化は発生歴のない池から対照が得られたレオパードフロッグのみで実施

* PCRの結果、検出されたMCPには個体間、地域間の差なし。FV3のMCPと98%合致。

考察から

- 他報告と同様に後期幼生と変態期の感受性が高い←変態期に一時的に免疫抑制がおきるためか？
- 2002年 Oliver Pond の卵を実験室で孵した個体からウイルス検出
 - 垂直感染？←魚類のDNAウイルスでは報告あり
 - 抵抗性のある個体の選択が起こった？
- 2002年 Oliver Pond で集団死が発生しなかった
 - 抵抗性のある個体の選択が起こった→将来的にも発生しない（保全上、問題ない）
 - 2002年はそれまでと比べて気象条件が良く、水位が高かった。水位が低いと高密度となり、感染の可能性が高くなる。→将来的にまた発生する可能性がある
- オンタリオ州で初めて、カナダで2例目の両生類のラナウイルス感染報告例
 - モニタリングを続けていく必要
 - 感染症の個体群への影響の観察必要

文献 4

Frog virus 3-like infections in aquatic amphibian communities. 水生両生類群におけるFV3様ウイルス感染

Duffus ALJ, Pauli BD, Wozney K, Brunetti CR, Berrill M
J Wildl Dis, 2008, Vol. 44: 109-120.

要約

フロッグウイルス3 (FV3) とFV3様ウイルスは、ラナウイルス属 (イリドウイルス科) に属し、両生類の個体群減少の原因となったかもしれない伝染病に関連づけられてきた。本研究ではある両生類の地域個体群において、FV3様ウイルスの感染方法と可能性のある宿主および保有宿主を調べた。ポリメラーゼ連鎖反応法で感染個体を検出したところ、カナダ、オンタリオ中南部の両生類地域個体群がFV3様ウイルスを保有していることが分かった。ここではアカガエル科、アマガエル科のオタマジヤクシ (カナダアカガエル *Rana sylvatica*, *Hyla versicolor* とコーラスガエル属の一種 *Pseudacris spp.*)、幼生のサンショウウオ (*Ambystoma spp.*)、ブチイモリ (*Notophthalmus viridescens*) に同所的に感染が見られた。幼生有尾目が高い感染率を示したことから、サンショウウオは宿主、ウイルス保有種ともなりうると考えられた。カナダアカガエルにおけるFV3の感染実験では、曝露させたウイルス量によって感染率が左右された。さらに、オタマジヤクシへの感染経路としては垂直感染も疑われているが、汚染された池の水への曝露による水平感染が最も有力な経路と

考えられた。これらの観察により、FV3/FV3様ウイルスの感染は単純モデルとして考えることができ、水棲両生類の個体群においては無尾目・有尾目の間でウイルス感染が起こり、本研究においてはトラフサンショウウオ属のサンショウウオが最も有力なラナウイルス保有種であると考えられた。

文献 5

Characterization of an iridovirus from the cultured pig frog *Rana grylio* with lethal syndrome.

致死的症候群を呈した養殖ブタノコエガエル *Rana grylio* から分離されたイリドウイルスの特性

Zhang, Qi-Ya, Feng. Xiao, Zhen-Qiu Li, Jian-Fang Gui, Jinghe Mao and V. G. Chinchar
Diseases of aquatic organisms, 2001, Vol. 48: 27-36.

要約

致死的感染症が進行中の養殖ブタノコエガエル *Rana grylio* (の集団) より、GV-9506、RGV-9807、RGV-9808、の3つのウイルス株が得られた。以前の研究で、最初に分離された RGV-9506 が超微細構造と形態学的研究によりイリドウイルスであることを示した。本研究では、最初の分離株について、より最近に分離された2つのウイルス株と共に、試験的感染、組織病理学的、電子顕微鏡観察、血清学的反応、ウイルスポリペプチドとDNAの制限断片のゲル電気泳動法、PCR増幅、主要カプシド蛋白 (MCP) 遺伝子の核酸塩基配列の解析により、より詳しく特性を明らかにした。3つの分離されたウイルスは互いに同一であり、ラナウイルス属 (イリドウイルス科) の基準種であるFV3にとっても良く似ていることが明らかとなった (ことを示した)。これらの結果により、RGVはFV3の一つの型と考えるべきであり、FV3様のイリドウイルスは養殖カエルにおいて広く重篤な疾病 (病状) を起こすことが示唆された。

文献 6

Pathological and microbiological findings from incidents of unusual mortality of the common frog (*Rana temporaria*).

ヨーロッパアカガエル (*Rana temporaria*) 異常死における病理学的、微生物学的所見

Cunningham, A. A., T. E. S. Langton, P. M. Bennet, J. F. Lewin, S. E. N. Drury, R. E. Gough and S. K. Macgregor

Philosophical Transactions of the Royal Society of London, B, 1996, Vol. 351:

1539-1557.

要約

一般市民からの通報が増加し、1992年、イギリスにおけるヨーロッパアカガエル (*Rana temporaria*) の異常な大量死について調査を開始した。10か所の異常死が発生した地域を調査した結果、2つの主だった症候群があることが判明した：一つは皮膚潰瘍で、もう一つは全身性出血を特徴としていた。しかし、両方の症候群で共通の病変があり、両方に共通する皮膚の顕微鏡学的所見も見られた。同様の病変を起こすと報告されているアエロモナス属細菌 *Aeromonas hydrophila* は、皮膚潰瘍のみを呈するものよりも、全身性出血を呈しているものから有意に頻繁に検出された。しかし、皮膚潰瘍のものはほとんどが安楽死されたもので、アエロモナスの検出の差は死後の細菌侵食状況の差による可能性もある。それぞれの症状のカエルの皮膚病変を電子顕微鏡で検査したところ、イリドウイルス様粒子が見つかり、全身性出血を呈したカエルの肝臓にはイリドウイルス様含有物が見つかった。また、全身性出血を呈しているカエル1匹からアデノウイルス様粒子が分離培養された。過去に病気のカエルで報告されたポックスウイルス様粒子が対照個体からも見つかり、メラノソーム（黒色素胞）と同定された。イリドウイルス様粒子の発現の多さとその病変との関連性から、発現する症候群の原因として関連しているかもしれないと考えられた。特に、以前は細菌のみの感染だと考えられていた“red-leg（赤足）”の自然発生は、感染の原因となるアエロモナス等の二次的な日和見感染の有無にかかわらず、イリドウイルス感染が主たる原因であると提唱した。

文献 7

Immunohistochemical demonstration of ranavirus antigen in the tissues of infected frogs (*Rana temporaria*) with systemic haemorrhagic or cutaneous ulcerative disease.

