

平成21年度

カエルツボカビ等実態把握調査検討業務

報告書

平成22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、オーストラリアや中南米などの地域でカエル等の個体数を減少させるなど、世界の両生類の減少の要因の一つと考えられており、平成20年にOIE（国際獣疫事務局）の対象疾病にもリストアップされた。我が国では、平成18年末に初めて両生類の感染症であるカエルツボカビ症を発症したカエルが確認され、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告がなされた。このため、環境省ではカエルツボカビの分布状況や国内両生類に対する影響について調査を進めてきたところである。

本業務は、カエルツボカビ症等の両生類感染症について、平成20年度までの調査結果において、他の両生類に比して高率でカエルツボカビDNAが検出されているウシガエル等を中心に、両生類へのカエルツボカビ菌の感染状況等の調査を行い、国内の分布状況を把握するとともに、ラナウイルス等の感染症についても情報及び基礎資料の収集を行うことを目的とする。

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8名の専門家の方々、並びに、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22年3月  
環境省自然環境局 野生生物課

## 要 約

### ○目的

本業務は、カエルツボカビ症等の両生類感染症について、ウシガエル等を中心に、両生類への感染状況等の調査を行い、国内の分布状況を把握すると共に、ラナウイルス等の感染症についても情報及び基礎資料の収集を行うことを目的として実施した。

### ○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

昨年度までに環境省が実施した野外調査でカエルツボカビDNAが検出されているウシガエル等が確認されている地点を中心に、引き続き陽性個体が見られるかどうかの検証を行った。調査対象としては、これまでの調査で感染率が高いことが判明しているウシガエル、シリケンイモリ、アフリカツメガエルを中心として、その他当該地域に生息する両生類もサンプリングの対象とした。

平成20年度までに陽性個体が確認された35地点のうち、昨年度までと同一地点でサンプルの採取が可能であった18地点からの126サンプルに加え、これら18地点の周辺箇所でもサンプルの採取を試み、合計35地点で18種（亜種を含む）の両生類から175サンプルが採取された。得られたサンプルは、平成21年度カエルツボカビ感染情報収集業務によるPCR検査に供試された結果、陽性とされたものは20サンプル（感染率は $20/175=11.4\%$ ）であった。

陽性個体が見られた種はウシガエルとヌマガエルの2種であった。種ごとの感染率は、ウシガエル51.4%（18個体/35個体）、ヌマガエル10.0%（2個体/20個体）であり、ウシガエルの感染率が高かった。陽性とされた20サンプルの遺伝子配列を見ると、海外で高い病原性を有することが報告されているAタイプが16例、Eタイプが3例、Bd43タイプが1例確認された。

地域ごとの感染率が最も高いのは中国地方の75.0%であり、次いで東北地方の10.2%、近畿地方の4.5%となっていた。

カエルツボカビが検出された全地点において、両生類の不審死は認められなかった。

### ○カエルツボカビ症等の両生類の感染性疾患に関する情報の取りまとめ

#### ①カエルツボカビ症等に関するヒアリング

国内のカエルツボカビ症等に関して、菌類学、病理学、生態学、遺伝学等の専門家8名にヒアリングを実施し、以下のような情報を得た。

- ・カエルツボカビについて、日本では塩基多様度もハプロタイプ数も多く、日本には古い系統が存在すると解釈される。カエルツボカビがアジアの有尾類起源だとすると、それらのいない南米やオーストラリアでパンデミックが起きることはありうる。
- ・日本の両生類は、一部の種を除き、国内で発見されているタイプのカエルツボカビにはかなり強いと言えそうである。

ただし、ストレスがかかった時に発症する可能性もあり、必ずしも安全であるわけではない。

- ・何段階かの濃度の食塩水にカエルツボカビを曝して、一定時間後に生存しているかどうかを確認した。結論として、10%食塩水を10秒間作用させると増殖を抑える効果が得られた。
- ・2008年から2009年にかけて、ラナウイルス感染症によって野生下でウシガエルの幼生が9月から10月初頭に大量に死亡していた。ウシガエルだけが9月に死亡する要因として、幼体が感染に弱いこと、この時期の水温が高いことが想定される。
- ・ラナウイルスについては、宿主域や宿主（カエル）を離れた際の生存期間や動態、有尾類や魚類に対する感染性や病原性などを確認する必要がある。

## ②カエルツボカビ症等に関する文献調査

カエルツボカビ症及びラナウイルス症等の感染性疾患及びこれらに係る消毒等の対策方法について、国内外の学術論文等の文献を収集し取りまとめた。合計19編の論文、ウェブサイト等の情報を得た。

## 英文要約

### Chytridiomycosis in Japan: A status report for 2009 and 2010 Executive Summary

#### ○Objective

This project was undertaken with the objective of surveying the current status of proliferation of Chytridiomycosis and other infectious diseases among amphibians, focusing chiefly on the bullfrog *Rana catesbeiana*. We aim to determine the distribution of such diseases in Japan, and collect information and basic data with regard to infectious diseases such as Ranavirus.

#### ○Investigation of amphibians potentially susceptible to Chytridiomycosis infection

The investigation was conducted around sites where *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) DNA had been detected in bullfrogs and other species in the field surveys performed by the Ministry of the Environment until the last fiscal year. We investigated whether *Bd* DNA-positive individuals could still be found in these areas. The main subjects of our survey were bullfrogs, sword tailed newts (*Cynops ensicauda*), and African clawed toads (*Xenopus laevis*), which had been found in past surveys to have high rates of infection. Other species of amphibians inhabiting the surveyed regions were also sampled.

Of the 35 sites where *Bd*-positive individuals had been found in surveys conducted up until fiscal 2008, we were able to obtain samples at the same geographic point from 18 sites (126 samples). We also attempted to collect additional samples in the vicinity of the abovementioned 18 sites, and successfully collected 175 samples from 18 species (including subspecies) of amphibians at a total of 35 sites. The obtained samples were subjected to PCR tests performed as a part of the Fiscal 2009 Chytridiomycosis infection information gathering project, of which 20 were found to be positive (infection rate: 20/175=11.4%).

*Bd*-positive individuals were observed in two species, viz. the bullfrog and Indian rice frog (*Fejervarya limnocharis*). The bullfrog exhibited a higher rate of infection (51.4%; 18 out of 35 individuals) than the Indian rice frog (10.0%; 2 out of 20 individuals). Analysis of gene sequences of 20 samples found to be positive revealed 16 cases of Type A, reported to be highly pathogenic in studies overseas, three cases of Type E, and one case of Type Bd43.

The Chugoku Region exhibited the highest region-specific infection rate at 75.0%, followed by the Tohoku Region at 10.2% and the Kinki Region at 4.5%. No suspicious cases of amphibian death were observed at any of the sites where Chytridiomycosis was detected.

○ Summary of information concerning infectious diseases in amphibians including Chytridiomycosis

(1) Interview survey on Chytridiomycosis, etc.

We conducted an interview survey with eight experts in mycology, pathology, ecology, genetics, and other fields, with respect to domestic cases of Chytridiomycosis, etc. and obtained the following information:

- *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) found in Japan is highly diverse in terms of basicity and the number of haplotypes. It is inferred that old strains of *Bd* exist in Japan. Supposing that Chytridiomycosis had originated in urodele in Asia, it is possible for a pandemic to occur in South America and Australia, which are uninhabited by Asian urodele.
- It could safely be said that Japanese amphibians, with the exception of certain species, are quite resistant to domestically detected types of *Bd*. They are not always immune from infection, however, since they may develop Chytridiomycosis under conditions of stress.
- *Bd* was exposed to several concentration levels of saline solution to investigate whether it can survive over a set period of time. The study revealed that proliferation of *Bd* can be inhibited by exposing it to 10% saline solution for 10 seconds.
- Mass death of bullfrog larvae due to Ranavirus infection was discovered in the wild from September to early October in 2008 and 2009. Possible reasons why only bullfrogs died from Ranavirus in September include the relative susceptibility of bullfrog larvae to Ranavirus and the higher water temperature during this period.
- Ranavirus needs to be investigated for host range, duration of survival, and dynamics during a period when it is away from its host (frogs), as well as its infectivity and virulence for urodele and fish.

(2) Literature search with regard to Chytridiomycosis, etc.

We collected and organized literature from Japan and overseas on infectious diseases such as Chytridiomycosis and Ranavirus infection, and preventive measures associated with such infectious diseases including disinfection. We obtained information from 19 papers in total, website articles, and other sources.

# 目 次

はじめに-----	1
要約-----	2
英文要約-----	4
第1章：調査の背景と目的-----	7
第2章：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-----	9
第3章：カエルツボカビ症等の両生類の感染性疾患に関する情報の取りまとめ-----	24
1. カエルツボカビ症等に関するヒアリング-----	24
2. カエルツボカビ症等に関する文献調査-----	58
引用・参考文献-----	103
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-----	105

## 第1章：調査の背景と目的

平成21年度末に公表が予定されている「生物多様性国家戦略2010」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。

「カエルツボカビについては、その生態系への影響などに係る調査を実施した結果、国内の野外における両生類から多様なDNA配列のカエルツボカビが確認された一方、野外においてカエルツボカビによる両生類の死亡事例は確認できませんでした。これらの結果も含め、非意図的に侵入する外来種の情報について、ホームページなどを通じて公表し、その普及啓発を図っていきます。」

外来種には、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種はいつの間にかわが国に入り込んでいる場合が多く、また導入の経路を確定することが困難であることから、その防除は、意図的に導入された外来種にも増して困難であることが多い。

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おらず、ヒトの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。

両生類の感染症の実態を把握し、その感染経路を推測する上で、これら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。ただし、日本におけるカエルツボカビの場合は、平成19年頃に報道されていた「カエルツボカビは日本産両生類の大量死を引き起こし、生態系の崩壊を招く」とのシナリオとはかなり異なった実態を有している可能性が高い。

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。本種が引き起こすカエルツボカビ症は、中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とされる。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。日本においては、Goka et al. (2009) によって野外及び飼育下の両生類に対する感染実態の解明が進められた。



本業務は、カエルツボカビ症等の両生類感染症について、ウシガエル等を中心に、平成21年度カエルツボカビ感染情報収集業務と連携して国内の野外における両生類の感染状況等の調査に基づき分布状況を把握すること、その他の両生類の感染症を含め、情報及び基礎資料の収集整理を行うことを目的として実施された。

## 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調査

#### (1) これまでの調査成果の概要

環境省では平成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(独)国立環境研究所において解析が進められた。この結果から、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) 国内の両生類におけるカエルツボカビの感染状況

平成19年度は全国の調査地点944地点において採取された48種(亜種を含む：うち4種は国外外来種)5198個体の感染状況の解析を実施し、平成21年2月までにすべてのサンプルの解析が終了した。その結果、5198個体分のサンプルのうち、陽性とされたものは28地点から得られた43サンプル(0.8%)であった。

陽性とされた43サンプルのうち、29サンプルの遺伝子配列が調べられ、DNAデータベースに登録されているAタイプは14サンプル、これとは異なるハプロタイプ(9タイプ)とみられるものが11サンプル、遺伝子配列の解析を試みたものの不明もしくは解析不能であったもの4サンプルとなった。

平成20年度調査では、平成19年度に陽性個体が確認された地点を中心に48地点で354個体分のサンプルを収集し、サンプルの解析を行った。その結果、354個体のサンプルのうち、陽性とされたものは12地点から得られた89個体分のサンプル(25.1%)であった。このうち、平成19年度と同一地点もしくは、隣接した地点でサンプルを採取できたのは10地点、63個体であった。前年度に続いて陽性とされたものは5地点、23個体分のサンプルであった。これより、年を越えて感染が継続する場合があることが明らかになった。

平成19、20年度の調査において、サンプルを採取した種と陽性個体の確認された種の一覧を**表2-1**に示した。

#### 2) 両生類の種ごとの感染状況

平成19年度及び20年度調査で採取されたサンプルのうち、100個体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、シリケンイモリ29.6%(66個体/223個体中)、ニホンアマガエル0.1%(1個体/700個体中)、トノサマガエル0.3%(2個体/656個体中)、トウキョウダルマガエル1.6%(3個体/188個体中)、ヌマガエル0.4%(4個体/987個体中)、ウシガエル19.4%(43個体/222個体中)、ツチガエル0.6%(2個体/346個体中)及びリュウキュウカジガエル0.1%(1個体/702個体中)となっていた。従って、在来のカエル類では陽性個体はいずれも4個体以下で、感染率も最大で1.6%であったが、外来種であるウシガエル及び南西諸島に生息する在来有尾類であるシリケンイモリの感染率が高かった。解析個体数が少ない種については、オオサンショウウオ23個体中2個体、アフリカツメガエル24個体中7個体がそれぞれ陽性とされ、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た。

表2-1 サンプル採取種と陽性確認種一覧（平成19・20年度）

種名	H19年度採取		H20年度採取	
	採取個体の有無	陽性個体の有無	採取個体の有無	陽性個体の有無
カスミサンショウウオ	○		○	
トウホクサンショウウオ	○		○	
ハクバサンショウウオ	○			
ヒダサンショウウオ	○		○	
クロサンショウウオ	○			
エゾサンショウウオ	○			
ブチサンショウウオ	○			
キタサンショウウオ	○			
ハコネサンショウウオ	○		○	
オオサンショウウオ	○	○		
アカハライモリ	○		○	
シリケンイモリ	○	○	○	○
ニホンヒキガエル	○			
アズマヒキガエル	○		○	
ナガレヒキガエル	○			
オオヒキガエル	○			
ニホンアマガエル	○	○	○	
ハロウエルアマガエル	○			
ツシマアカガエル	○			
タゴガエル	○		○	
ヤクシマタゴガエル	○			
ニホンアカガエル	○		○	
ヤマアカガエル	○		○	
エゾアカガエル	○			
トノサマガエル	○	○	○	
ナゴヤダルマガエル	○			
トウキョウダルマガエル	○	○	○	
ヌマガエル	○	○	○	○
サキシマヌマガエル	○			
ウシガエル	○	○	○	○
ツチガエル	○	○	○	
ハナサキガエル	○			
ナミエガエル	○		○	
イシカワガエル	○			
オットンガエル	○			
ホルストガエル	○			
シュレーゲルアオガエル	○		○	
モリアオガエル	○			
オキナワアオガエル	○			
アマミアオガエル	○			
カジカガエル	○		○	
リュウキユウカジカガエル	○		○	○
アイフィンガーガエル	○			
シロアゴガエル	○			
ヒメアマガエル	○			
ナガレタゴガエル	○			
アマミハナサキガエル	○			
アフリカツメガエル	○	○	○	○

### 3) 地域ごとの感染状況

平成19年度の陽性個体は本州、九州及び沖縄を含む南西諸島の28地点から確認された。北海道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、北海道地方を除いて、それぞれ1から6個体の陽性個体が確認されたほか、南西諸島において、13個体とやや多くの陽性個体が確認された。

平成20年度の陽性個体は平成19年度と同様、本州と九州及び沖縄を含む南西諸島の12地点から確認された。北海道と四国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、北海道地方と東北地方、四国地方を除いて、それぞれ2から12個体の陽性個体が確認されたほか、南西諸島において、54個体と多くの陽性個体が確認された。これは沖縄県の2地点で採集された54個体のシリケンイモリのうち、47個体が陽性個体であったことため、陽性個体数が多くなったものである。

#### (2) 目的

上記の調査結果を踏まえ、平成21年度は以下の目的でカエルツボカビの国内分布状況等を把握した。

- 1) 平成19年度及び20年度にカエルツボカビのDNAが確認された地点・種を中心に、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) 解析の流れ

解析は「野外におけるスワブサンプルの採取」、「PCR検査」及び「得られたデータに関する地域毎・種毎の考察」より行われる。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PCR検査により、カエルツボカビのDNAが含まれていないかどうかを確認する。ただし、PCR検査については平成21年度カエルツボカビ感染情報収集業務により実施された。本稿ではその手法も含め、流れを概説する。

##### 2) 野外におけるスワブサンプル採取の手法

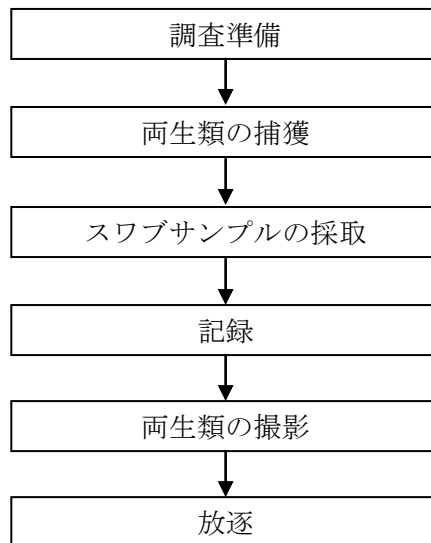
スワブサンプルの採取は、下記の方法で行った。

###### 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、調査票、調査を実施していただきたい場所（これまでの調査でカエルツボカビのDNAが検出されている地点）周辺の地図を送付した。その他、調査協力者には各自で網、長靴、携帯用クーラーボックス、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、調査票、調査地点図、写真をセットにしてクール便の冷凍（-18℃）で（独）国立環境研究所宛に送付した。