全身性出血性疾患と皮下潰瘍を呈したヨーロッパアカガエル (*Rana temporaria*) 組織内にみられたラナウイルス抗原の免疫組織化学的証明

Cunningham AA, Tems CA, Russell PH.

J Comp Pathol, 2008, Vol. 38: 3-11.

要約

ラナウイルス感染症は、1980年代後半にイギリスにおいてヨーロッパアカガエル (*Rana temporaria*) で毎年再発した伝染性集団死の原因疾患として発生した。感染したカエルは全身性出血を特徴とした甚急性疾患、あるいは皮膚潰瘍を特徴とする慢性疾患を呈するが、内臓には肉眼的病変が見られない。また、ヨーロッパヒキガエル (*Bufo bufo*) でもラナウイルスによる出血性疾患が認められている。ラナウイルス感染による2つの主要な症状の発生機序の違いを解明するために、抗ラナウイルス免疫組織化学的手法を用い、自然感染あ

るいは実験的に感染させたカエルの種々の組織を検証した。ラナウイルスは線維芽細胞、上皮細胞、リンパ球、肝細胞、メラノマクロファージなど様々な細胞に存在したが、全身性出血性疾患に比べ、皮膚の潰瘍を呈したカエルの方が感染した組織が少なかった。特に、全身性出血性疾患を呈したものに比べ、皮膚潰瘍を呈したものでは脾臓のリンパ球、膵臓あるいは消化管上皮には全くウイルス抗原が標識されなかった。細胞質内ウイルス封入体が全身性出血性疾患を呈したカエルの肝臓、腎臓、膵臓あるいは胃にみられたが、皮膚潰瘍型のカエルでは見られなかった。感染した1匹のヒキガエルの組織の免疫組織化学的に標識では、皮膚と内臓にラナウイルス抗原が見られた。この手法によって、ラナウイルスの出血型感染は、皮膚潰瘍症候群に比較して、より様々な内臓へのウイルス感染を伴うことを示し、出血型疾患の発生機序に重要な役割を果たしている可能性のある脾臓などの特定の組織に感染することを示した。

文献 8

Experimental challenge and clinical cases of Bohle iridovirus (BIV) in native Australian anurans.

オーストラリア無尾目在来種におけるボールイリドウイルスの実験感染と症例 (自然感染例)

Cullen, B. R., L. Owens

Diseases of aquatic organisms, 2002, Vol. 49: 83-92.

要約

ラナウイルスは変温脊椎動物間で急速に確認されている。両生類の個体数におけるラナウイルスの影響の多くは未知である。伝染性造血器壊死症ウイルス (EHNV) を検出するように設計されたプライマーを元に、ボールイリドウイルス (BIV) の遺伝子プローブを構築した。PCRとドットプロット法によって、ホルマリン固定後、パラフィン包埋された両生類組織を消化したものからBIVの核酸の検出に成功した。カエル類の幼生は成体よりBIV感受性が高かった。飼育下のカエル類の感染実験および(自然の) 流行においては、幼生のホワイトアマガエル *Litoria caerulea*, *L. albobuttata*, *Cyclorana brevipes*, と *Pseudophryne coriacea* は感受性が高かった。高い死亡率 (100% またはそれに近い) が見られ、感染方法や量により通常5~25日以内に死亡した。組織病理学的変化は主に肝臓、腎臓、脾臓における壊死であった。より慢性的に感染したカエル類では顕著なヘモジデリン沈着がみられた。BIVは感染(接種)後から40日以上でも *L. caerulea* の幼生から再分離され、*L. albobuttata* の流行(自然感染)で最初の死亡から200日以降でも分離された。*L. rubella*, *L. inermis*, *L. caerulea*, *Cophixalus ornatus* と *Taudactylus acutirostris* の成体は30日から100日以上期間の試験で感受性が低かった。いくつかの症例では慢性感染が見られ、PCRによってBIVが検出された。タウンズビルで捕獲されたひん死の野生成体 *L. caerulea* とシドニーの飼育下で大量死が発生中の幼生 *Pseudophryne coriacea* をBIV PCRによって検査したとこ

る陽性だった。PCRとドットプロット法のほうがウイルス分離よりも検出感度が高かった。BIV実験感染のかなり後においても、PCRは両生類でBIVを検出することが可能であり、また、健康に見える両生類からも検出可能であった。ラナウイルスはオーストラリアにおける両生爬虫類に影響を与えているかもしれない。

文献 9

***Rana catesbeiana* virus Z (RCV-Z): a novel pathogenic ranavirus.
ウシガエルウイルスZ (RCV-Z): 新たな病原性ラナウイルス**

Majji. S, Lapatra. S, Long. SM, et al.
Diseases of aquatic organisms, 2006, Vol.73: 1-11.

要約

ウシガエル (*Rana catesbeiana*) ウイルスZ (RCV-Z) と呼ばれるウイルスが、北アメリカのウシガエル *Rana catesbeiana* のひん死のオタマジャクシの内臓組織から分離された。ウイルスタンパクのSDS-PAGE (ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動) 法による解析と主要カプシド蛋白のアミノ末端の配列からは、RCV-Zはfrog virus 3 (FV3) と他の無尾類や魚類より分離されたラナウイルスとよく似ていた。しかしながら、Xba I と BamHIによるウイルスゲノムDNA消化後の制限酵素断片プロファイルの分析から、FV3とは大きく異なることが示唆された。さらにFV3とは異なり、RCV-Zはウイルスにおける真核生物翻訳開始因子2 α (eIF-2 α) 相同物質の遺伝子の全長のコピーを含んでいた。FV3とRCV-Zをウシガエルのオタマジャクシに実験感染させると、RCV-ZのほうがFV3よりも病原性が強く、また、FV3を事前に感染させるとRCV-Z感染による死亡を防御することが分かった。これらの結果より、RCV-Zはカエルに感染できる新種のラナウイルスであり、ウイルスにおけるeIF-2 α の相同物質(vIF-2 α)を保持することが毒性の増幅と関連することが示唆された。

文献10

Molecular characterization of iridoviruses isolated from sympatric amphibians and fish.

同所性の両生類および魚類から分離されたイリドウイルスの分子的特徴

Mao. J, Green D.E, Fellers. G, Chinchar V.G,
Virus Res, 1999, Vol. 63: 45-52.

要約

イリドウイルスは無脊椎動物（主に昆虫類と甲殻類）と変温脊椎動物（魚類、両生類、爬虫類）に感染する。分類上は同じ網に属する異なる動物種から、同一の、またはほぼ同一のウイルスが分離されており、一つのウイルスが一種の動物のみに限って感染するのではないことが示唆される。脊椎動物のイリドウイルスによる感染実験で、異なる網の間での感染が報告されてはいるが、これらの感染が自然環境で起こっているかどうかは不明である。本研究は同所性の野生の魚類（イトヨ *Gasterosteus aculeatus*）と両生類（アカアシガエル *Rana aurora*）より、明らかに同一のイリドウイルスを分離したことを報告する。イトヨから分離されたウイルス（sticklebackウイルス、SBV）とアカアシガエルのオタマシヤクシから分離されたウイルス（tadpole virus 2, TV2）をファットヘッドミノー（FHM）の細胞で培養し、フログウイルス3の蛋白と共遊走する蛋白質を合成した。ウイルスDNAを *Hind III* および *Xba I* で制限エンドヌクレアーゼ消化すると、SBVとTV2のプロフィールは互いに同一で、FV3とは異なることがゲル解析で示された。イリドウイルス主要カプシド蛋白の高保存領域に選択的なオリゴヌクレオチド・プライマーを用い、SBVとTV2から約500のヌクレオチドから成る1種類のDNA断片が増幅された。配列解析によりこれらの500のヌクレオチド領域はSBVとTV2で同一であり、FV3とも同じであった。これらの結果より、分類上異なる網に属する動物にイリドウイルスが自然感染することの証拠が初めて示され、魚類が両生類のウイルス保有種となる、またはその逆である、とする説が強化された。

文献11

Ranavirus infection of free-ranging and captive box turtles and tortoises in the United States.

アメリカにおける野生下および飼育下のハコガメ・リクガメ類のラナウイルス感染

Johnson AJ, Pessier AP, Wellehan JFX, Childress A, Norton TM, Stedman NL, Bloom DC, Belzer W, Titus VR, Wagner R, Brooks JW, Spratt J, Jacobson ER.

J Wildl Dis, 2008, Vol. 44: 851-863.

要約

ラナウイルス属のイリドウイルスは魚類、両生類に大量死を引き起こすが、爬虫類においては散発的な感染報告があるにすぎないことが良く知られている。本報告はアメリカのジョージア州、フロリダ州、ニューヨーク州とペンシルベニア州で2003～2005年にカメ類で発生した5例のラナウイルス感染について述べる。感染した種は、飼育下の複数のビルマホシガメ (*Geochelone platynota*)、野生の1頭のアナホリゴファーガメ (*Gopherus polyphemus*)、野生の複数のトウブハコガメ (*Terrapene carolina*)、1頭のプロリダハコガメ (*Terrapene carolina*) である。さらに、1991年ジョージア州と1998年テキサス州で発生したトウブハコガメの原因不明の大量死の際の保存試料からも、ラナウイルス感染の証拠が得られた。感染した動物の病変は一貫して、壊死性の口内炎および、または食道炎、線維索性・壊死

性肺炎と多中心性フィブリノイド血管炎であった。これらの感染した組織には細胞質内封入体はほとんど見られなかった。2003-2005年の各症例について主要カプシド蛋白 (MCP) 遺伝子断片の配列決定を行い、それぞれ同じ遺伝子であり、420組の塩基配列においてフログウイルス3 (FV3) と同じであることが明らかになった。また2カ所において、感染したカメ類と同所的に生息していた両生類でラナウイルス感染を記録した。ビルマホシガメ1頭の死体とその近辺で発見されたミナミヒョウガエル (*Rana utricularia*) 1匹から分離されたラナウイルスの、全ゲノムDNAを(制限酵素) HindIIIで消化したプロフィールは相似していた。ハコガメからの分離株の消化プロフィールにはカエルの分離株には見られない低分子量断片があった。これらの結果から、ある特定の両生類とカメ類は同じようなウイルスに感染し、また、異なるカメ類には異なったウイルスが存在することが示唆された。両生類はカメ類に感受性のあるウイルスのウイルス保有種となっているかもしれない。本報告ではまた、ラナウイルス感染によるカメ類の重篤な疾患は予想されていた以上に広くまん延していることが示された。

文献12

Transmission of the *Ambystoma tigrinum* virus to alternative hosts.
トラフサンショウウオウイルス (*Ambystoma tigrinum* virus) の他種宿主への感染

Jancovich, J. K., E. W. Davidson, A. Seiler¹, B. L. Jacobs and J. P. Collins
Diseases of aquatic organisms, 2001, Vol. 46: 159-163.

要約

トラフサンショウウオウイルス (ATV) は死亡率の高いウイルスで、最初はアメリカ合衆国、アリゾナ州南部、サン・ラファエル溪谷に生息するソノラトラフサンショウウオ *Ambystoma tigrinum stebbinsi* から分離された。ATVは数種類のサンショウウオ類の流行に関与していると考えられている。今回、魚類および両生類に、注射、水浴、経口投与の方法でATVを実験的に感染させ、感染を示す臨床症状が出るか、あるいは症状を示さない個体からウイルスが分離されるかどうかを試みた。細胞培養とウイルスの主要カプシド蛋白遺伝子のポリメラーゼ連鎖反応によってウイルスを検出した。サンショウウオとイモリはATVに感染しウイルスが分離されたが、カエル類、魚類からはウイルスは分離されなかった。これらの結果からATVは有尾目のみに感染し、魚類、カエル類はATVに感受性がないことが示唆された。

文献13

Experimental evidence that amphibian ranaviruses are multi-host pathogens.

両生類のラナウイルスが複数種感染の病原であることの実験的検証

Schock DM, Bollinger TK, Chinchar VG, Jancovich JK, Collins JP.
Copeia, 2008, No.1: 133-143.

要約

ラナウイルス（イリドウイルス科）などの感染症は世界の両生類の減少の原因として疑われている要因の一つである。他の多くの病原体と同じように、ラナウイルスも複数種に感染するようである。これらのウイルスが宿主集団に及ぼす影響についての理解を深めるために、北米両生類より分離した数種のラナウイルス株を検証した。本研究の目的は以下の2点である。1. 野生の両生類個体群に感染した流行病で分離された病原体の特性を明らかにし、過去に分離されたものと比較する。2. ラナウイルスが生態学的に関連した異種の両生類に感染するかどうかの検証と、異種間で感染する場合には曝露の結果を記録する。制限エンドヌクレアーゼ (RE) 消化解析法と塩基配列解析、実験感染の結果を合わせると、トラフサンショウウオウイルス (ATV) 様ウイルスとFrog Virus 3 (FV3) 様ウイルスの2つのラナウイルスは生態が異なることから別種のウイルスであることが示唆された。同一の主要カプシド蛋白 (MCP) 遺伝子配列を持つ数種のウイルスは独特のREを持つことが明らかとなった。このことは、MCP配列が高度に相同であるということは分離株間の重要な違いを正しく伝えるものではないことを示唆しており、ラナウイルス分離株ではMCP遺伝子配列を超えた特徴付けが必須であると我々は主張する。感染実験の結果からは、複数種の宿主がATV様またはFV3様ウイルスの生態に関わりがあり、それぞれのウイルスは繁殖地を同じくする数種の両生類に感染できることが示された。さらに野外収集により、同じ週に同じ繁殖池において、FV3様ラナウイルスはカナダアカガエルWood frog (*Rana sylvatica*) 間で循環しており、ATV様ラナウイルスはトラフサンショウウオ (*Ambystoma tigrinum*) 間で循環していることが明らかとなり、異なる2種間で感染する生態学的な可能性が注目された。また本研究は、個々の宿主群のラナウイルス感染に対する反応が違うことを示唆する一連の知見を裏付けるものであり、このことは保全上、複雑な意味合いを持っている。最終的には、種間、種内での感染動態を詳細に明らかにする実験が、宿主集団でのラナウイルスの役割、その両生類個体群への脅威を理解する上で特に重要であろう。