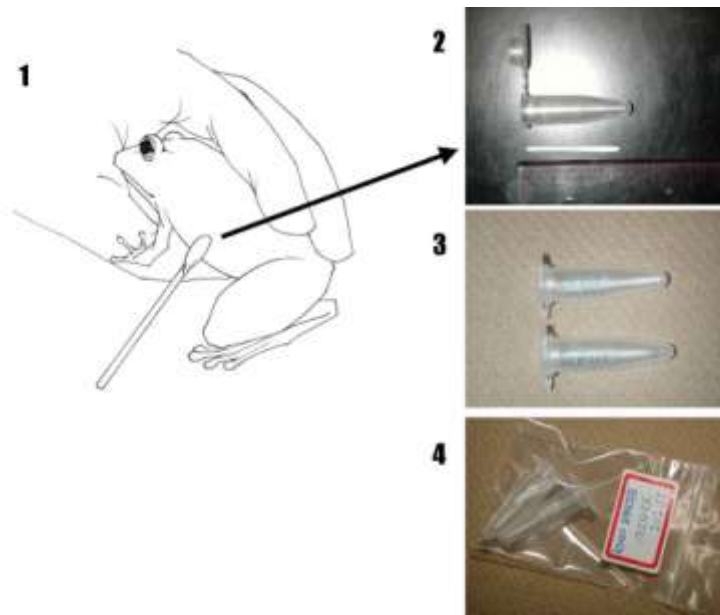


図2-2 綿棒によるスワブサンプルの採材・保管方法

1. 綿棒の先でカエル個体の表面をぬぐい取る（2本）。
2. マイクロチューブに綿棒を1本ずつ入れる。
3. チューブに収まるように綿棒の先端から3.5cm付近で柄を切り離し、蓋を締める。
4. チューブの側面に油性マジックで標本番号を記入する
5. 個別別にチューブ（2本）をチャック式ビニール袋（小）に入れる。
6. ビニール袋にチューブと同様に油性マジックで標本番号を記入し、冷凍保管する。

### ③両生類の死体の取扱いについて

一箇所ですべて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実態把握調査実施要綱」を**巻末資料1**に示した。野外サンプルの採取には合計15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2-2**）及び調査地点図（**図2-3**；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 - 2 野外調査における記録票の例

記録票(例)

調査者 ○○ ○○、○○ ○○

標本番号	種名 (わかれば)	調査年月日	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
090912-1	アマガエル	2009. 9. 12	調査地点A 東京都千代田区 日比谷公園内	あり	
090912-2		2009. 9. 12	〃	あり	
090912-3		2009. 9. 12	〃	あり	
090912-4	アマガエル	2009. 9. 12	〃		種名が不明の場合は空欄でも結構です
090912-5	〃	2009. 9. 12	〃		
090912-6	アズマヒキガエル	2009. 9. 12	調査地点B 東京都千代田区 日比谷公園内		



図 2 - 3 調査地点図の例

#### 4) PCR検査

PCR検査は(独)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平成21年度カエルツボカビ感染情報収集業務により実施されたが、要約すると、概ね次の通りである。

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)。

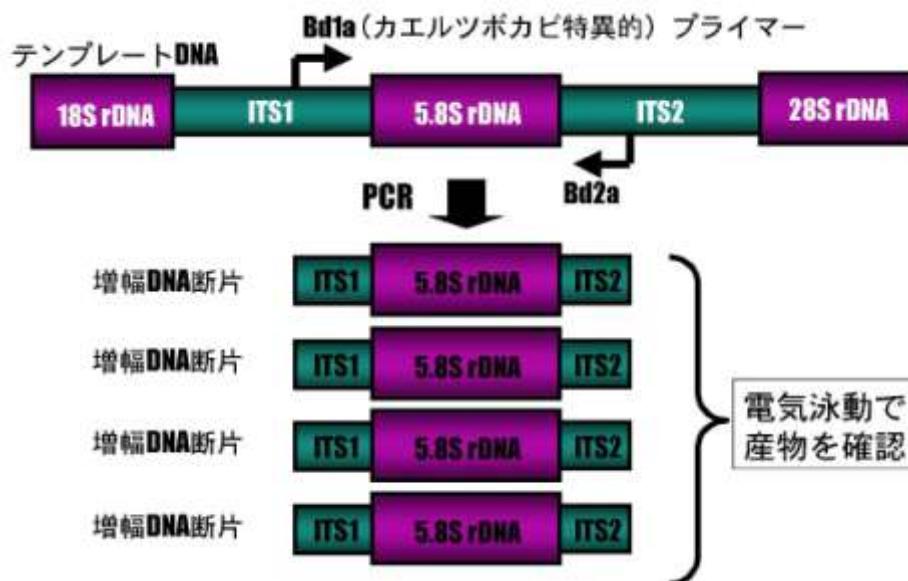


図2-4 1次PCRによるカエルツボカビDNAのITS領域合成の原理



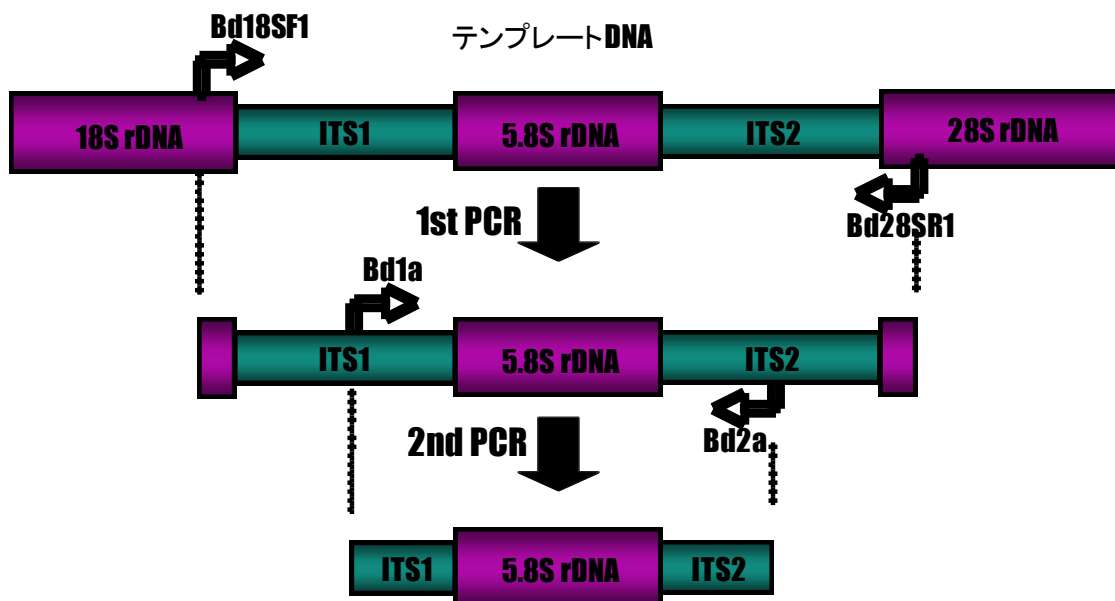


図 2 - 5 2次PCRによるカエルツボカビDNAのITS領域合成の原理

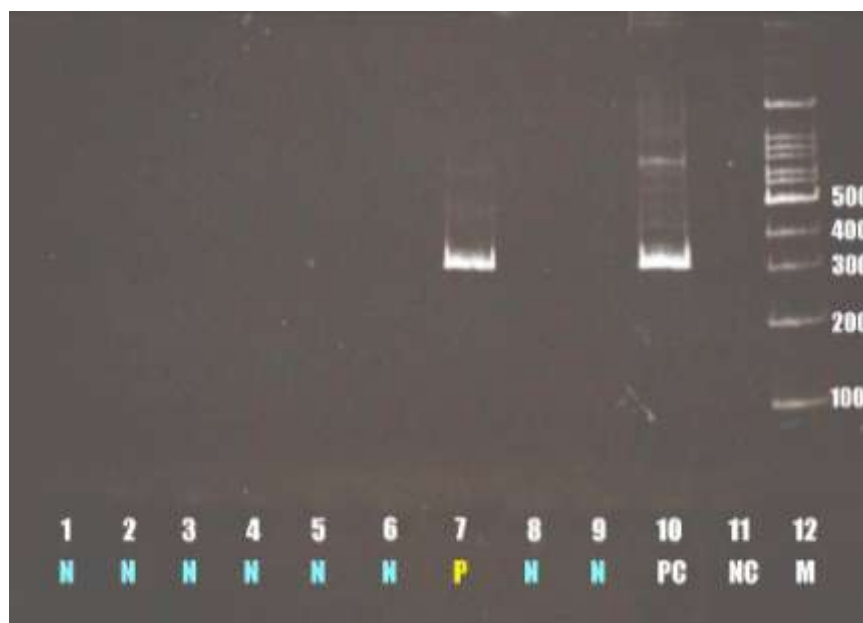


図 2 - 6 ゲノムPCR法による検査結果の一例

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**）。

カエルツボカビ感染情報収集業務では、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。

#### 5) 得られたデータに関する地域毎・種毎の考察

平成21年度カエルツボカビ感染情報収集業務により得られたデータを基に、本業務では国内の野外両生類個体におけるカエルツボカビに焦点をあて、スワブサンプルを採取するための現地調査で得られた知見も併せ、地域毎及び種毎の感染状況やそれによる被害の有無について分析・考察した。

### (4) 結果及び考察

#### 1) サンプル採取地点とサンプル数

平成21年度は、前年度までの調査で陽性個体が確認された地点を中心にサンプルを採取し、カエルツボカビへの感染状況を調査した。種別のサンプル採取地点数とサンプル数を**表2-3**に、地方ブロックごとのサンプル採取地点数とサンプル数を**表2-4**に示した。それぞれ、サンプル採取場所を同一の（平成19年度及び20年度調査で陽性個体が確認された地点並びにそこにごく隣接した）18地点と、これら18地点の周辺地点とに分けてまとめた。

種別では合計18種（亜種を含む）の両生類からサンプルが採取された。最も多くの個体が得られた種はウシガエルとアフリカツメガエルの29個体で、全サンプルのそれぞれ17.5%を占めていた。次いで、ニホンアマガエル（21個体・12.7%）、ヌマガエル（20個体・12.0%）、ニホンアカガエル（13個体・7.8%）の順であった。

地方ブロック別では、前年度までの調査で陽性個体が確認された本州から沖縄の計35地点のうち、同一地点としてサンプルの採取が可能であったのは18地点からの126サンプルであった。周辺地点で実施したものを併せて35地点から175サンプルを採取した。

表2-3 両生類の種ごとのサンプル採取地点数と採取サンプル数

種名	サンプル数 (割合 (%))		
	同一地点	周辺地点	計
カスミサンショウウオ	1 ( 0.8)	1 ( 2.0)	2 ( 1.1)
アカハライモリ	0 ( 0.0)	2 ( 4.1)	2 ( 1.1)
シリケンイモリ	12 ( 9.5)	0 ( 0.0)	12 ( 6.9)
アズマヒキガエル	1 ( 0.8)	0 ( 0.0)	1 ( 0.6)
ナガレヒキガエル	0 ( 0.0)	2 ( 4.1)	2 ( 1.1)
ニホンアマガエル	18 ( 14.3)	3 ( 6.1)	21 ( 12.0)
タゴガエル	6 ( 4.8)	1 ( 2.0)	7 ( 4.0)
ニホンアカガエル	13 ( 10.3)	0 ( 0.0)	13 ( 7.4)
ヤマアカガエル	4 ( 3.2)	1 ( 2.0)	5 ( 2.9)
トノサマガエル	5 ( 4.0)	0 ( 0.0)	5 ( 2.9)
トウキョウダルマガエル	10 ( 7.9)	0 ( 0.0)	10 ( 5.7)
ヌマガエル	14 ( 11.1)	6 ( 12.2)	20 ( 11.4)
ウシガエル	30 ( 23.8)	5 ( 10.2)	35 ( 20.0)
ツチガエル	5 ( 4.0)	1 ( 2.0)	6 ( 3.4)
シュレーゲルアオガエル	0 ( 0.0)	1 ( 2.0)	1 ( 0.6)
カジカガエル	1 ( 0.8)	0 ( 0.0)	1 ( 0.6)
リュウキュウカジカガエル	3 ( 2.4)	0 ( 0.0)	3 ( 1.7)
アフリカツメガエル	3 ( 2.4)	26 ( 53.1)	29 ( 16.6)
合 計	126 (100.0)	49 (100.0)	175 (100.0)

同一地点とは、平成20年度までに陽性個体が確認された地点を示す

( ) 内の数字は割合を示す

表2-4 地方ブロックごとのサンプル採取地点数と採取サンプル数

地方ブロック	採集地点 (サンプル数)		
	同一地点	周辺地点	計
北海道	0 ( 0)	0 ( 0)	0 ( 0)
東北	6 ( 49)	0 ( 0)	6 ( 49)
関東	4 ( 22)	10 ( 29)	14 ( 51)
中部	1 ( 15)	0 ( 0)	1 ( 15)
近畿	1 ( 12)	5 ( 10)	6 ( 22)
中国	1 ( 6)	2 ( 10)	3 ( 16)
四国	0 ( 0)	0 ( 0)	0 ( 0)
九州 (南西諸島のぞく)	1 ( 2)	0 ( 0)	1 ( 2)
九州 (南西諸島) ・沖縄	4 ( 20)	0 ( 0)	4 ( 20)
合 計	18 (126)	17 ( 49)	35 (175)

同一地点とは、平成20年度までに陽性個体が確認された地点を示す

( ) 内の数字は採取サンプル数を示す

## 2) カエルツボカビの感染状況

収集されたサンプルは、(独) 国立環境研究所においてPCR検査に供された。

陽性とされたものは20サンプル (同一地点14サンプル、周辺地点6サンプル) で、解析したサンプルの11.4% (同一地点11.1%、周辺地点12.2%) を占めた。今年度のサン

プル採取は、昨年度調査と同様にこれまでに陽性個体の確認された地点を中心に調査を実施したため、陽性個体率は比較的高い値となった。

陽性とされた20サンプルの遺伝子配列では、DNAデータベースに登録されているもの(Aタイプ)が16例確認された。また、AタイプのほかにはEタイプが3例、Bd43タイプが1例確認された。

### 3) 両生類の種ごとの感染状況

種ごとの感染状況を表2-5に示した。ヌマガエル、ウシガエルの2種のみで陽性反応が見られた。種ごとの感染率は、ウシガエル51.4% (18個体/35個体中)、ヌマガエル10.0% (2個体/20個体中) となっており、特にウシガエルの陽性個体率が高かった。なお、これまでに高い感染率が確認されているシリケンイモリ及びアフリカツメガエルについて、本年度は感染個体が見られなかった。

表2-5 両生類の種ごとの同一地点・周辺地点別の陽性個体率

種名	サンプル数 (陽性個体数)			陽性個体率 (%)		
	同一地点	周辺地点	計	同一地点	周辺地点	計
カスミサンショウウオ	1 (0)	1 (0)	2 (0)	0.0	0.0	0.0
アカハライモリ	0 (0)	2 (0)	2 (0)	0.0	0.0	0.0
シリケンイモリ	12 (0)	0 (0)	12 (0)	0.0	0.0	0.0
アズマヒキガエル	1 (0)	0 (0)	1 (0)	0.0	0.0	0.0
ナガレヒキガエル	0 (0)	2 (0)	2 (0)	0.0	0.0	0.0
ニホンアマガエル	18 (0)	3 (0)	21 (0)	0.0	0.0	0.0
タゴガエル	6 (0)	1 (0)	7 (0)	0.0	0.0	0.0
ニホンアカガエル	13 (0)	0 (0)	13 (0)	0.0	0.0	0.0
ヤマアカガエル	4 (0)	1 (0)	5 (0)	0.0	0.0	0.0
トノサマガエル	5 (0)	0 (0)	5 (0)	0.0	0.0	0.0
トウキョウダルマガエル	10 (0)	0 (0)	10 (0)	0.0	0.0	0.0
ヌマガエル	14 (1)	6 (1)	20 (2)	7.1	16.7	10.0
ウシガエル	30 (13)	5 (5)	35 (18)	43.3	100.0	51.4
ツチガエル	5 (0)	1 (0)	6 (0)	0.0	0.0	0.0
シュレーゲルアオガエル	0 (0)	1 (0)	1 (0)	0.0	0.0	0.0
カジカガエル	1 (0)	0 (0)	1 (0)	0.0	0.0	0.0
リュウキュウカジカガエル	3 (0)	0 (0)	3 (0)	0.0	0.0	0.0
アフリカツメガエル	3 (0)	26 (0)	29 (0)	0.0	0.0	0.0
合計	126 (14)	49 (6)	175 (20)	11.1	12.2	11.4

同一地点とは、平成20年度までに陽性個体が確認された地点を示す

( ) 内の数字は陽性個体数を示す

### 4) 地域ごとの感染状況

地方ブロック別の感染状況を表2-6に示した。陽性個体は東北地方、関東地方、近畿地方、中国地方から確認された。両生類の種をまとめて地域ごとの陽性個体および感染個体率をみると、中国地方において12個体と最も陽性個体数が多かった。次いで東北地方が5個体、関東地方が2個体、近畿地方が1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個体数の割合が最も高いのは中国地方75.0%であり、次いで東北地方の10.2%、近畿地方の4.5%、関東地方の3.9%であった。中国地方(ただし、周辺

地点として陽性個体が確認された場所は、これまでに陽性個体が確認された場所と水系がつながっている)を除いて、陽性個体はこれまでに感染個体の確認された同一地点において確認されていた。これより、過去に感染個体の確認された地域では引き続きカエルツボカビが高密度で生育し、継続的に両生類に感染していることが示唆された。ただしこの場合でも、感染した種(ウシガエル)が当該地点から消滅することはなかった。