文献14

Ranavirus in wood frogs (*Rana sylvatica*): Potential sources of transmission within and between ponds.

カナダアカガエル (*Rana sylvatica*) のラナウイルス：池内と池間における感染源の検討

Harp EM, Petranka JW.
J Wildl Dis, 2006, Vol. 42: 307-318.

要約

ラナウイルス属（イリドウイルス科）に属するウイルスは池で繁殖する両生類に対して破壊的な大量死を引き起こすことがあり、両生類の個体数減少の原因となっている新興感染症と関連づけられている。本研究ではカナダアカガエル (*Rana sylvatica*) の地域繁殖個体群内および個体群間の感染に影響する要因を調べるために、3種の実験を行った。実験室内では、ラナウイルスによる地域的な集団死の発生中に採集した死にかけのオタマジャクシに、感染していないオタマジャクシを曝露したところ、曝露後4日で死亡した。感染オタマジャクシの死体を食べられる状態であると、死亡の発現は早まった。浅い子供用プールを用いた屋外でのメソコスム実験では、ウイルスに感染していないオタマジャクシの入ったプールに感染したオタマジャクシを入れると、約19日後に集団死が開始した。開始時のオタマジャクシの個体数密度に関わらず、すべてのプールにおいて98%以上の死亡率の大量死がみられた。2種類目のメソコスム実験では、ラナウイルスによる集団死が発生している池から採取した水と底質を加えたが、対照と比較して、オタマジャクシの生存率や成長度は低下しなかった。ごく少数のオタマジャクシが病気のようになったが、ほとんどのオタマジャクシはそのプール内で最初の個体に変態を始める時まで生存した。しかしながらポリメラーゼ連鎖反応でラナウイルスを検出したところ、汚染された底質を入れたほとんどのプールで陽性を示し、垂致死（死にいたらない）の感染があったことが示唆された。以上の実験結果より、池内での感染は死んだ個体を食べることによって増進し、池と池の間の感染の拡大は汚染した底質が動物あるいは人によって運ばれることにより起こることが示唆された。

文献15

Influence of temperature on Ranavirus infection in larval salamanders *Ambystoma tigrinum*

トラフサンショウウオ幼生におけるラナウイルス感染の温度影響

Rojas S, Richards K, Jancovich JK, Davidson EW.

Diseases of aquatic organisms, 2005, Vol. 63: 95-100.

要約

トラフサンショウウオウイルス（イリドウイルス科）（ATV）に曝露したサンショウウオの死亡率、死に至るまでの時間には、温度が大きく影響していた。26℃で曝露したサンショウウオの多くは生存したが、18℃ではすべてが死亡し、10℃ではほとんどすべてが死亡した。10℃または26℃の曝露において無症状で60日間生存した一部のサンショウウオはウイルスに不顕性感染していた。ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）でATV曝露サンショウウオ体内のウイルスの存在を確認できたが、ATVを低濃度で検出するという点では細胞培養よりも感度が低かった。PCR産物は主要カプシド蛋白配列において100%ATVと相同であった。ウイル

ス価は18℃で飼育されたものよりも10℃で飼育されたものの方が高かったが、26℃で飼育されて死亡した少数のサンショウウオからは、ほとんど検出されなかった。これらの結果は、水温変動が大きい野外のトラフサンショウウオ個体群における周期的流行の発生を説明するものであるかもしれない。

文献16

**Transmission dynamics of the amphibian ranavirus *Ambystoma tigrinum* virus.
両生類のラナウイルス、トラフサンショウウオ (*Ambystoma tigrinum*) ウイルスの感染動態**

Brunner JL, Schock DM, Collins JP.

Diseases of aquatic organisms, 2007, Vol. 77: 87-95.

要約

感染性は病原体の元気さの要となるものであり、宿主個体群への病原体の影響を大きく左右する。感染動態にとって特に重要なことは、体が直接触れ合うこと（例えば、ぶつかり合い、戦いまたは咳など）が必要な直接感染と、汚染した土壌など環境要因からの間接感染との区別である。本報告ではトラフサンショウウオ *Ambystoma tigrinum nebulosum* 間のトラフサンショウウオウイルス (ATV) の感染形態、感染経路と感染時期に関する4実験のデータを示した。本研究のデータから、ATVは死体を食べることや、水や媒介物による間接感染と同様に、生きた動物間の直接的関係（ぶつかり合い、噛み合い、共食い）によって効率的に感染することが示唆された。自然界ではどの形態が最も重要な伝播形態なのかを決定することは個体群レベルでの伝染を理解するうえで必須である。また、本研究では感染力に関する重要な時間的要素を明らかにした。幼体サンショウウオはATV曝露後すぐに感染し、他個体に感染させる傾向は時間が経つとともに増加した。これらの結果は、ATVの感染メカニズム、感染動態を解明する第一歩であり、将来の研究で解明されるべき重要な疑問点を導くものである。

文献17

Habitat fragmentation as a result of biotic and abiotic factors controls pathogen transmission throughout a host population.

生物的・非生物的要因による生息地分断が宿主個体群全体への病原体感染を左右する

Greer AL, Collins JP.

J Anim Ecol, 2008, Vol. 77: 364-369.