表2-6 地方ブロックごとの同一地点・周辺地点別の陽性個体率

地方ブロック	サンプル数 (陽性個体数)			陽性個体率 (%)		
	同一地点	周辺地点	計	同一地点	周辺地点	計
北海道	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0.0	0.0	0.0
東北	49 (5)	0 (0)	49 (5)	10.2	0.0	10.2
関東	22 (2)	29 (0)	51 (2)	9.1	0.0	3.9
中部	15 (0)	0 (0)	15 (0)	0.0	0.0	0.0
近畿	12 (1)	10 (0)	22 (1)	8.3	0.0	4.5
中国	6 (6)	10 (6)	16 (12)	100.0	60.0	75.0
四国	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0.0	0.0	0.0
九州 (南西諸島のぞく)	2 (0)	0 (0)	2 (0)	0.0	0.0	0.0
九州 (南西諸島)・沖縄	20 (0)	0 (0)	20 (0)	0.0	0.0	0.0
合計	126 (14)	49 (6)	175 (20)	11.1	12.2	11.4

同一地点とは、平成20年度までに陽性個体が確認された地点を示す  
( )内の数字は陽性個体数を示す

#### 5) 両生類の不審死の有無

カエルツボカビ感染実態把握調査実施要綱(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っていただくよう記載した。各地域の専門家等によって合計33地点でサンプルの採取と両生類の生息状況の観察が実施された。

その結果、昨年度までに引き続き、今年度の調査においても両生類の不審死や大量死といった報告はなされなかった。

## 2. カエルツボカビ感染率の高い可能性のある両生類の調査

### (1) 背景と目的

これまでの調査において、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疑われていること、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と思われる。また、シリケンイモリは、我が国固有の両生類の分布が集中する地域である南西諸島に分布することから、今後、野外における感染状況を把握することは重要である。

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

今年度、陽性とされた20サンプルについて、カエルツボカビの遺伝子型ごとの分布状況をとりまとめた。

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

シリケンイモリ、ウシガエル、アフリカツメガエル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) 結果及び考察

1) カエルツボカビの遺伝子型ごとの分布状況

陽性とされた20サンプルの遺伝子配列を解析した結果、Aタイプだったものが16例と最も多く、次いでEタイプが3例、Bd43タイプが1例確認された。確認された遺伝子型について、地方ブロック別、種類別の遺伝子型分布状況を表2-7に示した。

Aタイプは、カエルツボカビの陽性個体が捕獲された全地方ブロック（4地方ブロック）で確認された。Eタイプは東北地方と中国地方から確認されており、それぞれAタイプと同所で捕獲された個体（ウシガエル）から確認された。Bd43タイプは関東地方の1例のみの確認であった。これらの結果、遺伝子型は、主にAタイプのものが広く分布し、Eタイプといった別の遺伝子型のものも同所的に見られる場合もある。また、Bd43タイプといった遺伝子型が見られるなど、複数の遺伝子型が存在していた。

表2-7 地方ブロック別、種類別の遺伝子型分布状況

地方ブロック	ウシガエル			ヌマガエル
	Aタイプ	Eタイプ	Bd43タイプ	Aタイプ
東北	4	1		
関東	1		1	
近畿				1
中国	9	2		1
合計	14	3	1	2

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

シリケンイモリ、ウシガエル、アフリカツメガエルのそれぞれについて、年度別地方ブロックごとのサンプル数および陽性個体数、陽性個体率を表2-8～表2-10にまとめた。最もサンプル数が多いのはウシガエルであり、全地方ブロックでサンプルが採取されている。アフリカツメガエルについては関東、中部及び近畿についてサンプルを採

取することができた。シリケンイモリについては、地方ブロックを九州（南西諸島）と沖縄地方に分けて取りまとめを行った。

### ①シリケンイモリ

シリケンイモリは、九州（南西諸島）でも陽性個体が確認されているものの、沖縄地方（沖縄島）で採取されたサンプルに高確率で陽性個体が確認されていた。しかし、平成21年度の調査では陽性個体が確認されなかった。この理由として、今年度採取・分析されたサンプル数が少なかった点が考えられる。

表2-8 シリケンイモリの年度別・地方ブロック別のサンプル数および感染個体数と率

地方ブロック	サンプル数 (陽性個体数)				陽性個体率 (%)			
	H19年度	H20年度	H21年度	計	H19年度	H20年度	H21年度	計
九州（南西諸島）	29 (0)	105 (6)	5 (0)	139 (6)	0.0	5.7	0.0	4.3
沖縄	35 (13)	54 (47)	7 (0)	96 (60)	37.1	0.0	0.0	62.5
合計	64 (13)	159 (53)	12 (0)	235 (66)	20.3	33.3	0.0	28.1

( ) 内の数字は陽性個体数を示す

### ②ウシガエル

ウシガエルは、平成19年度の調査において、全地方ブロックでサンプルが採集された。そのうち、サンプル数が3もしくは4個体と少なかった北海道地方、四国地方、九州（南西諸島）及び沖縄地方を除いた残りの地方ブロックにおいて、陽性個体が確認された。平成20年度及び21年度は、これまでに感染個体の確認された地点を中心にサンプルを収集したこともあり、採取したサンプルに対し、40.0%～100.0%の高い確率で陽性個体が確認された。

表2-9 ウシガエルの年度別・地方ブロック別のサンプル数および感染個体数と率

地方ブロック	サンプル数 (陽性個体数)				陽性個体率 (%)			
	H19年度	H20年度	H21年度	計	H19年度	H20年度	H21年度	計
北海道	3 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (0)	0.0	0.0	0.0	0.0
東北	28 (3)	5 (0)	10 (5)	43 (8)	10.7	0.0	50.0	18.6
関東	14 (1)	13 (11)	4 (2)	31 (14)	7.1	84.6	50.0	45.2
中部	72 (4)	5 (2)	4 (0)	81 (6)	5.6	40.0	0.0	7.4
近畿	8 (2)	4 (2)	0 (0)	12 (4)	25.0	50.0	0.0	33.3
中国	18 (2)	10 (8)	11 (11)	39 (21)	11.1	80.0	100.0	53.8
四国	3 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (0)	0.0	0.0	0.0	0.0
九州（南西諸島のぞく）	28 (2)	7 (6)	0 (0)	35 (8)	7.1	85.7	0.0	22.9
九州（南西諸島）・沖縄	4 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (0)	0.0	0.0	0.0	0.0
合計	178 (14)	44 (29)	29 (18)	251 (61)	7.9	65.9	62.1	24.3

( ) 内の数字は陽性個体数を示す

③アフリカツメガエル

アフリカツメガエルは、平成19年度の調査において、中部地方と近畿地方からそれぞれ少数のサンプル（5個体と6個体）が採取された。このうち近畿地方で採取したサンプルに陽性個体が確認された。平成20年度は新たに関東地方よりサンプルが採取され、陽性個体が確認された。このように、昨年度までは本種のサンプル数が少なかつたにもかかわらず、陽性個体が確認される率の高い傾向が見られた。しかし、平成21年度の調査では、サンプル数の多かつた関東地方や2年続けて陽性個体が確認されていた近畿地方においても陽性個体が確認されなかつた。この理由として、アフリカツメガエルのサンプル採取地点が1地点に偏っており、かつ若齢と思われる小型個体が多かつた点が考えられる。

表2-10 アフリカツメガエルの年度別・地方ブロック別のサンプル数および感染個体数と率

地方ブロック	サンプル数 (陽性個体数)				陽性個体率 (%)			
	H19年度	H20年度	H21年度	計	H19年度	H20年度	H21年度	計
関東	0 (0)	3 (1)	26 (0)	29 (1)	0.0	33.3	0.0	3.4
中部	5 (0)	0 (0)	0 (0)	5 (0)	0.0	0.0	0.0	0.0
近畿	6 (2)	10 (4)	3 (0)	19 (6)	33.3	40.0	0.0	31.6
合計	11 (2)	13 (5)	29 (0)	53 (7)	18.2	38.5	0.0	13.2

( ) 内の数字は陽性個体数を示す



## 第3章：カエルツボカビ症等の両生類の感染性疾患に関する情報の 取りまとめ

### 1. カエルツボカビ症等に関するヒアリングの概要

#### (1) ヒアリング対象者と項目

ここでは、病理学、遺伝学、生態学、系統分類学、動物地理学等の観点からカエルツボカビまたは両生類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。

ヒアリング対象とした有識者の方々は次の8名である。

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職員  
宇根有美 麻布大学獣医学部准教授  
太田英利 兵庫県立大学 自然・環境科学研究所教授  
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  
平良眞規 東京大学大学院理学系研究科准教授  
福山欣司 慶応義塾大学経済学部准教授  
松井久実 麻布大学獣医学部講師

ヒアリングの項目は個々の専門家によって多少異なるが、概ね次の通りとして、応じられる範囲でのコメントをいただいた。

#### ①最新の知見に基づくカエルツボカビ生物学的特性

- ・ Goka et al. (2009) に掲載されているデータの意味と解釈  
(特に、さまざまなハプロタイプが存在することについて)
- ・ 病原性との関連について示唆されること
- ・ さらに解明すべき点
- ・ カエルツボカビ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
- ・ カエルツボカビの感染実験について
- ・ 各研究機関における今後のカエルツボカビの調査研究の予定

#### ②ラナウイルスの生物学的特性

- ・ 最新の知見に基づくラナウイルスの生物学的特性
- ・ 日本国内における感染状況
- ・ 諸外国 (アメリカ合衆国、台湾など) との比較、対処
- ・ 感染実験について
- ・ 各研究機関における今後のラナウイルスの調査研究の予定

### ③その他の両生類等の感染症について

- ・ カエルツボカビ、ラナウイルス以外の特筆される感染症に係る情報

### ④各地で実施されているカエルツボカビなどの対策の実態

- ・ 日本各地のフィールドワーカーによる取組、現在実施されていること
- ・ 研究者、愛好家、自然保護団体などの現在の認識と今後の情報収集
- ・ 日本ツメガエル研究集会・ツボカビ対策委員会の情報収集と見解

### ⑤カエルツボカビ・ラナウイルスなどの対処として今後実施すべきこと

- ・ 技術的な対策（消毒方法、疫学的対処など）
- ・ 実態解明と技術的な課題
- ・ 今後構築すべき体制など
- ・ 野生生物感染症など「見えない外来生物」の捉え方

## (2) ヒアリング結果の概要

### 1) カエルツボカビの生物学的特性について

- ・ カエルツボカビは非常に変わっている菌類で、関係する ITS 領域がバラエティに富んでいる印象がある。さらなる遺伝子構造の解析が必要である。ツボカビの遺伝子構造は単相(n)が通常だが、カエルツボカビでは $2n$ の状態(複相)になっている可能性がある。同じ菌株で違う遺伝子型が出る。
- ・ また、遺伝子型(タイプ)と病原性との関連を解明する必要がある。病原性の強い対立遺伝子及び弱い対立遺伝子をヘテロで持っている可能性もあるのではないか。DNA上にITS領域を複数持っていて、違うタイプを拾っているという可能性もある。
- ・ 遺伝子型と宿主との関係も今のところはっきりしない。ウシガエルから得られたカエルツボカビの多様性に関して、日本産の両生類から感染したものという解釈については、感染源となる日本産の両生類からカエルツボカビがほとんど得られていないことから、無理がある。
- ・ カエルツボカビの系統が、宿主とする両生類とどういう関係にあるのかよくわからない。オオサンショウウオのツボカビは在来だとしても、他のツボカビは在来を裏付けるデータはない。
- ・ カエルツボカビについては基礎的な生物学的情報が皆無なので、形態から遊走子が単相か複相かを判断するのは難しいだろう。経費がかかっても、カエルツボカビの全ゲノム配列を解読するのが理想だ。ただ、かなりの時間を要するであろう。
- ・ ウシガエルから検出されたカエルツボカビの遺伝的多様性が高いことには注目すべきである。一般的には、ある宿主種から見つかる病原体の遺伝的多様性が高い場合、その種を病原体の本来の宿主種、あるいは長時間宿主として機能してきた種と考えるのが一般的である。したがって、ウシガエルの扱いについては、今後、さらに慎重に議論していくべきである。
- ・ カエルツボカビについて、日本では海外に比べて塩基多様度もハプロタイプ数も圧倒的に多い。日本には古い系統が存在すると解釈される。日本には相当数のツボカ

ビがいて、分化もしているし、オオサンショウウオにはかなり昔から感染していたらしいことを考え、日本起源説を提唱した。

- ・ (上記の説への反論として)オオサンショウウオから見つかったタイプは別として、カエルツボカビが必ずしも日本起源とは言えないのではないか。このことを確定的に言うためには、朝鮮半島をはじめとする大陸温帯部- 亜熱帯部における詳細な調査が必要であろう。
- ・ 有尾両生類の多様性が高い北米で、カエルツボカビによる大量死の事例が少ないのは、そこに分布する種がある程度の耐性を備えているためではないか。カエルツボカビは日本固有というよりは、ローレシアに薄く広く分布すると言えそうである。元々いなかった南米やオーストラリアの両生類は耐性を持っておらず、感染すると死亡してしまうのだろう。
- ・ 在来種の中ではシリケンイモリのみが様々なタイプに感染しているが、それはたまたまであり、実際には日本中のカエルがいろいろなタイプが隠し持っているが、その密度が検出限界以下であるため検出できないだけではないか。感染実験では、シリケンイモリからベルツノガエルに簡単に感染する。感染したベルツノガエルは死なないが、成長が悪くなる。
- ・ カエルツボカビがアジアの有尾類起源だとすると、それらのいない南米やオーストラリアでパンデミックが起きることはありうる。

## 2) カエルツボカビの感染実験について

- ・ カエルツボカビ症 (Cタイプ) の外国産カエル類の飼育水を用いた感染実験では、コガタハナサキガエル、ヌマガエル、ヤエヤマハラブチガエルの感染率が高かった。一方で、感染しにくい種も確認された。
- ・ Cタイプの培養株を用い、遊走子の濃度を何段階かに揃えてヌマガエルなどに感染させた実験では、実験の回ごとにカエルツボカビ症で死亡する場合もしない場合もあった。2008年から2009年にかけて合計3回の培養株を用いた感染実験を行い、3回とも結果が異なっていたことから、カエルツボカビ感染の成立には何らかの外的/ 内的要因の関与が考えられる。
- ・ ベルツノガエルと沖縄のシリケンイモリを一緒に飼うと10日で感染して、脱皮が亢進するが、ベルツノガエルは死なない。ただし、成長が阻害され、病原性があることは間違いない。

## 3) カエルツボカビへの対処について

- ・ 日本の両生類は、一部の種を除きカエルツボカビにはかなりの抵抗性を持っていると考えられる。ただし、感染個体は死亡に至らなくても体重減少があり、ストレスがかかった時に致死的に働く可能性もある。必ずしも安全であるわけではない。
- ・ 状況を見ると、今現在、緊急対策措置の必要はないと考える。もともと日本にいて、日本の両生類は何らかの耐性を持っていて、個体数の減少に結び付かないという印象がある。ただ、自然環境が変わると状況が大きく変わる可能性もあるので、今後、この状態が続くかどうかは分からない。予想ができない状況では、最低限の対策は

必要だろう。

- ・ カエルがどういう状態だと感染するのか、どのような感染機序かを調べる必要がある。
- ・ なお、カエルツボカビ症の治療法については概ね確立している。除菌だけでなく、発症してからの治療もある程度は可能である。
- ・ 情報を収集して次の政策に活かす体制がないことは課題である。少なくともラナウイルスとカエルツボカビについてはOIEに登録された疾病で、我が国の窓口は農水省だが、カエルツボカビの検査は環境省、魚類に感染したラナウイルスの検査は水産総合研究所で行っているなど、担当がばらばらである。対応において、それらの部署がいかに効率よく連携できるようにするかが課題であろう。
- ・ 日本、特に沖縄のように、感染症によって種の絶滅がおこる条件が揃っている地域では、実態が分かるまでは警戒するべきという考えから、緊急対策の実施を提言した。同時に、リスク評価を行なうための情報収集の必要性も提言していた。疫学研究を推進させ、その結果を速やかに公開して、対策に活用させるように求めていたが、それが未だできていない。
- ・ 現在も緊急事態宣言が出されたままであるが、ツボカビ症蔓延を過度に心配する必要性がなくなった現在、現状のまま放置しておくのはよくない。新知見を踏まえて、早急にきちんとした情報を公開して説明することが必要である。
- ・ 感染したシリケンイモリが野外から多数発見される一方で、両生類の目立った大量死のない中琉球（奄美諸島、沖縄諸島）では、極度に警戒する必要はないのではないか。一方で、中米などで被害を起こしている A タイプが未だ確認されておらず、しかも感染実験で高い感染率を示す種（コガタハナサキガエル、ヤエヤマハラブチガエル）の産地でもある南琉球（宮古諸島、八重山諸島）では、警戒を継続するべきだ。特に西表島に関しては、外来生物問題の啓発活動の象徴としても、とりわけ厳重な警戒体制を維持してもよいのではないか。
- ・ 昨年から、カエルの飼育水を下水に流してもいいという風潮があるが、この研究を安全宣言とするにはさらにデータを重ね、検証すべきことが残されているように思われる。カエルツボカビは日本でパンデミックを起こさないとしても、個体数の減少につながる可能性がある。
- ・ 現在、進行しているアフリカツメガエルの野生化は生態的影響が問題視されているが、本種が病原体を持っていることも重要視すべきである。可能であれば駆除すべきで、それができなければ、個体の拡散を防ぐ努力が必要である。
- ・ 現状を見る限り、日本のカエルには抵抗性があり、概ね大丈夫だろう。パンデミックが起きるならとっくに起きているはずだ。ただ、特に島嶼部のものについて大丈夫だと言い切れないのが困る。
- ・ 「見えない外来生物」の対策の考え方について、今後、新たな感染症が発生したらどうなるかは分からない。動物の輸送監視、いったん飼い始めたものは野外に放すな、という基本的なところに帰着する。
- ・ カエルツボカビに関するアフリカツメガエル研究会の見解として、これまでの研究結果は、日本国内には多様なカエルツボカビが広範囲において生息している可能性

が極めて高いことを示している。(独)国立環境研究所のホームページにも、日本国内のほぼ全ての両生類が既に耐性を獲得している可能性が高いこと、過去にツメガエルが放流された自然池において、他の両生類の大量死の報告は存在しないこと、が記述されている。少なくとも日本国内では、アフリカツメガエルがカエルツボカビの媒介者となって他の両生類を絶滅させる可能性は極めて低い。今後とも、時期尚早な結果発表や行き過ぎた報道などが研究や教育に大きな被害をもたらすことが無いよう十分注意する必要がある。

- ・ 生物を扱う以上、カビやウイルスなどによる病気は必ず存在する。また、その多くには致死性がない。病気をひとまとめにせず、病原性の強さに応じた議論をすべきだろう。対策を考える際には、科学的根拠に基づいて議論すべきだ。病気の危険性についても、データによる裏付けが必要である。
- ・ 現時点では、在来のカエル類がカエルツボカビに耐性をもっているというのは仮説でしかない。同じAタイプでも、海外で蔓延しているのは変異した株で、性質を変えたものが国内に侵入してくると病原性を発揮する可能性がある。国内の分布状況を把握するためには、継続して詳細な調査を行なう必要がある。サンプルの採取地点や採取時期を考慮する必要がある。
- ・ 現時点ではまだ検証の段階にあるため、カエルツボカビの対策について結論を出すのは難しい。ただし、現在、カエルツボカビ対策の危急性についての認識は大きく変わってきている。一方で、カエルツボカビ発見当初に作成された対策案は、現在もそのまま引き継がれている。運用面で弊害も出てきている。
- ・ ラナウイルスの対策について重要なのは、フィールドワーカーへのきちんとした対応だろう。一般からの報告を待っているだけでは情報収集は進まない。積極的に情報を集約する道筋を作っておくべき。

#### 4) カエルツボカビの消毒方法について

- ・ 何段階かの濃度の食塩水にカエルツボカビを曝して、一定時間後に生存しているかどうかを確認した。結論として、10%食塩水を10秒間作用させると増殖を抑える効果が得られた。3%濃度であれば、1分以上であればある程度の効果は見られたが100%の効果ではなかった。

#### 5) ラナウイルス (以下RV) の感染状況について

- ・ 2008年から2009年にかけて、野生下でウシガエルの幼生・幼体が9月から10月初頭に大量に死亡していた。死亡が確認されたのは全てウシガエルで、死亡個体は変態途中あるいは変態直後のものであった。カエル成体や魚類の異常がなかった例もある一方、2種の魚類の死亡が確認された例もある。
- ・ 9月は発症の特異月である。RVは腎臓への感染確率が高いと考えられる。発症個体の腎臓の尿細管上皮細胞質内や肝細胞質内に、ウイルスの存在を示唆する封入体という構造がみられる。台湾で記録されているRVとウシガエルのRVとはよく似ている。
- ・ ウシガエルだけが9月に死亡する要因として、幼体が易感染性(感染しやすい性質を持つこと)であり、この時期の水温が高いことが想定される。温度が下がると自

然と発症が低くなるのは、魚のイリドウィルスで既に指摘されている。温度が高ければ早く死亡し致死率も高い。

- ・ RVの在来両生類への影響については、有尾類と無尾類で感染実験を実施したところ、70～90%以上の死亡が確認された。
- ・ 在来のカエルは検査されていないだけで、在来種に影響がないことはないだろう。ツチガエル、トノサマガエル、ヌマガエルは池の縁に多く、感染が確認されるかもしれない。
- ・ RVについては、しばらくの間、発生場所をモニタリングしていくことが重要であろう。キャリアの特定や魚への影響などが重要である。

#### 6) ラナウイルスの消毒方法と対処について

- ・ ウイルスを不活性化する消毒方法として、次亜塩素酸ソーダ、アルコール、ポピドンヨードが挙げられる。グルタール、フタラール、過酢酸も効果がある。
- ・ ウイルスの拡散阻止に関して、野外の発生場所からウイルスを人為的に排除することは不可能である。拡散の担い手の中で、リスクが高く、排除できるものから順に処理することが現実的である。ウイルスを最も大量に持つ発症死亡個体は焼却処分する、潜在的な汚染物（網、長靴、バケツ、水など）は極力人為的移動を避け、消毒あるいは可能であれば焼却するなど。
- ・ RVについては、宿主城や宿主（カエル）を離れた際の、自然界での生存期間や動態、有尾類や魚類に対する感染性や病原性などを確認する必要がある。感染の可能性が高まるのは、生活史のうち水に入る時期（産卵期および幼生期にあたる）の可能性が高い。
- ・ RV感染症が発生した場合に的確に対応するためには、事前に管理体制のシステムを確立しておき、問題の発生時には、システムを活用して迅速に対応する準備をしておくことが重要である。様々なケースを想定して、対処作業の流れをシミュレーションしておくべきだろう。
- ・ システム構築のためには、現状把握体制（分布状況の把握）、監視体制・情報集約体制（大量死亡事例などを発見するための情報網の整備）、意思決定体制（対処作業の決定・実施）を確立することと、それぞれの連携が重要である。
- ・ RV対策の具体例として、緊急避難としての未感染個体の隔離、ワクチン接種の活用などが想定される。ただし、野生動物の保全を目的にしたワクチン投与は難しいと思われる。魚類にも感染するので、蔓延を防ぐためには養殖業者・漁業者との連携が必要だろう。

### (3) 個別のヒアリング結果

#### 1) 稲葉重樹氏

##### ①最新の知見に基づくカエルツボカビの生物学的特性について

- ・ 結局は五箇氏論文の系統樹に集約されるが、カエルツボカビは非常に変わっている菌類であるとの印象を持った。一部のキノコや医真菌などを除くと、寄生タイプであるツボカビの遺伝的バックグラウンドがこれほどまでに調べられている事例は他

- に少ない。世界規模の病原菌類の追跡調査としては、ジャガイモ疫病菌 *Phytophthora infestans* (Montagne) de Bary がどこかから来たかの追跡が稀な例。
- ・ 他の菌でも例はあるが、関係する ITS 領域がバラエティに富んでいる印象がある。
  - ・ 遺伝構造が気になる。このタイプのツボカビの遺伝子構造は単相 (n) が通常だが、五箇先生の話によれば、カエルツボカビでは  $2n$  の状態 (複相) になっている可能性がある。同じ菌株で違う遺伝子型が出る。
  - ・ パナマで採取されたものが A/L タイプ。シリケンイモリ由来と思われるものが A/T タイプ。1 個の遊走子由来のものから 2 つのハプロタイプが確認される。再現性があることから、単純にコンタミネーションとは考えにくい。A タイプと T タイプは系統がかなり離れている。
  - ・ 病原性とタイプの関係性がどうなっているかというのが気になる。病原性の強い遺伝子、弱い遺伝子をヘテロで持っている可能性もあるのではないかと。少し五箇先生に聞いてみたいところである。
  - ・ DNA 上に ITS 領域を複数持っていて、違うタイプを拾っているという可能性もある。
  - ・ 現在の分類では、カエルツボカビはフタナシツボカビ目となる。近縁既知で  $2n$  のツボカビ類は知られていない。
  - ・ 違うような遺伝子タイプを持っているのであれば、それが病原性やカエルにとりつく形質に影響する可能性がある。通常は病原性が顕在化していなくても、ある時では病原性を発現したりするのかもしれない。
  - ・ シークエンスはこちらでもやっているが、ITS の部分は読みにくい。プライマーの問題ではないかと思う。
  - ・ キノコなどの場合も、胞子間で調べてみるとシークエンスがずれることがある。キノコは有性生殖器官なので、これはおかしくはない。カエルツボカビでは有性生殖は知られていないのでどう解釈するか。どの時点で複相になるかはわからない。
  - ・ カエルツボカビの遺伝子関係の研究はしっかりサーベイされていない。個人的には、これだけ事実が解ってきているのになぜ誰も核相を調べないのかと思っている。
  - ・ 遺伝的な広がりでは松井久実先生が別の遺伝子領域でやりたいといっている。β-tubrin など。
  - ・ 宿主との関係も今のところはっきりしない。ウシガエルから得られたカエルツボカビの多様性については、日本産の両生類から伝染したものという解釈については、それに相当する日本産の両生類からカエルツボカビがほとんど得られていないのが引っかかる。
  - ・ カエルツボカビの系統が宿主 (両生類) とどういう関係にあるのかよくわからない。データはないが、あるいはカエルツボカビは生きた両生類とは違うところにいるのではないかと。脱皮殻などが本来の宿主である可能性もあるのではないかと。
  - ・ オオサンショウウオのツボカビは在来だとしても、他のツボカビは在来を裏付けるデータはない。検証は難しい。だめもとで環境 PCR をやればよいと思う。環境中の水なり土なりをどんどん PCR にかける方法である。どうしても莢雑物の関係で検出されないことは考えられるので、検出されないことが生息していないことだとはいえずしも言えない。

- ・ 五箇氏の論文を受けて、興味を持った人が海外で同じような研究がするようになれば、どこ起源かについてははっきりしてくるだろう。
- ・ それにしても、ITS 以外の別の遺伝子による裏付けは必要。すぐできることなので。
- ・ 世界各地で調べれば、いずれ分布中心が明らかになるであろう。オーストラリアとの関係が気になるので、インドネシア、フィリピン、台湾など。アジアの別地域では中国、韓国、ベトナム、ミャンマー、タイなどが気になる。
- ・ ヘテロ接合に関しては、1 ゲノムに1 領域しかないもの（シングルコピー）を調べるとよいだろう。ITS はゲノム内に複数あるので調べにくい。
- ・ NITE で現在単離したのは4 株で、うち2 系統がヘテロである（先述）。
- ・ 菌株ごとの性質については、A/T の株は生育が遅い印象を受ける。ただ、厳密に数値化はできないが。今年度の課題としては考えている。

## ②カエルツボカビの消毒方法について

- ・ 松井久実先生が食塩で実験されていた話があったが確認していない（塩には割と強いとのこと）。  
※松井先生からの情報で、10%食塩水で1 分間以上の処理であれば効果があるとのこと。
- ・ 厳密に防除するのは無理だが、状況をみると、それほど気にしなくてよいのではないか。もともと日本にいて、日本の両生類は何らかの耐性を持っているのだろう。大丈夫というのが実感。ただ、自然環境が変わると状況が大きく変わる可能性もあるので、そこは分からない。分からない以上、防除自体は必要だろう。
- ・ 世界的に見て侵略的移入生物と言われているカビは、いずれも日本ではそれほど大きな問題になっていない。カエルツボカビ、ザリガニペスト *Aphanomyces astaci* など。ザリガニペストは日本に入っているもおかしくないが、ヨーロッパで起きているような大量死は知られていない（川井唯史ら(2007) 日本のザリガニ類の生物地理と将来. 生物科学 58: 115-123)。あとは *Phytophthora cinnamomi*。日本でもパイナップル他の病気として知られているが野生植物では問題にならない<sup>1</sup>。ニレの病気を起こす *Ophiostoma* も現時点では問題になっておらず、日本ではむしろナラ枯れ病が問題になっている。海外で問題になる病原体は日本では問題にならず、別のものが国内で突発的に出てくる。野生生物そのものの種組成や耐性に関係があるのではないか。
- ・ 一つは検疫をするのかどうか。具体的にやることとしたら検疫だろうが、相当反発があるだろう。裏付けデータをどうとるかが課題である。日本の事例をいくつか集めて、日本の環境は特殊であり、他の地域からものが入り出すことには潜在的危険がある、というようなことが言えればいいか。
- ・ カエルがどういう状態だと感染するのか、どういう感染機構なのか関係を調べないといけない。死亡機構については年末に論文が出たらしいが、割に当たり前のこと

<sup>1</sup>稲葉氏からの追加情報として、本種は、国内では複数の農作物やクリなどの病原菌として報告されているらしいとのこと。農林水産省農業生物資源データベースの日本植物病名データベースを参照。

[http://www.gene.affrc.go.jp/databases-micro\\_pl\\_diseases.php](http://www.gene.affrc.go.jp/databases-micro_pl_diseases.php)



が書いてあったと聞いている。

- ・ 一般に、病原体を継代して培養を続けると毒性は落ちていく。昆虫寄生性のものなどでは普通である。

### ③その他

- ・ 予備検討を行っているところだが、カエルツボカビは凍結しても少なくとも1年はもつ。ツボカビ類の保存は難しいといわれているが、今のところ大丈夫である。
- ・ 菌株はオープンになり、しかるべき手続きさえ取れば誰でも買うことが可能になる。
- ・ カエルツボカビがオープンになった例は他にはないだろう。人の病気などには関係がなく、植物防疫にも、動物防疫には引っかけられないので、全くオープンになる。どこまで本気かはわからないが、研究したいという人はいる。寄託した人が菌株の購入者を特定できる仕組みはあるが、金を払ってということになる（制限付き寄託：<http://www.nbrc.nite.go.jp/deposit.html>）。
- ・ 研究対象として面白いのは、プロテアーゼ関係だろう。両生類の皮膚に付くことからケラチン分解活性があると考えられるし、ゼラチン培地を溶かす能力を持っている。
- ・ 防除策の一つとして、遊走子をミジンコに食べさせてみることを考えている先生がいる。

## 2) 宇根有美氏・松井久実氏

### ①カエルツボカビの感染実験について

- ・ 松井：2007年から実施してきたカエルツボカビの感染実験のデータがまとまったので報告したい。  
初年度（2007年）は培養株を使つての実験ではなく、Cタイプに感染したツノガエルなどの感染水を用いた。結果の概要は以下の通り。  
コガタハナサキガエル・ヌマガエル・ヤエヤマハラブチガエル：感染率が高い。  
これはPCR検査でも確認された。  
ヤエヤマアオガエル：PCR検査で高い陽性率を示した。  
リュウキュウアカガエル・イシカワガエル・ホルストガエル：抵抗性があるようで感染しにくかった。  
ヤエヤマハラブチガエル・カジカガエル：感染しても発症しなかった。陰転する例もみられた。  
ナミエガエル：感染して死亡するものがあつたが生存しているものもいた。  
ニホンアマガエル・トノサマガエル：感染率は高いが、個体に与える影響は少ないようであつた。  
ミヤコヒキガエル・トウキョウダルマガエル・モリアオガエル・アズマヒキガエル：接種後6ヶ月間、見かけ上健康で生存し続けた。  
2007年度の結果からは、カエルツボカビに対して感受性の高い種と低い種があることが明らかになった。そして、ヌマガエルが最も感受性が高いものと考えられた。
- ・ 宇根：この実験結果として表わされる死亡率は、ツボカビ症で死亡したものの率で

はない、何らかの理由で死亡した、という意味の死亡率を指す。

- ・ 事務局：コントロールの死亡率は載せていないが、コントロールでもかなり死んでいる。
- ・ 宇根：死亡個体のPCR検査の結果が陽性であることが、ツボカビ症で死亡したことを示すわけではない。病理学的には、カエルツボカビの体表分布と病変を確認して、ツボカビ症と診断される。その意味では、ヌマガエルはツボカビ症で死亡している。
- ・ 事務局：ツボカビ症以外で死亡しているものの原因は？
- ・ 宇根：最も多い死因は敗血症である。野生の個体を長く飼育していると死ぬ場合もある。
- ・ 宇根：カエルツボカビ接種量と死亡率とは関連があるか。
- ・ 松井：接種量が多いからといって感染率が高い、というわけではない。これは2008年の実験で確認している。ただし接種量と、死亡時に採取した材料のPCR産物の量とは関連がある（後述）。
- ・ 事務局：アズマヒキガエルは耐性があり、全く感染しないとみてよいか。
- ・ 松井：耐性があると考えられるが、6ヶ月も感染し続けた個体もある。コントロール群もあわせて解析が必要かもしれない。

2008年から2009年にかけて、さらに3回の感染実験（第2回、第3回、第4回）を実施した。ここでは培養株を使って、主にヌマガエルを対象として実験した。第2回の実験では、Cタイプの培養株を濾過して、遊走子の濃度を何段階かに設定した上、ヌマガエルに接種した。結果として、この実験では、ツボカビ症で死亡したヌマガエルは確認されなかったが、対照とした感染ツノガエルも死亡しなかった。

第3回と第4回の感染実験でもCタイプの培養株をヌマガエルに接種した。第2回の実験とは対照的に発症、死亡した。第3回では3匹中1匹が、第4回では9匹中9匹が感染・死亡していた。