要約

1. 生息地分断（生物的・非生物的要因による）が個体群内の疾病の伝播を変化させるといふ仮説を、詳細に研究された両生類と病原体の関係に関する野外データを使用し検討した。
2. 本研究ではトラフサンショウウオとトラフサンショウウオウイルス (ATV) の関係についてのモデルシステムを利用し、池の水面から外に出ている植生や生息地管理の結果としての生息地分断が、一つの地形の中に存在する複数の池において、疾病感染動態にどのように影響を与えるかを検討した。
3. 本研究では時間的・空間的な ATV の感染の変動を定量化した。ATV の感染は家畜用に改良された池で有意に高かった ($P=0.032$)。池の水面から外に出ている植生が多いほど疾病の発生は低かった ($P<0.001$)。これらの要因は、宿主の接触率、そしてそれに伴う疾病感染率を変化させることにより、疾病感染率を左右していると考えられた。
4. 池の水面から外に出ている植生が幼生の分布に与える影響を調べるために行った野外調査で、植生がまばらな池では幼生の行動が変化することが示された。植生がまばらな池では幼生が微小生息域を選択することによって池の隅に集中し、「ハロー効果」が見られた。それに比べ、植生が密な池では池全体により均等に幼生が分布した。微小生息域の選択は幼生の実効密度に影響した。この「ハロー効果」は植生がまばらな池の浅い部分で個体の接触率を増加させ、直接感染する病原体への感染機会を増加させた。
5. アメリカ、アリゾナ州、Kaibab 高原におけるトラフサンショウウオの度重なる致死的なラナウイルス感染にもかかわらず、個体群は（絶滅せず）生き残っている。疫学仮説における二つの主要な前提である、感染の個体数密度依存性と宿主間接触の均一性に関して、本研究の結果が持つ意義を考察した。

訳註 ハロー効果：後光（ハロー）のような、丸い形になること

文献18

Inactivation of viruses infecting ectothermic animals by amphibian and piscine antimicrobial peptides.

両生類と魚類の抗菌ペプチドによる変温動物感染ウイルスの不活化

Chinchar VG, Bryan L, Silphadaung U, Noga E, Wade D, Rollins-Smith L.
Virology, 2004, Vol. 323: 268-275.

要約

精製された両生類の抗菌ペプチド5種類（dermasseptin-1, temporin A, magainin I と II、PGLa）と、レオパードフロッグ (*Rana pipiens*) およびウシガエル (*R. catesbeiana*) の

表皮より分離した粗ペプチド画分と、ストライプトバスの雑種由来の4種の抗菌ペプチド (AMP) (piscidin-1N, -1H, -2 と-3) について、アメリカナマズウイルス (CCV) とフロッグウイルス3 (FV3) に対する感染力減退効果を検討した。magainin- I を除くすべての化合物がCCVの感染能力を大きく減少させた。CCVに比べて、FV3はこれらの物質に対して1/2~1/4の感受性であった。別の2種類の両生類ペプチドを用いた過去の研究と同様に、今回用いた物質は迅速に、また生理学的に適当な範囲で広範囲の温度で作用した。これらの実験結果は我々の以前の研究成果を拡張するものであり、様々な両生類・魚類のAMPが病原ウイルスから両生類や魚類を保護する重要な役目を担っていることを強く示唆するものである。

文献19

Antimicrobial peptide defenses in the salamander, *Ambystoma tigrinum*, against emerging amphibian pathogens.

トラフサンショウウオ *Ambystoma tigrinum* の抗菌ペプチドによる両生類の新興病原体に対する防御

Sheafor B, Davidson EW, Parr L, Rollins-Smith L.
J Wildl Dis, 2008, Vol. 44: 226-236.

要約

表皮のペプチドを生きたトラフサンショウウオの幼生と成体から採取し、2つの新興病原体、カエルツボカビとトラフサンショウウオウイルス (ATV)、さらにトラフサンショウウオから分離された細菌に対して、抗微生物作用を検討した。表皮のペプチドの天然混合物はカエルツボカビ、黄色ブドウ球菌とクレブシエラの一種の増殖を抑制することが分かったが、ATVに対する作用は明確ではなかった。サンショウウオの表皮のペプチドは、環境温度として合理的な3つの異なる温度条件においては、カエルツボカビに対する抑制作用に差がみられた。また、トラフサンショウウオの表皮のペプチドの働きはpHによって大きく影響されることが分かった。

文献20

Recovery of ranavirus dsDNA from folmarin-fixed archival material.

ホルマリン固定で保存された標本からのラナウイルスdsDNAの再生

Kattenbelt JA, Hyatt AD, Gould AR.
Diseases of aquatic organisms, 2000, Vol39: 151-154.

要約

ホルマリン固定、パラフィン包埋された組織からの核酸の抽出・増幅は遡及的疫学データの収集において重要な手法となった。パラフィン包埋された固定組織や10%ホルマリン（水溶）液で保存された組織からdsDNAの抽出・増幅を可能とする手順を記した。この手法は保存組織からラナウイルスのDNAを検出するために利用でき、それによって起原を特定し、感染拡大を追跡するための貴重なデータを提供することができる。

収集・引用文献リスト（上記20件以外のもの）

<両生類の感染症、ラナウイルス全般に関する文献>

- 21) Carey C., Cohen N., Rollins-Smith L., 1999. Amphibian declines: an immunological perspective. *Development and Comparative Immunology*, 23: 459-472.
- 22) Chinchur V. G., 2002. Ranaviruses (family Iridoviridae): emerging cold-blooded killers. *Archives of Virology*, 147: 447-470.
- 23) Daszak P., Berger L., Cunningham A. A., Hyatt A. D., Green D. E., Speare R., 1999. Emerging infectious diseases and amphibian population declines. *Emerging Infectious Diseases*, 5: 735-748.
- 24) Daszak P., Cunningham A. A., Hyatt A. D., 2003. Infectious disease and amphibian population declines. *Diversity and Distributions*, 9: 141-150.
- 25) Daszak P., Lips K., Alford R., Carey C., Collins J. P., Cunningham A., Harris R., Ron S., 2007. Chapter 4, Infectious Diseases. *In Amphibian Conservation Action Plan: Proceedings: IUCN/SSC Amphibian Conservation Summit 2005*. (Eds) Gascon C., Collins J. P., Moore R. D., Church D. R., McKay J. E., Mendelson III JR. IUCN SSC. pp.21-25.
- 26) Hyatt A. D., Gould A. R., Zupanovic Z., Cunningham A. A., Hengstberger S., Whittington R. J., Katternberlt J., Coupar B. E. H., 2000. Comparative studies of piscine and amphibian iridoviruses. *Archives of Virology*, 145: 301-331.
- 27) Marsh I. B., Whittington R. J., O'Rourke B., Hyatt A. D., Chisholm O., 2002. Rapid differentiation of Australian, European and American ranaviruses based on variation in major capsid protein gene sequence. *Molecular and Cellular Probes*, 16: 137-151.
- 28) Milton F., 2006. Disease Emergence and Resurgence: The Wildlife-Human Connection. U. S. Geological Survey, Circular 1285. 400p.
- 29) Muths E., Gallant A. L., Grant E. H. C., Battaglin W. A., Green D. E., Staiger J. S., Walls S. C., Gunzburger M. S., Kearney R. F., 2006. The amphibian research and monitoring initiative (ARMI): 5-year report. U. S. Geological Survey Scientific Investigations Report 2006-5224, 77p.
- 30) Rudolf V. H. W., Antonovics J., 2007. Disease transmission by cannibalism: rare event or common occurrence? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, B*, 274: 1205-1210.
- 31) 宇根有美, 2008. 第5章・両生類のウイルス. 爬虫類・両生類の臨床と病理に関するワークショップ Amphibians.
- 32) World Organisation for Animal Health (OIE), 2008. Chapter 3.1.1. Guidelines for Aquatic Animal Health Surveillance. OIE Aquatic Animal Health Code.