PCR検査では実験2週間目の死亡時のスワブから強い陽性反応があった。病理の診断結果はまだ一部しか出ていないが、その結果、簡易染色（+）、組織切片では軽度～中度のツボカビ感染が認められたとのことであった。いずれの個体も、ツノガエル類で認められるような高度のツボカビ増殖や角化亢進は確認されていない。これは2007年の感染水暴露時と同様の結果であった。

陽性コントロールのツノガエルも同様に感染し、死亡したが、生存期間はヌマガエルよりもむしろ長かった。

上記のとおり、3回の実験を行い、3回とも結果が異なっていたことから、カエルツボカビ感染の成立には何らかの外的/内的要因の関与が考えられる。

- ・ 事務局：凍結保存の実験を稲葉氏が行っていると聞いている。長期培養すると形態変化が起こる、ということについては稲葉氏も指摘している。
- ・ 宇根：五箇氏と稲葉氏はシリケンイモリからのカエルツボカビの分離培養にも成功している。
- ・ 事務局：国内在来カエルに感染させるのは困難ということか。
- ・ 宇根：沖縄で、時期によってはシリケンイモリがほぼ100%カエルツボカビを保持していた。同じ水系でオキナワアオガエルの幼生がたくさんいたので、オタマジャク

シを採集し、飼育下で変態させてスワブをとって見たところ、ほぼ100%カエルツボカビを持っていた。衰弱した個体もいたが、それはカエルツボカビとは関係なかった。

- ・ 宇根：シリケンイモリのモニタリングを実施中である。ある時期に突然シリケンイモリの陽性率が低くなる。年間を通した行動や生息環境の違いによる影響を受けているとの予想もある。陸生の時期の個体からスワブをとっても陽性率は低く、池にいるところに陽性率が高まる。このことから、外部にカエルツボカビの供給源があるかもしれない。

生息地で状態の悪い個体がたくさん見られるかというところでもない。ハプロタイプが違うという理由で日本のカエルが死なない、というものでもない。

- ・ 事務局：ツノガエルで同じことをすれば死ぬのか。
- ・ 松井：死亡している。
- ・ 事務局：日本の両生類は平均的にかなり強いといえるか。
- ・ 松井：一部の種を除きかなり強いと言えそうである。2007年の実験では対照区を含めて死亡個体が多く、この先の実験をどうしようかというのが正直な気持ちである。日本の両生類に対して影響が少ない、ということがわかれば大きな成果である。
- ・ 事務局：同じハプロタイプのもので影響に差がある、ということであれば、全国規模でいうことはなかなか難しいかもしれない。
- ・ 宇根：感染した個体の皮膚を使って培養株の樹立ができた。その個体自体は生き続けているが、体重減少があり、ストレスがかかった時に発症する可能性もある。必ずしも安全であるわけではない。

シリケンイモリで確認されたカエルツボカビのハプロタイプは様々であった。Aタイプも認められている。

オオサンショウウオの脱皮殻を入れた水槽でツノガエルを飼育したが、一匹も発症しなかった。ツノガエルは陰性のままであった。

オオサンショウウオのカエルツボカビは、五箇先生らの発表した系統樹でもかなり違うようだ。ハプロタイプがカエルツボカビの病原性を如実にあらわすものかどうかは議論が必要であるが、少なくともAとCは病原性が明らかである。ハプロタイプによっては、病原性がないものもあるかもしれない。

- ・ 松井：バンドが2本検出され、カエルツボカビかどうか不明であるものもある。
- ・ 宇根：シリケンイモリがもつカエルツボカビのモニタリングを2月にも実施する予定。以前に採取した成体のカエルについては陸地にいるものからスワブをとったが、ほとんど陰性であった。しかし、先に述べたようにオタマジャクシから変態したばかりの幼体は陽性であり、奇異な結果であった。

## ②カエルツボカビの消毒方法について

- ・ 松井：食塩水の効果について説明したい。何段階かの濃度の食塩水にカエルツボカビを曝して、一定時間後に生存しているかどうかを確認した。実験は海水の濃度から開始した。結論として、10%食塩水を10秒間作用させると増殖を抑える効果が得られた。3%濃度で1分以上であればある程度の効果は見られたが、100%の効果で

はなかった。

現在実施されている西表島港湾部でのカエルツボカビのための消毒法は、高濃度の薬液を使用するため環境汚染が危惧される。この実験は、より環境負荷が小さく低価格の消毒方法を見つけるために行った。この結果は、すでに環境省那覇自然保護事務所に報告した。

- ・ 事務局：食塩水を含ませたマットを踏むだけで良いか。
- ・ 松井：効果は塩分濃度により異なる。食塩はカエルツボカビについての効果だけが確認できているだけで、その他の細菌についての効果は不明である。また、ウイルスに対する効果はないだろう。
- ・ 環境省：沖縄では現在もオスバンを使用している。何らかの方法に変えたい、と聞いている。

### ③ラナウイルス（以下RV）の感染状況について

- ・ 宇根：野生下における発生状況から最新の知見をまとめてみた。ウシガエルの幼生が9月に大量に死亡していた。死亡個体は変態途中あるいは変態直後のもので、カエルの成体や魚には異常が認められなかった。9月は発症の特異月である。四肢指端、みずかきが壊死する、尾がフレア状になる、半眼、まぶたの充血、水腫（皮下、腹腔）、無気力などが観察された。

腎臓で尿を濾過する部位（腎小体）で壊死が進行している。確定診断はPCR法の結果を待たなければならないが、RVは腎臓の細胞を標的とする可能性が高いと考えられる。発症個体の腎臓尿細管上皮細胞質内に、ウイルスの存在を示唆する封入体という構造がみられる。

飼育下のカスミサンショウウオでの大量死が6月に起きた。野外から、見かけ上健康な個体を飼育下に導入したところ、元からいた個体も導入個体も年齢に関わらず全て死亡した。カスミサンショウウオのRVとウシガエルのものとの違いは大きい。なお、台湾で記録されているRVとウシガエルのRVとはよく似ており、1塩基しか異なる。

2009年には国内での両生類の幼生、幼体の大量死が4か所で確認されている。発生は9月半ばから10月初頭までに限られた。市民から異臭の苦情があり、水辺に行ってみるとオタマジャクシや変態直後のカエルが大量死していた例がある。他に、雨が降る度にカエルの死体が流れ着くという川の例もあった。

死亡が確認されたのは全てウシガエルであった。2種の魚類も死亡が確認された。2008年の国内初のRV感染症発見以来、これらの事例は半径35km圏内で確認されている。これまでに国内のウシガエルから検出されたウイルスは全て全く同じもの（RCV-JP）であった。

ウシガエルだけが9月に死亡する要因として、幼体が易感染性であり、この時期の水温が高いことが想定される。温度が下がると自然と発症が低くなるのは、魚のイリドウィルスで既に指摘されている。温度が高ければ早く死亡し、致死率も高いことは麻布大学での実験で確認済みである。

爬虫類（カメ類）、魚類、両生類に感染する。病原性は種によって異なるため、

耐性の高い種類がキャリアとなってしまうことが厄介である。

全く同じウシガエルのRVでも、地域により病変の程度が違うことが確認された。2009年の事例では、局所的四肢の腫脹、陳旧潰瘍（古い潰瘍）など、病変が慢性化している傾向があった。

2008年は角膜の充血、白濁も見られたが、2009年は偽膜形成までであった。

最初の報道以来、2年が経過し、拡散した可能性はある。

RVの在来両生類への影響については、有尾類6種137個体（これとは別に対照区55個体）、無尾類5種105個体（同42個体）で実験を実施し、次のような結果が得られている。温度によってウイルスの増殖速度が異なることから、22℃、15℃で実験を行った。

致死率は次のとおりであった。

有尾類	95.2%
無尾類	66.7%
幼生	97.1%
成体	79.2%
平均	86.7%

腹腔内注射でも接触感染（浸水暴露）でも致死率に差はない。

カスミサンショウウオとトウホクサンショウウオで生存期間の差が見られるか。温度が低いほど生存期間は長かった。カスミサンショウウオの方が若干長く生存した。

今後、気温変動などによって周期的な大量死発生の可能性が想定される。

- ・ 事務局：ウシガエルの死体が大量に見つかっているにもかかわらず、他種の死亡が確認されていないのはなぜか。
- ・ 宇根：見つけやすさによるかもしれない。ウシガエルは多産で、産卵数が万の単位になる。国内在来種であれば、産卵数はこれほど多くない。また、体の大きさも違う。イギリスでの報告で、コモフログ（ヨーロッパアカガエル）が減ってきた、というものがあり、年間数万個体が減少しているという報告もある。この場合、大量死という形では現れていない。EU6カ国はモニタリングを実施している。ヒキガエルなどの、極小の幼生が死亡した際に、どのくらい人間が気付くかということであろう。検査されていないだけで、在来種に影響がないことはないだろう。
- ・ 事務局：ツチガエルは生活様式が似ている。トノサマガエル、ヌマガエルは変態した個体が池の縁にすることが多いので、感染が確認されるかもしれない。
- ・ 松井：都市近郊部に限られる、ということはないか？
- ・ 宇根：ある程度緑のある場所のようである。
- ・ 環境省：他の種がいてもおかしくない。
- ・ 事務局：ナゴヤダルマガエルの生息地が脅かされている可能性があるのではないか。実態把握は今後の課題である。
- ・ 環境省：ため池などで発症している場所については、100%感染していてウシガエルさえも生き残っていない、ということはないのか。
- ・ 宇根：実験下ではウシガエル成体には接種していないので分からないが、9月の流

行後、10月に現場に行ってみると、弱っているものも正常なものもいた。すなわち、耐過するものもいる。農水省の養殖研究所での話によれば、魚類の場合、耐過したものでストレスや競争の激化する繁殖期に発症するものが多いとのこと。

RVの検査の際には腎臓などの臓器を培養するために、検体を殺さなければ検出できないし、ウイルスを持っているが発症していない個体（耐過した個体）の検出率は決して高くない。

高温域にいる種が危険といえるだろう。

通常、幼生が100%死亡したとすると、親の死亡率はその3分の1程度といわれており、幼生の死亡率が高い。トウキョウダルマガエルの場合、成体が100%致死していることから、この種の幼生はRV感受性がきわめて高いものと想定される。

- ・ 事務局：ウイルスは水中で単体で生存し続けられるのか。
- ・ 宇根：数ヶ月は生きるであろう。冷凍であればほぼ永久に生存する。DNAウイルスであるためにRNAウイルスよりも強い。

#### ④ラナウイルスの消毒方法と対処について

- ・ 宇根：微生物に対する消毒法は、病原体の種類によって異なるが、結核菌やウイルスまでをカバーするものとして、次亜塩素酸ソーダ、アルコール、ポピドンヨードが挙げられる。一方、クロルヘキシジン、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、両性界面活性剤などの消毒液では効果はない

グルタール、フタラール、過酢酸も効果がある。

ラナウイルスの確認は個体を殺して内臓(特に腎臓)を検査しないとわからない。PCRでの診断が現時点では採用されているが、免疫染色によってウイルス抗原を確認する方法を試験中である。

ウイルスの拡散阻止に関して、野外の発生場所からウイルスを人為的に排除することは不可能である。拡散の担い手の中で、リスクが高く、排除できるものから順に処理をすることが現実的である。ウイルスを最も大量に含む死体は焼却処分する、感受性のある動物（両生類、魚類、水生爬虫類など）は捕獲処分をするか、移動を禁止する、潜在的な汚染物（網、長靴、バケツ、水など）は極力人為的移動を避け、可能であれば消却するなど。

養殖研究所では、ホンモロコで感染実験を行ったが感染もせず、保菌もしていなかったという結果が得られている。なお、2009年にはウシガエルとともに魚も死亡しているが、その魚からRVが検出されている。しかし、同じ事例について養殖研究所がRVの検査をしたところ、陰性であったと報告されている。

- ・ 環境省：その理由は？
- ・ 宇根：採取者が養殖研究所に送付した材料の種類と、その採取時期、検査に用いたプライマーなどが麻布大学と異なる可能性がある。たとえば、まだ流行が顕在していない時期のものだったなど。RVにもいろいろな型があり、適切なプライマーを用いる必要がある。養殖研究所では魚類のイリドウイルスを研究しているので、プライマーを含めて、カエルと異なることが考えられる。
- ・ 事務局：感受性のある動物に水生昆虫は含まれないか。

- ・ 宇根：イリドウイルスはもともと水生昆虫から見つかった。物理的キャリアの可能性を含めてキャリアにならないとも限らないだろうが、分からない。
- ・ 事務局：西日本はカメが多いので、影響が深刻では？
- ・ 宇根：アメリカではカメ類の死亡例があるようだ。
- ・ 松井：2008年の発見個体からみつかったウイルスはどこからきたか？
- ・ 宇根：わからない。最初の事例は個人所有の池であったが、それまで一度も経験したことがないウシガエル幼生の大量死であったという。もし気温が関わっているのであれば、年間の温度変化を追う必要はあるだろう。  
北米では、カエルツボカビよりもラナウイルスの脅威の方が大きいという表現がされている。
- ・ 事務局：高緯度地域（カナダ）でもラナウイルスが確認されている。
- ・ 宇根：北米では34州から110の感染例がある。トラフサンショウウオ（北ダコタ、ユタ、メーン州で大量死）最近になって気づかれてきたということ。アジアでは台湾（台湾南部でウシガエルの大量死が発生した）、タイ（ペット個体、インドネシアから餌用に購入したものが飼育施設内で大量死したというもの）、日本、中国で発生が確認されている。北京で購入したコイチョウイボイモリがスイスの動物園で発生した、という例も報告されている。

#### ⑤その他の両生類の感染症

- ・ 宇根：トウホクサンショウウオ（福島県国見山）の皮膚に異変があり、寄生虫（吸虫）も確認されている。アメリカミンクがこの寄生虫の終宿主となっている可能性がある。須賀川市、郡山市、田村市、二本松市、福島市では、写真や死体からミンクの確実な生息情報が得られている。国見町、美春町にはかつてミンクの養殖場があった（ミンク生息市町村に隣接）している。
- ・ 環境省：ミンクは北海道にも多くいるが、北海道でも同じくエゾサンショウウオに発症しているのではないか？
- ・ 宇根：それは分からない。この寄生虫が検出されたのは東北のホンドテンで数例のみである。
- ・ 環境省：風土病のようなものか？
- ・ 事務局：中間宿主はサンショウウオのみではなくカエルも可能性があるか？
- ・ 宇根：それらについては注目しているところである。吸虫はミンクの小腸に寄生している可能性がある。同じような発症個体は福井県のヒダサンショウウオでも確認されている。同じ観察者は、アベサンショウウオでも見たことがあると言っている。アライグマも同様に終宿主の役割を果たすと考えられるため、アライグマが定着している西日本でも影響が懸念される。  
カワニナで吸虫の存在は未確認である。

#### ⑥ラナウイルスとカエルツボカビの対処として今後実施すべきこと

- ・ 宇根：カエルツボカビはもう少し様子を見た方がよいであろう。すぐに対策をとる事態ではないと考えられるし、安全宣言を出す状態でもない。影響がないわけでは

なく、あるきっかけ（例えば農薬）で発症するかもしれないので、検査体制を整えることでわかることがあるだろう。

- ・ 事務局：飼育水を消毒すべきかどうかについて。
- ・ 宇根：カエルツボカビについては、日本のカエルにどの程度影響を及ぼすかについてははっきりとしたことはわからない。では何もしなくてもよいということにはならないし、いろいろな感染症がある中でカエルツボカビの対策だけとればよいというものでない。RVなど、カエルツボカビ以外の病原体についても気をつけなければならない。飼育個体は野外に放つなというような、多くの病原体対策を包括できるような指導をしていくべき。
- ・ 松井：常識の範囲でのメンテナンスは必要だろうが、それほど神経質になるものでもないだろう。
- ・ 事務局：太田氏のコメントでは、これまでにいろいろな初期対応が実施されている。ペットとして両生類を流通させている人が取り扱いを自粛したり、野外調査や飼育の用具を消毒したり、また飼育関係者の間では旧Dタイプを今でも気にしているようである。そういった意味では正しい情報を伝えなければならない。言い方がむずかしい。他の病原体での例はないか。
- ・ 宇根：新型インフルエンザはまさにその例ではないか？ 死亡率のパターンは違うという特徴はあるが、平均としては従来のインフルエンザよりも低いくらいだった。状況がわかれば対策レベルが下がってくる、というのは何でも言える。その判断が大事だろう。人間が全てを把握できているわけではないので。変異の可能性も残されている。

人工的な単一環境では異常の発生リスクは高まる。情報、調査、基礎研究が重要である。リスク評価のために必要なことである。

RVについては、しばらくの間、発生場所をモニタリングしていくことが重要であろう。キャリアとしては何があるか、魚への影響などが重要である。

一方、カエルツボカビの治療法については概ね確立している。除菌だけでなく治療も可能である。

アメリカのスミソニアン博物館から広島市安佐動物公園にオオサンショウウオの提供依頼があった際、オオサンショウウオの消毒のためにイトラコナゾールを使用した。RVを持っていないことを証明してほしいという要望があったため、どの検査で陰性であればいいのかを教えてもらった。その結果、数年にわたってRVが発症していないこと、他の様々な検査法を用いても検出されないこと、というような回答だった。OIEでは検査方法は示されつつあるが、それは全て死体についてのものである。

日本はカエルツボカビとRVの汚染国であることがOIEで公表されている。

カエルツボカビの場合、タックマンPCR法を使うのが推奨されているが、必ずしもそれが正しい結果を出していないことが五箇氏も指摘している。

- ・ 環境省：情報を収集して次の政策に活かす体制がないので、それが課題である。少なくともRVとカエルツボカビについてはOIEに登録された疾病で、我が国の窓口は農水省だが、カエルツボカビの検査は環境省、魚類に感染したラナウイルスの検査は



水産総合研究所で行っているなど、担当がばらばらである。対応の面で、それらの部署が協力して手を打たねばならない課題であろう。

### 3) 太田英利氏

#### ①カエルツボカビの生物学的特性

- ・ (カエルツボカビの生物学的特性として、単独の遊走子から2つのハプロタイプの形質が現れたとの情報に対して) Gene duplicationが生じ、かつその結果できた2つの複製領域が concerted evolution (協調進化)を示さない場合、複製後、少なくともそのうちの一方(非機能領域では両方)が、時間の経過とともに中立的突然変異を蓄積してゆき、その部分だけをプライマー/PCR法を用いて増幅し配列決定すると、見かけ上、あたかも2倍体ヘテロのような結果が得られることがある。
- ・ カエルツボカビについては基礎的な生物学的情報がほとんど皆無なので、形態から遊走子が単相か複相かを判断するのは難しいだろう。経費がかかっても、カエルツボカビの全ゲノム配列を解読するのが理想だ。ただ技術的には可能であろうが、遺伝子の量が膨大なので分担で作業を進めるにせよ、かなりの時間を要するであろう。
- ・ Goka et al. (2009. Molecular Ecology 18: 4757-4774.)は、現時点で最良とされる手法を使い、最良と思われる議論を組み立てている。少なくとも現時点では、それに基づいて対策を考えるのが妥当である。他の、未だ公表されていない調査結果と同列に扱うべきではない。
- ・ ウシガエルから検出されたカエルツボカビの遺伝的多様性が高いことには注目すべきである。一般的には、ある宿主種から見つかる病原体の遺伝的多様性が高い場合、その種を病原体の本来の宿主種、あるいは長時間宿主として機能してきた種と考えるのが一般的である。したがって、ウシガエルの扱いについては、今後、さらに慎重に議論していくべきである。
- ・ オオサンショウウオから見つかったタイプは別として、カエルツボカビが必ずしも日本起源とは言えないのではないか。このことをある程度確定的に言うためには、朝鮮半島をはじめとする大陸温帯部-亜熱帯部における詳細な調査が必要であろう。
- ・ 有尾両生類の多様性が高い北米で、カエルツボカビによる大量死の事例が少ないのは、そこに分布する種がある程度の耐性を備えているためではないか。全くの憶測ではあるが、研究が進めば、北米でもある程度在来のカエルツボカビが検出されるのではないか。もしそうだとすれば、カエルツボカビは日本固有というよりは、ローレシア(ユーラシア・北米など)に薄く広く分布すると言えそうである。元々、 Gondwanaにはいなかったもので、南米やオーストラリアの両生類は耐性を持っておらず、感染すると死亡してしまうのだろう。その中でもアフリカ大陸には比較的早い時期に侵入したので、(アフリカツメガエルなど)そこに分布する種では比較的耐性が高いのではないだろうか。

#### ②ラナウイルスについて

- ・ 聞いた話では、近畿地方でウシガエルの変態しかけた個体の大量死があったと聞いている。たまたま当地には、去年6月中旬に1泊2日で行っていたが、少なくとも

アマガエルの幼生は普通に見られた（ほかのカエルの幼生も混じっていたように思うが詳細は不明）。ウシガエルの幼生も見られたが、多くはない印象であった。

- ・ これまで、ウシガエル以外の種で、ラナウイルス感染症による大量死の事例が確認されていないのは不思議な気がする。ウイルスの活動時期とカエルの生活史の季節性が関係しているという説明は、検討していく価値がある。一方で、宿主特異性（ウシガエルにしか感染しない）が原因になっているとは考えにくく、少なくとも慎重にデザインされた対照比較の反復にもとづく実験検証が必要である。現時点で対策を云々する際の前提にするのは大変危険である。

### ③カエルツボカビの感染実験

- ・ カエルツボカビの保菌が確認されているにも関わらず、野外での死亡事例が確認されていないことを考えると、日本の在来両生類、少なくともシリケンイモリは、何らかの免疫機能によって病気を抑え込んでいると考えるべきだろう。それを実証するためには、感染実験を充実させなければならない。
- ・ 感染実験等の行なうためには、個体飼育の技術取得が必須である。飼育にはそれなりの技術が求められ、作業には手間もかかるので、技術をもった人に協力を仰ぎながら、それなりに人手をかけ、場所（十分な空間等）を確保しつつ飼育をすべきだろう。専属の飼育員を使うことができればいいが、そうした人を雇いあげる資金がないのがつらい。

### ④カエルツボカビに関する今後の対処方針について

- ・ ツボカビ対策の現状をみると、様々な立場の人が思い思いのカエルツボカビ対策を主張し合っていて、一般の人の混乱を招いている。Goka et al. (2009)など新知見も増えてきているので、現状を放置するだけでは余計に混乱を招く。
- ・ 環境保護に気を使ってくれる人たちは自主的にきちんとした対策をとってくれているが、それが彼らに大きな負担になっている。一方で何ら対策をとっていない人も多いが、万が一何か起こった場合に責められるのは、前者の熱心に取り組んでいる人たちだろう。しかも、現在までに、それらの協力者に対して、彼らの努力の意義がきちんと示されていないことは問題である。
- ・ ツボカビ緊急事態宣言について、当初は、日本、特に琉球列島のように、感染症によって種の絶滅がおこる条件が揃っていると思われる場所（数少ない生息地、狭い生息空間、限られた個体数などの条件をそなえる）では、実態が分かるまでは警戒すべきという考えから、緊急対策の実施を提言した。同時に、リスク評価を行なうための情報収集の必要性も提言していた。疫学研究を推進させ、その結果を速やかに公開して、対策に活用させるように求めていたが、それが未だできていない。
- ・ 現在も緊急事態宣言が出されたままであるため、関係各所には緊急対策（道具の消毒など）を要請し続けている状態になっている。ツボカビ症蔓延を過度に心配する必要性がなくなった現在、現状のまま放置しておくのはよくない。道義的な問題として環境省の信用失墜につながる一方、さらに今後、別件で何かの協力をお願いする際にも同意を得にくくなるだろう。環境省は、新知見を踏まえて、早急にきちんと

とした情報を公開して説明することが必要だ。

- ・ きちんと状況の説明をした上で、今回は大丈夫だった、という発表をすべきだ。研究者（宇根氏・稲葉氏・黒木氏）にもコメントしてもらいたいだろう。その際に、緊急対策をとったことは間違いではなかったことを強調して説明し、理解を得ることが大事だ。特に、以下の者及びには、緊急対策において大きな負担を強いているので、きちんとした説明が必要だろう。

アフリカツメガエルを研究材料にしている研究者

ペット業者

野外調査者、野外活動を行なう市民

飼育展示施設（沖縄においては美ら海水族館など）

#### ⑤今後の対策について

##### <カエルツボカビ>

- ・ 飼育水の処理は、今後も慎重にしていくべきだろう。
- ・ 一方で、野外における行動規制（長靴の消毒など）は少し緩めてもいいのではないか。ただし、少しでも議論の余地がある場合は、規制緩和は慎重に考えるべきだ。
- ・ 琉球列島については、生物地理学的区分を単位として生物相ごとに対策（島間移動に関わる規制など）を考えていくべきだろう。
- ・ 感染したシリケンイモリが野外から多数発見される一方で、両生類の目立った大量死のない中琉球（奄美諸島、沖縄諸島）では、ある程度規制を緩和してもいいのではないか。一方で、（中米などで被害を起こしている）Aタイプが未だ確認されていない南琉球（宮古諸島、八重山諸島）では、警戒を継続するべきだ。中琉球で警戒が必要な場所をあげるとすれば、地史が異なる地域（伊平屋、伊是名、粟国の各島）であろう。ただし、継続して調査を実施する必要がある。
- ・ 現在、宮古島では固有種ミヤコヒキガエルが激減している（減少の主要な理由は、繁殖場所の消失、外来魚による幼生の捕食などと思われる）。これにカエルツボカビの影響も出るとすれば問題なので、引き続き宮古島でのカエルツボカビの状況把握に努めるべきだろう。
- ・ 西表島に関しては、外来生物問題の啓発活動の象徴として、多少緩めつつも警戒体制を維持してもよいのではないか。ただし、大量の消毒薬を流し続けるのは問題かもしれない。
- ・ 日本全国で過去に行なわれているカエルツボカビ分布調査では、調査地点のとり方にムラがある。今後はこれまで手薄になっている地域で調査を実施すべきだ（例、四国中部、九州中・東部、北海道、琵琶尾北岸地域など）。該当地域のサンプル採集には、博物館や在野の研究者に協力をお願いできるのではないか。
- ・ 北海道では、国内外来種（特にトノサマガエル）の分布拡大に伴う病原体の拡散にも注目して調べていくべきだろう。
- ・ ウシガエルと生態的特徴が似ているダルマガエル、トノサマガエル、ツチガエルには注目すべきだろう。

#### <ラナウイルス>

- ・ 目下のところウシガエルだけとはいえ、局地的に大量死が起こっているのは、ツボカビの事例よりも怖い。十分注意しなければならない。
- ・ 唯一、発症が確認されているウシガエルには特に注目していくべきだ。その際、ウシガエルと生態的特徴が似ているダルマガエル、トノサマガエル、ツチガエルにも注意したほうがよい。

#### 4) 黒木俊郎氏

##### ①最新の知見に基づくカエルツボカビとラナウイルスの生物学的特性について

- ・ 真菌であるカエルツボカビとウイルスであるラナウイルスは全く異なる生物なので個別の対処方法は異なる場合があるが、感染症の蔓延を防ぐための対策の考え方は基本的には同じである。
- ・ ラナウイルスには解明する必要があることが多い。例えば、宿主城や宿主（カエル）を離れた際の生存期間や動態などが挙げられる。有尾類や魚類に対する感染性や病原性なども確認する必要がある。
- ・ 感染の可能性が高まるのは、生活史のうち水に入る時期（産卵期および幼生期にあたる）の可能性が高い。

##### ②消毒方法について

- ・ カエルツボカビとラナウイルスの消毒法については、オーストラリアで研究が進んでいる。よくまとめられた研究があるので（Speare et al., 2004）、日本でも対策を考える上で参考になるだろう。上記の論文において紹介されている消毒法をみる限りでは、ラナウイルスはウイルスとして特に強いものではないようだ。
- ・ 一般的にウイルスは熱に弱いので、加熱による不活化は有効だろう。

##### ③今後の対処方法について

- ・ 野生動物の保全の難しさは、対処作業の実施や野生生物への被害発生における責任の所在が不明確である点にある。
- ・ ラナウイルス感染が発生した場合に的確に対応するためには、事前に管理体制のシステムを確立しておき、問題の発生時には、システムを活用して迅速に対応する準備をしておくことが重要である。様々なケースを想定して、対処作業の流れをシミュレーションしておくべきだろう。
- ・ システム構築のためには、現状把握体制（分布状況の把握）、監視体制・情報集約体制（大量死亡事例などを発見するための情報網の整備）、意思決定体制（対処作業の決定・実施）を確立することと、それぞれの連携が重要である。

##### ④ラナウイルスへの対策について

- ・ 両生類のラナウイルスへの感染は、現在一部地域（西日本）のみに限定されており感染が全国的に拡大している状況ではない。しかし、現在の状況を根拠にして、今後も蔓延していかないとは言えない。野生のカエル類は、通常、個体がばらばらに

生息しているので、個体間の接触が少なく、感染が起こりにくいと考えられるが、産卵期などに集合すれば感染の可能性が高まる。

- ・ ラナウイルス対策の具体例として、次のようなことが想定される。  
ウイルスが見つかった際には、緊急避難として未感染個体を隔離や移住させる。  
ワクチンおよびその接種方法を開発して活用する。例えば、地域限定的にワクチン投与を実施し、免疫個体の配置によって、拡散を防ぐ方法も想定される。
- ・ ラナウイルスは魚類にも感染するので、蔓延を防ぐためには養殖業者・漁業者との連携が必要だろう。
- ・ ワクチン使用の可能性として、イリドウイルス類（ラナウイルスと同じイリドウイルス科）に対してワクチンが開発されているので、ラナウイルスに対しても同様にワクチン開発ができるだろう。今後の対策として、ワクチン使用の可能性を迫る価値はあるかもしれない。ただし、ワクチンは個体単位で接種することになるので、野生動物の保全を目的にしたワクチン投与は難しいと思われる。
- ・ 野外で発症が確認されているのがウシガエルに偏っているのは、ウシガエルの体サイズが大きく、しかも高密度に生息しているので、単に見つかりやすいためだと思う。ウシガエルだけにしか感染しないことは想定できない。
- ・ ただし、それぞれの在来種に対するラナウイルスの病原性を実験によって検証すべきだろう。
- ・ 世界的には、オーストラリアで研究が進んでいるようだ。台湾でも日本と同じタイプが確認されている。

#### ⑤カエルツボカビへの対策について

- ・ Goka et al. (2009)以降、カエルの飼育水を下水に流してもいいという風潮があるが、この研究を安全宣言とするにはさらにデータを重ね、検証すべきことが残されているように思われる。
- ・ カエルツボカビは日本でパンデミックを起こさないとしても、個体数の減少につながる可能性がある。これは野生生物保全にとって重大な問題なので、早急に結論を出さず、感染実験による病原性の確認やカエルツボカビの分布の動向などのデータを蓄積する必要がある。
- ・ 現在進行しているアフリカツメガエルの野生化は生態的影響が問題視されているが、本種が病原体を持っていることも重要視すべきである。可能であれば駆除すべきで、それができなければ、個体の拡散を防ぐ努力が必要である。
- ・ マウスなどの実験動物は SPF (Specific Pathogen Free) 化されているが、現在、実験用に養殖されているツメガエルではそれが実施されていない。実験動物として使用するのであれば、病原体に感染していない方が都合良いはずなので、養殖されるツメガエルにおいても SPF 化を推進すべきだろう。実際にマウス・ラットでは、過去に病原体を保有していたが、現在は SPF 化が普通に行なわれている。

#### 5) 五箇公一氏

<カエルツボカビについて>

①カエルツボカビの最近の研究の動向 (Goka et al. (2009)の意味、データの解釈)

- ・ 次の論文を準備中である。データ数が増えたので系統樹は若干変わっている。日本では圧倒的に塩基多様度もハプロタイプ数も多い。いまのところ日本 50 タイプ、海外 17 タイプ (海外はほとんど A タイプ)。重複を含めると合計 62 タイプが確認されている。
- ・ 単純には、日本には古い系統が存在すると解釈される。オオサンショウウオが他から 100%分離されることは間違いない。
- ・ 海外でも恐らく ITS 領域は調べていたと思うが、タイプが少ないので明確な結果が出ていないのだと思う。全ゲノムまで読んで、マイクロサテライトや一塩基違いの領域 (SNP) で系統樹を書いてみたが結論として全く分からない。アフリカでもアメリカでも同じような変異しか持っていない。起源はどこなのかというところでこの論文が出た。
- ・ 日本には相当数のツボカビがいて、分化もしているし、オオサンショウウオには相当な昔から感染していたらしいことを考え、日本起源説を提唱した。それを裏付けるために外国のサンプルを含めて現在解析中である。
- ・ 沖縄のウシガエルからカエルツボカビは出ていないが、単純にサンプルが少ないこと (3 サンプル) によるのかもしれない。ただ、シリケンイモリはあれだけ持っているのに、同所的にいるカエルの感染率はそれほど高くない。
- ・ 本土のウシガエルがいろんなタイプに感染しているのは、ウシガエルが外来であり、ツボカビフリーで日本に入ってきて、環境中に薄くいた様々なツボカビに感染している、という仮説である。ただし、裏付けとして、ウシガエルそのものの国際・国内輸送データがそろっていない。歴史的背景についてはこれから調査していかなくてはいけない。
- ・ シリケンイモリが様々なタイプに感染しているのは、たまたまあのように検出されているが、日本中のカエルがいろいろなタイプを隠して持っているが、検出限界以下で検出できないということではないか。感染実験では、シリケンイモリからベルツノガエルに簡単に感染する。死なないが、成長がたいへん悪くなる。同様にトウキョウダルマガエルとシリケンイモリを同居させると、コントロールから陽性が出る。日本のカエルはわずかに感染していて、しかし抵抗性が強いので菌は抑えられるのではないか。まだ確証はないが、感染しているシリケンイモリと、基本的に検出されていないトウキョウダルマガエルを一緒にさせるとシリケンイモリのツボカビが減少する。ということは、トウキョウダルマガエルが抗菌ペプチドか何かを持っていて、カエルツボカビを直したのではないか。
- ・ 感染率が高い (在来の) 種類は島や溪流などにアイソレートされているので垂直感染が発生し、感染率が上がるのではないか (ハナサキガエル 9%、シリケンイモリ 64%、オオサンショウウオ 36%)。
- ・ それ以外の在来種については、感染していてもその率は非常に低い。恐らく検出限界以下で持っていても見られないというのがあるから、かなり cryptic な部分があるのではないか。
- ・ 外来種は 2 割近く感染している。