<FV3および類似ウイルスに関する文献>

- 33) Burton E. C., Miller D. L., Styer E. L., Gray M. J., 2008. Amphibian ocular malformation associated with frog virus 3. *The Veterinary Journal*, 177: 442-444.
- 34) Chinchar V. G., Wang J., Murti G., Carey C., Rollins-Smith L., 2001. Inactivation of frog virus 3 and channel catfish virus by esculentin-2P and ranatuerin-2P, two antimicrobial peptides isolated from frog skin. *Virology*, 288: 351-357.
- 35) Docherty D. E., Meteyer C. U., Wang J., Mao J., Case S. T., Chinchar V. G., 2003. Diagnostic and molecular evaluation of three Iridovirus-associated salamander mortality events. *Journal of Wildlife Diseases*, 39: 556-566.
- 36) Essbauer S., Bremont M., Ahne W., 2001. Comparison of the eIF-2alpha homologous proteins of seven ranaviruses (Iridoviridae). *Virus Genes*, 23: 347-359.
- 37) Fox S. F., Greer A. L., Torres-Cervantes R., Collins J. P., 2006. First case of ranavirus-associated morbidity and mortality in natural populations of the South American frog *Atelognathus patagonicus*. *Diseases of aquatic organisms*, 72: 87-92.
- 38) Gray M. J., Miller D. L., Schmutzer A. C., Baldwin C. A., 2007. Frog virus 3 prevalence in tadpole populations inhabiting cattle-access and non-access wetlands in Tennessee, USA. *Diseases of aquatic organisms*, 77: 97-103.
- 39) Maniero G. D., Morales H., Gantress J., Robert J., 2006. Generation of a long-lasting, protective, and neutralizing antibody response to the ranavirus FV3 by the frog *Xenopus*. *Development and Comparative Immunology*, 30: 649-657.
- 40) Miller D. L., Rajeev S., Gray M. J., Baldwin C. A., 2007. Frog Virus 3 Infection, Cultured American Bullfrogs. *Emerging Infectious Diseases*, 13: 342-343.
- 41) Morales H. D., Robert J., 2007. Characterization of primary and memory CD8 T-cell responses against ranavirus (FV3) in *Xenopus laevis*. *Journal of Virology*, 81: 2240-2248.
- 42) Pasmans F., Blahak S., Martel A., Pantchev N., Zwart P., 2008. Ranavirus-associated mass mortality in imported red tailed knobby newts (*Tylotriton kweichowensis*): a case report. *The Veterinary Journal*, 176: 257-259.
- 43) Pearman P. B., Garner T. W. J., Straub M., Greber U. F., 2004. Response of the Italian agile frog (*Rana latastei*) to a ranavirus, frog virus 3: A model for viral emergence in naïve populations. *Journal of Wildlife Diseases*, 40: 660-669.
- 44) Robert J., Morales H., Buck W., Cohen N., Marr S., Gantress J., 2005. Adaptive immunity and histopathology in frog virus 3-infected *Xenopus*. *Virology*, 332: 667-675.
- 45) Robert J., Abramowitz L., Gantress J., Morales H. D., 2007. *Xenopus laevis*: A possible vector of ranavirus infection? *Journal of Wildlife Diseases*, 43: 645-652.
- 46) St-Amour V., Wong W. M., Garner T. W. J., Lesbarreres D., 2008. Anthropogenic influence on prevalence of 2 amphibian pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, 14: 1175-1176.
- 47) Tan W. G. H., Barkman T. J., Chinchar V. G., Essani K., 2004. Comparative genomic analyses of frog virus 3, type species of the genus Ranavirus (family Iridoviridae). *Virology*, 323: 70-84.
- 48) Zhao Z., Ke F., Gui J., Zhang Q., 2007. Characterization of an early gene encoding for dUTPase in

Rana grylio virus. *Virus Research*, 123: 128-137.

- 49) Zhao Z., Ke F., Huang Y. H., Zhao J. G., Gui J. F. Zhang Q. Y., 2008. Identification and characterization of a novel envelope protein in *Rana grylio* virus. *Journal of General Virology*, 89: 1866-1872.

<ATVに関する文献>

- 50) Brunner J. L., Richards K., Collins J. P., 2005. Dose and host characteristics influence virulence of ranavirus infections. *Oecologia*, 144: 399-406.
- 51) Forson D. D., Strofer A., 2006. Atrazine increases ranavirus susceptibility in the tiger salamander *Ambystoma tigrinum*. *Ecological Applications*, 16: 2325-2332.
- 52) Greer A. L., Collins J. P., 2007. Sensitivity of a diagnostic test for amphibian ranavirus varies with sampling protocol. *Journal of Wildlife Diseases*, 43: 525-532.
- 53) Jancovich J. K., Davidson E. W., Morado J. F., Jacobs B. L., Collins J. P., 1997. Isolation of a lethal virus from the endangered tiger salamander *Ambystoma tigrinum stebbinsi*. *Diseases of aquatic organisms*, 31: 161-167.
- 54) Jancovich J. K., Mao J., Chinchar V. G., Wyatt C., Case S. T., Kumar S., Valente G., Subramanian S., Davidson E. W., Collins J. P., Jacobs B. L., 2003. Genome sequence of a ranavirus (family Iridoviridae) associated with salamander mortalities in North America. *Virology*, 316: 90-103.
- 55) Jancovich J. K., Davidson E. W., Parameswaran N., Mao J., Chinchar V. G., 2005. Evidence for emergence of an amphibian iridoviral disease because of human-enhanced spread. *Molecular Ecology*, 14: 213-224.
- 56) Picco A. M., Brunner J. L., Collins J. P., 2007. Susceptibility of the endangered California tiger salamander, *Ambystoma californiense*, to ranavirus infection. *Journal of Wildlife Diseases*, 43: 286-290.
- 57) Picco A. M., Collins J. P., 2008. Amphibian commerce as a likely source of pathogen pollution. *Conservation Biology*, 22: 1582-1589.
- 58) Storfer A., Alfaro M. E., Ridenhour B. J., Jancovich J. K., Mech S. G., Parris M. J., Collins J. P., 2007. Phylogenetic concordance analysis shows an emerging pathogen is novel and endemic. *Ecology Letters*, 10: 1075-1083.