## ②国外における野外のカエルツボカビの感染状況

- ・ アメリカ合衆国のカエルツボカビは在来種からウシガエルに移らないのか、という点について、国立環境研のスタッフを現地に送り、アメリカオオサンショウウオとウシガエルを調べてもらった。アメリカオオサンショウウオはAタイプしか持っておらず、ウシガエルは検出0 (N≒20) であった。アメリカ全体のウシガエルを調べる必要がある。アメリカの環境の中では、ウシガエルはカエルツボカビを持っていたとしても、感染率は低い可能性が高い。
- ・ 外国の状況は今一つ見えているようで見えていない。感染爆発が起きたと言うが、結局まとめて調べられているのは中米とオーストラリアぐらい。ヨーロッパやアフリカからも報告はされているが、カエルツボカビの expansion とカエルの死亡がちゃんと調べられているかという点、調べられていない。
- ・ ウシガエルの大量消費国でもある中国では、香港、広州を初めかなり調べても全くでない。(調査地が) 温度が高い、湿度が高い地域であるという点はある。他のカビのファウナが東南アジアでは異常に高いのでカエルツボカビも簡単には増えられないだろう。中国の緯度の高い所や、朝鮮半島を調べる必要がある。
- ・ 韓国には変異がある。向こうにも同じように変異があるのか、日本から伝播したものかどうかは不明。日本ではアマガエルの感染率が 0.2%だが、韓国では感染率 80%。傾向が違う。どちらかといえば、これはツボカビが外部から入ってきた可能性を示唆するものではないか。カエルの種の遺伝分化がいつからなのかについては気になるところ。
- ・ シリケンイモリは、沖縄と奄美での分化の間にカエルツボカビが発生している可能性がある。市街地周辺では家庭用排水の殺菌剤などが影響している可能性もあるが。
- ・ チュウゴクオオサンショウウオについては、サンプルもらっているが、日本の飼育個体、海外の個体を含めて検出されない。
- ・ カエルツボカビの起源を巡る考え方が迷走している。分からないことは多いが、考えるほど日本起源ではないか。これほど多様性の多い国は他にない。
- ・ 日本以外の国は押し並べて感染率が高い (パナマ 26% : ほとんど A タイプ、オーストラリア 116/約 600 : ほぼ A タイプ、アメリカ 40% : ほぼ A タイプと L タイプ)。大雑把だが中米、北米、オーストラリアで見ると、日本より圧倒的に感染率が高い。
- ・ カエルツボカビが (アジアの) 有尾類起源だとすると、それらのいない南米やオーストラリアでパンデミックが起きることはありうる。
- ・ 特段調べているわけではないが、印象としてはハプロタイプに地理的傾向はない。感染力は強いと思うので水系単位で容易に伝播するのではないか。

## ③Goka et al. (2009) に対する国内外の学会等の反響

- ・ 国内は、被害が出ないことで沈静化しているが、海外の反響は大きい。
- ・ おおむね肯定的である。ME 誌の perspective でも出るぐらいだから。逆に、腑に落ちるというか、今まで分からなかったことが、やはりアジア起源なのか、という反

響だ。

- ・ 方法的におかしいのではないかななどのコメントもくる。それらはキチンと説明している。
- ・ 論文の手法は参考にされている。アフリカのサンプルや、ヨーロッパのサンプルといった手に入りにくいものが今海外で調べられているので、データが蓄積されるだろう。

#### ④病原体としての性質、多様なハプロタイプの意味、

- ・ 今のところ野外で大量死した事例は報告なし。
- ・ ハプロタイプと病原性にリンケージがあるかという質問はよく受けるが、今のところ、分離できているのが A タイプと C タイプ、シリケンイモリから分離した A/T のヘテロのみ。
- ・ これだけハプロタイプがあるということが、病原性にどう反映するかということ調べないといけない。分離培養株をどう増やすかということに尽きる。
- ・ ITS はマルチコピーで基本的には変異が多い。場合によっては一個体の中にも変異があって、今回の解析にも一部そういうコピーは含まれているだろうが、なぜかきれいに出る。要するに一個体に一系統しかのっていない。

#### ⑤さらに解明すべき点

- ・ 基本的には、協調進化といってマルチコピーの一つが優占すると、そのコピーに固定される性質がある。シリケンイモリから非常に多くのハプロタイプが見つかり、しかもヘテロが出てくる。ヘテロがあるということはツボカビが有性生殖している可能性が高い。論文にも書いた。
- ・ 本土と沖縄で同じハプロタイプが出ているのは気になるが、解析領域をもっと広く長くみれば分化が見られることが期待できる。
- ・ (系統樹は) 系統関係は必ずしも示していない。見ている領域が短いうえに、insertion, deletion という一塩基置換とは違う変異を見ているので進化年代は測れない。我々としては見やすくするために、単純に変異を並べただけ。今の段階で A タイプは全て同じタイプ、という見方は困る。細分化されたものはあるだろう。
- ・ ゲノムはカリフォルニアで調べられている。そういう情報を利用してプライマーは作っている。ただ、アイソレートされた DNA は増やせるが、野外のものはたぶん孢子 1 個か 2 個なので増やすのは大変だ。
- ・ ゲノム情報からは種特異的配列はあると思われるが、海外で登録されたゲノム情報も A タイプだ。要するに海外でアイソレートされているのが A タイプもしくはそれに類するタイプのものばかりで日本のツボカビの変異を反映するかはやってみないと分からない。

#### ○カエルツボカビの感染実験のその後

- ・ ベルツノガエルと沖縄のシリケンイモリと一緒に飼うと簡単にホストスイッチ起こす。奄美産のシリケンとでは 100 日以上飼っても感染しない。10 日で感染してボロ



ボロになるが、ベルツノガエルは死なない。成長には有意差がある。死なないから影響なし、というよりは野外ではこれだけの適応度差は大きな淘汰圧になる可能性はある。有害であることは間違いない。

- ・ヌマガエルでの感染実験では、感染は成立するが脱皮障害は起こらない。普通に元氣。抵抗性を持っているのだろう。
- ・感染実験で使っているのはAタイプとTタイプ。どちらも発症するから、AタイプとTタイプは有害だろう。麻布の実験からするとCも有害か。

#### ○国立環境研究所における今後の調査研究の予定

- ・病原株を増やす。培養は稲葉先生頼りになる。こちらでサンプルを一生懸命集めて病原株を単離してもらえない。
- ・世界中のカエルツボカビのDNAを集めて、グローバルマップをつくることでより一層起源を特定する。アフリカ、ヨーロッパはデータが集まるが、問題はむしろアジア。輸入される両生類で調べるとしても、輸入量は多くはない。
- ・南米産はどうなっているかも気になる。輸入してくるカエルを調べてみると、ほぼ100%感染している。南米で相当出ているのではないか。AとLタイプ
- ・ホストそのものと共進化の関係も今後の課題（例：アマガエルで韓国と日本と感染率が違っている原因：沖縄の奄美出シリケンイモリの感染率が違っている原因：オーストラリアや中南米の両生類とアジアの両生類の遺伝的進化の違いとカエルツボカビの関係。※川村智治郎ら（1972）によれば広島、対馬、韓国のアマガエルには軽度の雑種致死があるとのこと（自然環境研究センター註））
- ・ミトコンドリアDNAも少し調べたい。ただ、海外で調べた結果では、全く変異がないって言っている。
- ・オオサンショウウオの持つカエルツボカビが病原性を持つかも重要。感染実験できればいいが。

#### <実態解明と技術的な課題について>

- ・現状を見る限り、日本のカエルには抵抗性があり、概ね大丈夫だろう。パンデミックが起きるならとっくに起きているはずだ。ただ、大丈夫だと言い切れないのが困る。
- ・幼生期なり孢子なりのステージがある種は結局目に見えない。世界的に見ても出来ているところは少なくて検疫そのものに限界がある。ニュージーランドやオーストラリアは結構厳しいから、そういうところで何をやっているか、情報は仕入れるべきだろう。ただ、答えがはっきりしているのは、消毒などのために絶対薬を使うから、日本には合わないだろう。
- ・あまり必要性のない輸入品（花卉類など）の輸入が増えている。なくても困らないようなものを輸入するのはいかがか。ハダニなどが入る。
- ・植物防疫（農水省）との協力が必要だ。
- ・「見えない外来生物」の対策の考え方について、カエルツボカビはともかく、次回同じような感染症が発生したらどうなるかは分からない。動物の輸送監視、いった

ん買ったものは野外に放すな、という基本的なところに帰着する。

## 6) 平良眞規氏

### ①文献情報の整理

[カエルツボカビ・ラナウイルス等に関する文献をご紹介いただき、重要なものについては解説していただいた。また、そのいくつかについて見解をいただいた。]

#### 《感染症一般》

- ・ ダイヤモンド (2000: 銃・病原菌・鉄. 草思社)

#### 《カエルツボカビについて》

- ・ Rothermel et al. (2008: Dis. Aquat. Org., 82, 3-18)
- ・ Yang et al. (2009: Dis. Aquat. Org., 86, 9-13)
- ・ Goka et al. (2009: Mol. Ecol., 18, 4757-4774)

#### 《ラナウイルスについて》

- ・ Gray et al. (2009: Dis. Aquat. Org., 87, 243-266)
- ・ Teacher et al. (2009: PLoS One. 4, e4616)
- ・ Robert et al. (2007: J. Wildl. Dis., 43, 645-652)
- ・ Majji et al. (2006: Dis. Aquat. Org., 73, 1-11)
- ・ Miller et al. (2009: J. Wildl. Dis., 45, 314-324)
- ・ Mazzoni et al. (2009: Dis. Aquat. Org., 86, 181-191)
- ・ Ariel, et al. (2009: 85, 7-14)
- ・ Balseiro et al. (2009: 84: 95-104)
- ・ Cunningham et al. (1996: Philos. Trans. R. Soc. Lond. B, Biol. Sci., 351, 1539-1557)

### ②カエルツボカビに関する現状の認識 (アフリカツメガエル研究会 (XCIJ)<sup>2</sup>の見解)

- ・ 国立環境研究所による研究は、日本国内には古来より多様なカエルツボカビが広範囲において生息している可能性が極めて高いことを示している。
- ・ XCIJでも、生物実験用のアフリカツメガエルが問題を起こさないことを証明するために、矢尾板氏 (広島大学) が担当となって調査を行なった。カエルツボカビに感染したカエルの飼育水を使って行なった感染実験では、在来種のカエルに対してツボカビには急性かつ致命的な病原性がない可能性を支持する結果を得ている。ヌマガエルに関してはアフリカツメガエルと同じ部屋で飼育しても異常が起きないことを10年以上に渡って経験している (この結果は、平成19年11月の検討会でも発表した)。その後の追加実験は行っていない。
- ・ 麻布大グループも同様の実験を行なっていたが、前回の検討会の時点では、死亡例はあるが感染個体の致死率が特に高いわけではない、という結果だったと記憶している。

---

<sup>2</sup> アフリカツメガエル研究会 (XCIJ) は、アフリカツメガエルを材料に研究を行なう生物学者による組織である。平良氏はXCIJ内に設けられたツボカビ対策委員会の委員でもある。

- 国立環境研のホームページ  
 (<http://www.nies.go.jp/kenkyusaizensen/200810/200810.html>) には、日本国内のほぼ全ての両生類が既に耐性を獲得している可能性が高いこと、過去にツメガエルが放流された自然池において、他の両生類の大量死の報告は存在しないこと、が記述されている。
- XCIJ が設けたツボカビ対策委員会では、カエルツボカビに関する既存情報を整理し、一連のカエルツボカビ問題に対する見解をまとめ声明文を発表した（参考資料；51ページ）。  
 →「少なくとも日本国内でアフリカツメガエルがカエルツボカビ菌の媒介者となって他の両生類を絶滅させる可能性は極めて低い。今後とも、時期尚早な結果発表や行き過ぎた報道などが研究や教育に大きな被害をもたらすことが無いよう十分注意する必要がある。」  
 (<http://www.ipc.shizuoka.ac.jp/~ehkurod/xcij/news/tsubokabi.html>)
- 日本ではツメガエル養殖が始まってから 50 年経つ。明治時代移入されたウシガエルは現在ではすでに生態系に組み込まれている。そのため、両種と在来カエル類の間には落ち着いた関係が築かれているはずだ。両者の間での病原菌のやり取りが原因で、今後、大きな問題が発生するとは考えにくい。
- たとえカエルツボカビが分布していたとしても、日本のカエル類はそれに対してある程度の免疫を備えているであろう。今後、大きな被害をもたらす恐れはないと思う。
- カエルツボカビが国内から発見された当初、両生類絶滅というセンセーショナルなフレーズが使われて大騒ぎになったが、いまとなつてはそれが誇張に過ぎず、様々な人を混乱させたことが分かる。
- アフリカツメガエルの危険性を騒ぎ立てると、養殖業が衰退してしまう恐れもあるので、ツメガエル研究者としては心配している。

### ③ラナウイルス等、その他の両生類の感染症について

- ラナウイルスにも複数のタイプがあるはずだ。単純にひとくくりにするのは問題だろう。
- 現在はカエルツボカビが注目されているからそれが目立つだけで、感染症はそれ以外にもたくさんある。ラナウイルスも調べれば出てくるかもしれない。
- ウイルスは変異し続けるので、それに耐性のない個体が大量に死ぬのは驚くことではないと思う。自然現象の一部である。
- 集団が接触する際には病気の伝播が生じる。それによる個体の死亡は必然である。
- 新たなウイルスはいくらでも出てくる。それを止めるのは難しい。
- 感染症が原因で両生類の大量死が起こっている可能性はある。しかし、死亡するのは体調が悪くなった個体だけかもしれない。
- Teacher et al. (2009) は、ラナウイルスによるカエルの大量死があった場所では、その後耐性をもつ個体が出現したことを示している。こうした個体群は、おそらく遺伝的には均質化してしまっているが、現時点では耐性をもっていることになる。

おそらく、自然下ではこうしたことの連続なのだろう。

- Robert et al. (2007)は、アフリカツメガエルはFV3に耐性を持っていることを示している。FV3が他の両生類に大量死をもたらすかどうかは分かっていない。
- Gray et al. (2009)は、1990年初頭からラナウイルスによる両生類の大量死が発生していることを述べている。しかし、大量死がウイルスの強毒化により最近始まったことなのか、昔からくり返されてきて最近認識されたのかが不明である。既に耐性のある種がいることも分かっているので、新種のウイルスの出現が両生類の絶滅につながるのではないと考えられる。両生類が出現した3.7億年以上前から今日に至るまで、常にウイルスは存在してきたにもかかわらず、両生類が絶えることはなかったことから、そのことは支持される。

#### ④実験用アフリカツメガエルの状況

- 実験に使用するアフリカツメガエルは、遺伝的にヘテロな野生型である。そのため、実験結果は個体によって変わるの普通である。我々の研究ではそうした個体変異に依存しない結果を真としている。目的にもよるが、ふつう系統管理の必要はない。
- 発生過程の実験に使う卵は病原体には感染していないため、たとえ親個体が病原体に感染していても、実験に不利益があるわけではない。
- アフリカツメガエルの場合、SPF (Specific Pathogen Free) 化にはコストがかかるが、それによる利益はほとんどない。現時点でSPF化の必要はないと考える。
- アフリカツメガエルはラナウイルスに耐性を持つので死亡することはないが、キャリアには成り得るだろう。
- 研究機関の飼育条件下であれば、アフリカツメガエルがラナウイルスなどに感染する可能性は低い。しかし、養殖場で感染した個体が流通する可能性はある。
- 研究者は、業者から購入した個体について、検疫等の措置はしていない。
- ある研究室で飼育しているカエルを調べたら、ツボカビは陽性だった。しかし個体は健康だった。
- カエル類にとってツボカビは共生者ではなく寄生者だ。いないに越したことはない。
- 養殖用のツメガエルは、南アフリカから定期的に輸入している。最近動物の輸入が難しくなっているという話はあるが、現状は分からない。
- 飼育下でのカエル類の病気は昔から知られている。アフリカツメガエルにとっては、レッドレッグや寄生虫などが恐れられている。いずれも以前からある病気だ。カエルツボカビやラナウイルスを除けば、最近になって騒がれ出したものはない。

#### ⑤カエルツボカビ・ラナウイルスなどの対処として今後実施すべきこと

##### <基本的な考え方>

- 生物を扱う以上、カビやウイルスなどによる病気は必ず存在する。また、その多くには致死性がない。病気をひとまとめにせず、病原性の強さを応じた議論をすべきだろう。
- 病気のリスクとその対策にかかるコストの両者を鑑みて、どこで折り合いをつけるか決めることが重要だろう。

- ・ 実験生物学でアフリカツメガエルを使用できなくなることの科学的損失は大きい。科学はいったん途切れると、ブランクを取り戻すのは難しい。そのコストについては重視すべきである。
- ・ 対策は希少種を守るという意味では重要だろう。しかし、地球の歴史をみると、種はいくらでも絶滅しており、自然下での種の絶滅は普通のことだ。
- ・ 野生生物の大量死という点では、病原体よりも、生物学的要因（環境破壊）の影響が大きい。
- ・ 日本の場合は、いたるところに希少種が生息しているが、それらを絶滅危機に追いやったのは感染症ではなく環境問題だ。そちらへの対策に注力すべきだろう。