<BIVに関する文献>

- 59) Couper B. E., Goldie S. G., Hyatt A. D., Pallister J. A., 2005. Identification of a Bohle iridovirus thymidine kinase gene and demonstration of activity using vaccinia virus. *Archives of Virology*, 150: 1797-1812.
- 60) Cullen B. R., Owens L., Whittington R. J., 1995. Experimental infection of Australian anurans (*Limnodynastes terraereginae* and *Litoria latopalmata*) with Bohle iridovirus. *Diseases of aquatic organisms*, 23: 83-92.
- 61) Moody N. J. G., Owens L., 1994. Experimental demonstration of the pathogenicity of a frog virus, Bohle iridovirus, for a fish species, barramundi *Lates calcarifer*. *Diseases of aquatic organisms*, 18: 95-102.

- 62) Pallister J., Goldie S., Coupar B., Shiell B., Michalski W. P., Siddon N., Hyatt A., 2007. Bohle iridovirus as a vector for heterologous gene expression. *Journal of Virological Methods*, 146: 419-423.
- 63) Pallister J., Gould A., Harrison D., Hyatt A., Jancovich J., Heine H., 2007. Development of real-time PCR assays for the detection and differentiation of Australian and European ranaviruses. *Journal of Fish Diseases*, 30: 427-438.
- 64) Speare R., Smith J. R., 1992. An iridovirus-like agent isolated from the ornate burrowing frog *Limnodynastes ornatus* in northern Australia. *Diseases of aquatic organisms*, 14: 51-57.
- 65) Whittington R. J., Kearns C., Speare R., 1997. Detection of antibodies against iridoviruses in the serum of the amphibian *Bufo marinus*. *Journal of Virological Methods*, 68: 105-108.

<イギリスのラナウイルスに関する文献>

- 66) Cunningham A. A., Hyatt A. D., Russel P., Bennett P. M., 2007. Emerging epidemic disease of frogs in Britain are dependent on the source of ranavirus agent and the route of exposure. *Epidemiology and Infection*, 135: 1200-1212.
- 67) Cunningham A. A., Hyatt A. D., Russel P., Bennett P. M., 2007. Experimental transmission of a ranavirus disease of common toad (*Bufo bufo*) to common frogs (*Rana temporaria*). *Epidemiology and Infection*, 135: 1213-1216.

<その他の両生類のラナウイルスに関する文献>

- 68) Bollinger, T. K., Mao J., Schock D., Brigham R. M., Chinchar V. G., 1999. Pathology, isolation, and preliminary molecular characterization of a novel iridovirus from Tiger Salamanders in Saskatchewan. *Journal of Wildlife Diseases*, 35: 413-429.
- 69) Delhon G., Tulman E. R., Afonso C. L., Lu Z., Becnel J. J., Moser B. A., Kutish G. F., Rock D. L., 2006. Genome of invertebrate iridescent virus type 3 (mosquito iridescent virus). *Journal of Virology*, 80: 8439-8449.
- 70) He J. G., Lu L., Deng M., He H. H., Weng S. P., Wang X. H., Zhou S. Y., Long Q. X., Wang X. Z., Chan S. M., 2002. Sequence analysis of the complete genome of an iridovirus isolated from the tiger frog. *Virology*, 292: 185-197.
- 71) Speare R., Freeland W. J., Bolton S. J., 1991. A possible iridovirus in erythrocytes of *Bufo marinus* in Costa Rica. *Journal of Wildlife Diseases*, 27: 457-462.
- 72) Zupanovic Z., Musso C., Lopez G., Louriero C. -L., Hyatt A. D., Hengstberger S., Robinson A. J., 1998. Isolation and characterization of iridoviruses from the giant toad *Bufo marinus* in Venezuela. *Diseases of aquatic organisms*, 33: 1-9.
- 73) Zupanovic Z., Lopez G., Hyatt A., Shiell B. J., Robinson A. J., 1998. An improved enzyme linked immunosorbent assay for detection of anti-ranavirus antibodies in the serum of the giant toad (*Bufo marinus*). *Development and Comparative Immunology*, 22: 573-585.
- 74) Zupanovic Z., Lopez G., Hyatt A. D., Green B., Bartran G., Parkes H., Whittington R. J., Speare R., 1998. Giant toads *Bufo marinus* in Australia and Venezuela have antibodies against 'ranaviruses'. *Diseases of aquatic organisms*, 32: 1-8.

<両生類以外のラナウイルスに関する文献>

- 75) Ariel E., Owens L., 1997. Epizootic mortalities in tilapia *Oreochromis mossambicus*. Diseases of aquatic organisms, 29: 1-6.
- 76) Hyatt A. D., Williamson M., Coupar B. E. H., Middleton D., Hengstberger S. G., Gould A. R., Selleck P., Wise T. G., Kattenbelt J., Cunningham A. A., Lee J., 2002. First identification of a ranavirus from green pythons (*Chonderopython viridis*). Journal of Wildlife Diseases, 38: 239-252.
- 77) Mao J., Hedrick R. P., Chinchar V. G., 1997. Molecular characterization, sequence analysis, and taxonomic position of newly isolated fish iridoviruses. Virology, 229: 212-220.
- 78) 中島員洋, 栗田潤, 2005. マダイイリドウイルス病. ウイルス, 55: 115-126.
- 79) (社) 日本水産資源保護協会, 2008. 流行性造血器壊死症EHN. 特定疾病診断マニュアル, pp.29-39.
- 80) Tsai C. T., Ting J. W., Wu M. H., Wu M. F., Guo I. C., Chang C. Y., 2005. Complete genome sequence of the grouper iridovirus and comparison of genomic organization with those of other iridoviruses. Journal of Virology, 79: 2010-2023.

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。

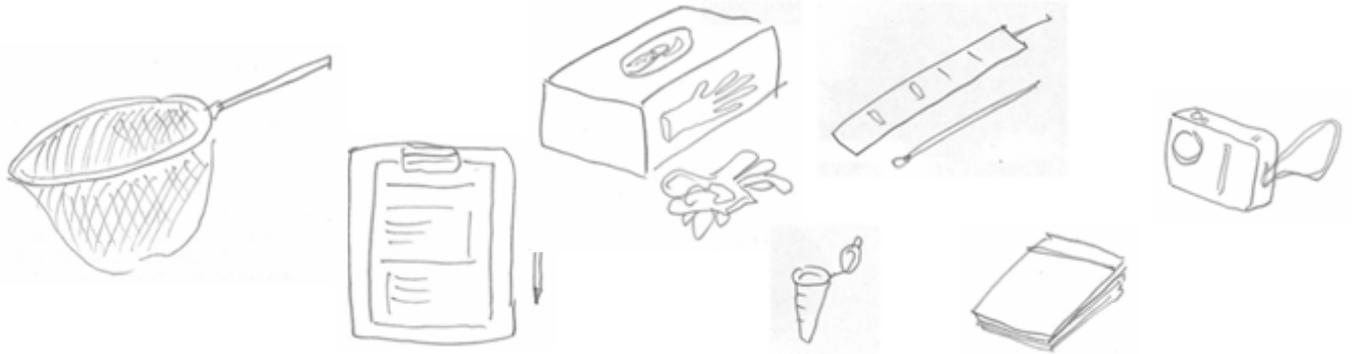
2. 調査器具等

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く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。

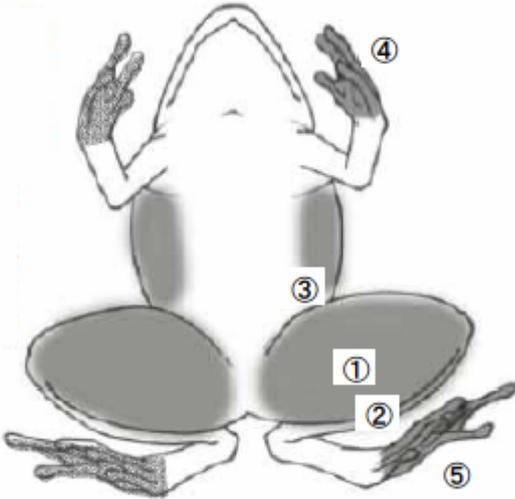
◆サンプルの採取

◇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から（イヌの糞を拾うのと同じ）、綿棒を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いいでしょう

◇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に、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見えるように

◆サンプル採取・写真撮影後

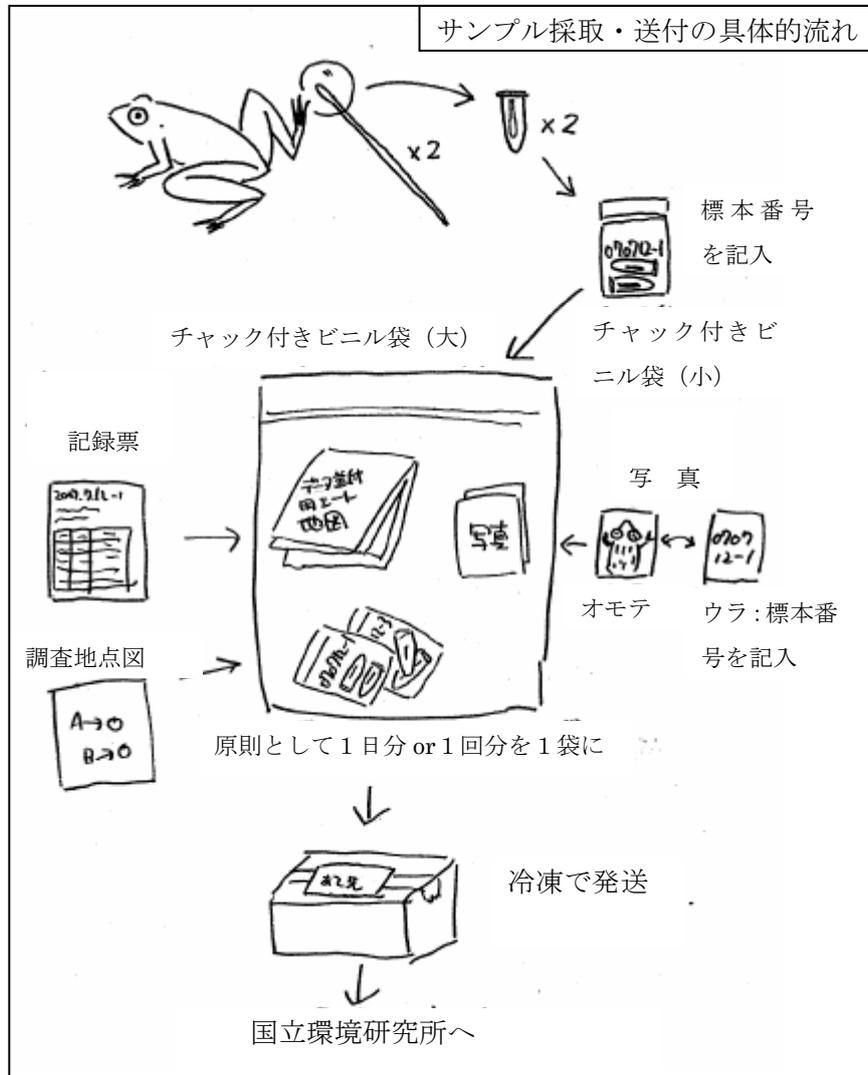
◇全て終了したら捕獲地点で両生類を速やかに放します。

◇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をお使いく

- 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。
 - ◇帰所後、発送するまでの間、サンプルは冷蔵庫の冷凍室で保管してください（冷蔵ではなく冷凍）。



◆記録票等の記入

◆記録票

- ◇調査日、調査者を記入してください
- ◇添付する調査地点図（後述）の地形図の図幅名、縮尺を記入してください
- ◇標本番号

1匹の両生類に1つの番号を付けます。同一日の通し番号とします。番号の付け方は「日付部分6桁-個体の通し番号」とし、例えば、2007年7月12日の5番目に採取した個体に対する番号は070712-5として記載します。

- ◇種名：わかれば記載してください。わからなければ空白で結構ですが、写真を確実にお送りください。

◇採集場所：

採取場所については調査地点Aなどとし、必ず調査地点図（後述）と対応するようにしてくだ

さい。

採取した市町村名を記載してください。

わかればその場所の通称などをご記入ください（〇〇池など）

◇写真の有無：写真を撮影した個体ができるようにして下さい。

記録票(例)

調査日：2007年 7月12日

調査者 〇〇 〇〇、〇〇 〇〇

地形図名 2.5万分の1 東京首部

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20年度

カエルツボカビ実態把握調査検討業務報告書

平成21年3月

環境省自然環境局 野生生物課

請負者：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

古紙配合率 100%、白色度 70%の用紙を使用しています。