#### <今後の対策>

- ・ 感染症の蔓延を防ぐことは大事だろうが、それを実行するのは難しい。コストとベネフィットの関係で議論すべきだろう。
- ・ 規制だけが進むと、弊害の方が大きい。
- ・ 野生生物と、人や産業動物とでは扱いが違うはずだ。人間の新型インフルエンザが流行った際の対応はある程度妥当だったと思う。しかし、それを野生生物にあてはめるべきではない。
- ・ カエルツボカビ問題への対応を反省すると、正確な情報の共有が大事であることがわかる。何かしらの対策を考える際には、科学的根拠に基づいて議論すべきだ。病気の危険性についても、データによる裏付けが必要だ。
- ・ 野外から得られるデータだけから病気の危険性を調べるのには限界がある。室内実験で補うべきだ。
- ・ 両生類の飼育水が都市下水に直接流れている場合は、特別な処理をしなくてもよい。世界の研究室でも特別な処理をしているという話は聞いていない。飼育水を常に消毒した場合、逆に消毒液で河川汚染を起こす恐れがある。リスク評価をいかに正しく行うかが重要である。

#### <販売個体の消毒義務化>

- ・ 研究と商業的なものと切り分けるべきだ。
- ・ ペットとして扱われる個体は、販売流通時に、様々な他の生物との接触がある。健康な個体の販売は営業レベルでも重要なので、消毒をした方がいいのかもしれない。
- ・ 病原体は今後も入ってくる可能性があるので、一般の人に普及啓発することは大事だろう。ペットを対象とした規制は、飼育の常識（野外放逐の禁止、異なる種を混在させることの危険性、死亡個体の埋葬の禁止など）を定着させるのにも役立つのではないか。

## 7) 福山欣司氏

### ①カエルツボカビに関する最新の知見の整理

- ・ Goka et al. (2009, Mol. Ecol. 18: 4757 - 4774) の研究は、国内へのツボカビの在来分布の可能性を示した点で重要である。ただし、遺伝解析の結果と病原性との

関係についてはまだ明らかになっていない。

- ・ 国内から見つかっているカエルツボカビが、海外で被害を出しているものと同じ性質をもつかどうかは重要な問題であるが、個々のハプロタイプの性質については全く調べられていない。全体として、カエルツボカビの生物学的特性は、依然として分かっていないことが多い。
- ・ 現時点では、在来のカエル類全てがカエルツボカビ耐性を持っているとは断定できない。同じAタイプでも、海外で蔓延するAタイプは、感染をくり返す過程で性質が変化している可能性も考えられ、国内に侵入してくると在来種に感染が広がることも考えられる。国内の分布状況を把握するためには、継続して詳細な調査を行なう必要がある。サンプルの採取地点や採取時期を考慮する必要がある。
- ・ ツボカビがウシガエルから検出される事例が多いのは、ツボカビがウシガエルの体表全体に寄生しやすいからではないか。在来種では、体の一部についていても全身には広がらず検出しにくい可能性もある。

### ②感染実験（松井久実氏〔麻布大〕と進めている実験）の状況について

- ・ ハプロタイプごとの病原性を評価する上で、在来種を対象とした感染実験は重要だ。これまでの実験では、感染個体が発症・死亡しないなど、実験前には予想していなかった結果が出ている。これは、カエルツボカビには特殊な生物学特性がある可能性を示しているのかもしれない。昨年の実験では、冬になって感染個体が立て続けに死亡したが、発病には季節性などが関係するのではないだろうか。
- ・ ヌマガエルは感染すると死亡するようだ。これには、東アジアに広域分布する本種の特異な生物地理が関係しているのかもしれない、他種とは別に考える必要があるだろう（日本のヌマガエル個体群は古い時代に移入されたものという仮説もある）。
- ・ コガタハナサキガエル、ヤエヤマハラブチガエルは、感染させると死亡するようだが、これには実験作業上の問題（八重山産の種にとっては飼育温度が低い）が関係しているのかもしれない。
- ・ 現在の実験系では、カエルにツボカビを接種して経過を観察している。この方法では、野外でどのように感染が成立しているか調べることができない。感染経路も含め、感染が成立して発症する要件の解明は重要だろう。

### ③これまでのカエルツボカビ対策について

- ・ 国内からの発見当初から、実態の解明が大事であることは様々な人が言っていた。現在でもその考えは変わらないだろう。しかし、現時点ではまだ検証の段階にあるため、カエルツボカビの対策について結論を出すのは難しい。
- ・ 現在、カエルツボカビ対策の危急性についての認識は、大きく変わってきている。一方で、ツボカビ発見当初に作成された対策案は、現在もそのまま引き継がれている。運用面で弊害も出てきている。
- ・ カエルツボカビへの対策においてリーダーシップをとるべき環境省のスタンスは、定まっておらず、常に場当たりのように思う。法整備等による対策もなかった。国内からカエルツボカビが検出されて初めに騒ぎだしたのは学会や環境保護団体、

次にマスコミだった。既に社会問題化してしまった後だったので、環境省にとっては対応が難しかったのかもしれない。

- ・ カエルツボカビ発見当初の 2006 年に緊急事態宣言が出されたが、現在もそれが変更されることなくそのままになっている。宣言を出した関係者は、これまで被害が全く出ていないことから、薄々大丈夫そうだという感覚は持っている。その一方、情報自体が少ないので、対策の見直しについては言い出しにくくなっているのではなか。

#### ④フィールドワーカーの取組、現在実施されていること

- ・ カエル探偵団には、情報提供を呼び掛け始めてから半年から一年位の間は、野外での死亡個体の発見情報が寄せられた。それらの検体については、宇根有美氏（麻布大学）によって解析されて、一部からはカエルツボカビ（Dタイプ）の遺伝子断片が検出されたとされた。しかし、病理学的にカエルツボカビ症と診断されたサンプルはなかった。
- ・ これまでツボカビ症が原因で死亡した個体は、野外から見つかっていない。
- ・ 一斉分布調査では非常に沢山のフィールドワーカーの協力が得られ、そのお陰でたくさんのサンプルが集まった。しかし、学术论文の著者ばかりが評価されており、フィールドワーカーの協力が忘れ去られている。一斉分布結果について、調査協力者へのフィードバックがほとんどなされていない。事業報告書はインターネットで閲覧できるようだが、そのことも周知されていない。

#### ⑤八重山での対策

- ・ 八重山諸島（西表島）では、カエルツボカビの殺菌を目的として消毒薬（オスバン）が大量に使用されている。この先も消毒薬を流し続けるのは環境にも問題を起しかねない。ツボカビの殺菌には海水（食塩水）を代用できるようだ。海水の有効性に関しては宇根氏・松井氏（麻布大学）が実験しているので、その結果をもとに検討してもらいたい。
- ・ 対応全体を見ても、現在は単に作業として行われているようになってきており、問題意識自体が低下している。消毒マットの管理もおざなりになってきているようだ。

#### ⑥その他のカエルツボカビ対策に関して

- ・ ペット飼育されている個体がツボカビを保有している場合もある。しかし、どの段階で感染したのか分からないので、飼育そのものを規制しても感染を防ぐ効果はそれほどないだろう。
- ・ 生態学的に調査を進める必要がある。日本のカエル類とカエルツボカビが進化的に共存関係にあることが事実でも、両者の間にはせめぎ合いがあるはずだ。現在、私たちは季節性という観点からそれを調べている。
- ・ 現在の様々な面から行われている研究は、研究レベルでの話でしかない。環境省が全体を取りまとめて対策を決定するという性質のものではないだろう。

#### ⑦ラナウイルスに係る現状の認識

- ・ ラナウイルスの情報は個別に自治体関係者や一部の研究者に報告されるだけなので、全体での発生状況は分かっていない。ラナウイルスの発生は淡水魚の養殖業にも影響するため、情報を公開できない場合があるようだ。
- ・ ラナウイルスが原因と思われるカエルの大量死亡の事例があるようだ。死亡するのはオタマジャクシと変態過程の幼体（カエルジャクシ）だけのようだ。また、野外で死亡しているのはウシガエルだけで、在来種では死亡事例の報告はないようだ。
- ・ 野外での大量死発生が秋に偏っている。ラナウイルスの分布域や在来種の感染状況を知るためには、秋にサンプルを採取すればよいのではないか。
- ・ 秋にウシガエルの発症例が多いのは、秋になるとウシガエルのオタマジャクシの密度が高くなることに関係しているかもしれない。近畿地方では幼生で越冬する種は主にウシガエルだが（近畿地方の平野部のツチガエルは激滅している）、関東ではツチガエルがそれに加わる。関東にラナウイルスが広がれば、現在絶滅が危惧されているツチガエル個体群にも影響するかもしれない。
- ・ カエルの幼生は鳥などに食われるので、分布域が拡大しているかもしれない。
- ・ トノサマガエルが激滅している。長野で最近調査を行ったが全く見つからなかった。一見して生息場所の環境はほとんど変わっていないので、ラナウイルスが関与している可能性もある。一方で、本種はたくさん餌を食わなければ生存できないので、昆虫類の減少が関係している可能性もある。昆虫類の減少には農薬が関係しているのではないか。

#### ⑧ラナウイルスの対策について

- ・ 大事なのは、フィールドワーカーへのきちんとした対応だろう。一般からの報告を待っているだけでは情報収集は進まない。積極的に情報が集約する道筋を作っておくべき。各地のフィールドワーカーとの連携は重要だろう。ラナウイルスに関しては、ツボカビと同じにしてはならない。情報共有とフィードバックをきちんと行わなければならない。
- ・ カエルツボカビの全国一斉調査でわかったのは、草の根の協力者がいることだ。こうした協力者の所在を把握しておくことが大事だろう。協力してもらえる個人や機関には、情報共有をきちんと行なって連携を図っていくべきだ。
- ・ 環境省ではモニタリングサイト 1000 という事業を行なっているはずなのでも、そうした事業と連携してしっかり情報収集をしておいたらいい。

#### ⑨その他

- ・ 水田というカエル類の生息場所が激滅している。稲の品種が変わり農法が変わってきていることも影響していると思う（中干しの時期など）。水田環境の変化は全国的な問題になっている。
- ・ カエル類の生息状況に関するデータは少ないが、水田面積からある程度推測できるのではないか。
- ・ アライグマが増えている。2年ほど前から私の調査地（町田市）にも入り込み、そ



の後アカガエルが減少した。トウキョウダルマガエル（水の中にいる）は残っている。横浜では分布が広がっていて、円海山周辺ではヒキガエルも捕食されている。

- ハクビシンも増えている。ハクビシンがカエルを食うかどうか分からないが、影響が懸念される。
- カエル類は、水辺にいて捕食されやすい。武器を持たず、外来の捕食性動物のターゲットになりやすい。
- 感染症など、対応の仕方が分からない目に見えない外来生物の危険性は、見えるものより深刻に考えるべきだ。決して放置してよいものではない。生物多様性の保全を謳うのであれば、目に見えない生き物の脅威にも触れるべきだ。
- 野生動物の感染症を考える上で、産業への影響の程度で議論するのは、スタンスとして間違っている。特定外来生物以外にも、病原生物に対応するための法整備は必要だろう。

2009年6月16日

## ツボカビとアフリカツメガエルの関連性に関するXCIJの見解

アフリカツメガエルが、日本国内において、カエルツボカビ菌を拡散させ、多くの両生類を絶滅に導く可能性についてマスコミで報道されました。しかし昨今ではこれに対して否定的な見解が主流を占めるようになってきています。日本ツメガエル研究集会(XCIJ: Xenopus Community in Japan)におきましても独自に検討と実験を重ね、やはり否定的な結論が得られましたので、ここに見解を示します。

この問題は、2006年、両生類特有の感染症「カエルツボカビ症」の原因となるカエルツボカビ菌(学名: *Batrachochytrium dendrobatidis*) が日本国内のアフリカツメガエルにおいて確認されたことが発端となりました。その後、日本の両生類を絶滅に導く可能性として、アフリカツメガエルに社会的注目が集まりました。我々、日本ツメガエル研究集会では、問題視され始めた直後より、その真偽を調査し検討すること、およびもし事実であった場合の拡散防止のため、矢尾板芳郎(委員長・広島大)、高瀬稔(広島大)、浅島誠(東大)、上野直人(基生研)、有賀純(理研)、平良眞規(東大)を構成委員としたツボカビ対策委員会を設立し、本問題への対策にあたってきました。

そして、調査の結果、以下の3点が明らかになりました。

- 1) 日本国内には古来より多様なツボカビが広範囲において生息している可能性が極めて高いこと
- 2) 日本国内のほぼ全ての両生類が既に耐性を獲得している可能性が極めて高いこと
- 3) 過去にツメガエルが放流された自然池において、他の両生類の大量死の報告は存在しないこと

独立行政法人・国立環境研究所の報告でも「日本及び韓国でも在来種個体から多数のカエルツボカビ系統が検出されている。しかし、両国では野生カエル個体の被害は殆ど報告されていない。(一部抜粋)」としています。これらの結果より、少なくとも日本国内において、アフリカツメガエルがカエルツボカビ菌の媒介者として、他の多くの両生類の絶滅を導く可能性は極めて低いという結論に至りました。今後とも、時期尚早な結果発表や行き過ぎた報道などにより、研究や教育に大きな被害をもたらすことが無いよう十分に注意を払う必要があります。

日本ツメガエル研究集会 (XCIJ) ツボカビ対策委員長 矢尾板芳郎 (広島大学・教授)

日本ツメガエル研究集会 (XCIJ) 代表 浅島誠 (東京大学・名誉教授)

## 2. カエルツボカビ症等に関する文献調査

カエルツボカビ症およびラナウイルス感染症は国際獣疫事務局 (OIE) の国際水生動物衛生規約 (Aquatic Animal Health Code) に掲載され、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的な取り組みの対象となっている。この二つの疾病を中心に、両生類への影響が懸念される感染性疾病について、昨年度に引き続き国内外の学術論文やインターネットで公開されている報告等の文献を収集し、とりまとめを行った。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. 疾病に関する基礎的な情報

ラナウイルス症について、包括的な総説 (文献 1) が今年度発表された。また、両生類の保全に関する近著では、疾病のモニタリング手法 (計画の立て方、調査上の注意事項等) についてまとめられている (Green et al., 2010)。この中で、両生類の成長段階別に、卵および胚に影響を与える疾患、幼生に影響を与える疾患、変態後に影響を与える疾患というまとめの表が掲載されている。カエルツボカビ症およびラナウイルス感染症は幼生および変態後に影響を与える疾患に含まれているが、ラナウイルス感染症は幼生での死亡率が高いのに対し、変態後の死亡率は低く、カエルツボカビ症は幼生での死亡はなく、変態後の死亡率が高いことなどが示されている。

### 2. 国内外の発生状況等

カエルツボカビの全国調査の結果を国立環境研究所の五箇氏がとりまとめ、日本におけるカエルツボカビの多様性について報告した (文献 2)。この研究によって、日本においてカエルツボカビが常在していることが明らかになり、特に日本固有種であるオオサンショウウオに以前からこの真菌が共生していることが分かった。特にウシガエルは様々なハプロタイプに感受性がある。このことから、国内のウシガエルのカエルツボカビの分布を更に詳しく調べ、常在地と清浄地を明らかにする必要がある。この報告は、カエルツボカビのアジア起源説として注目されている (文献 3)。一方、アジア以外の地域におけるカエルツボカビの系統をとりまとめた報告 (文献 4) も発表された。

アメリカでは両生類の生体取引が病原体の移動を起こしていると考えられていた (文献 5) が、それを証明するような報告が出た。輸入された食用のウシガエルの調査結果で、62%からカエルツボカビが、8.5%からラナウイルスが検出された (文献 6)。そのほとんどがアジア地域 (台湾、香港、中国) であった。上記文献 2 の結果と合わせると、現在までにこれらの病原体の疫学調査があまり行われていないアジア諸国での疫学調査が急務であると考えられた。

また、ラナウイルスに関しては、国内初の感染例がウシガエルにおいて麻布大学の宇根氏により報告された (Une et al., 2009)。

### ○北米における両生類感染症の発生状況

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（U.S. Geological Survey National Wildlife Health Center）は1996年から両生類についてモニタリングを実施している。2008年第3四半期までの調査結果については昨年度の報告書にまとめられている（環境省，2009）。

2008年第4四半期から2009年第3四半期までの1年間の結果（文献7）では、両生類の14例の集団死亡例（4個体以上の死亡）の原因は、7例（50%）がラナウイルス感染、4例（29%）が真菌感染、うち2例はカエルツボカビ症、残り3例は未決または飢餓と報告されている。また、爬虫類5例においても、ラナウイルス感染が2例報告されている。この1年間の大量死としては、ラナウイルス感染症によってカナダアカガエル約5,000匹が死亡した事例があるが、他に、*Saprolegnia* sp. という真菌によってセイブヒキガエルが約100万匹死亡した事例が注目される。

### 3. 日本の野生生物に与え得る影響および対策

#### （1）与え得る影響について

カエルツボカビ症については、2006年から危険性について警鐘が鳴らされ、広く啓発が行われてきた。しかし研究が進むにつれ、日本の自然界には多様な型のカエルツボカビが広く分布していることが明らかとなり、現在までに野生生物に直接の影響は認められていない。しかし国内に存在しない型のカエルツボカビが海外から導入された場合や、自然界で存在しているのとは異なる場所や種に感染が起きた場合などには被害が発生する可能性があり、人為的な病原体の移動の防止に注意し、長期的なモニタリングを実施する必要があると考えられる。

ラナウイルスについては、魚類では国内でも養殖魚などで以前から感染が認められているが、両生類での感染は2009年に初めて、飼育下の個体で認められた。今後、飼育下の個体などから野生下にウイルスが拡散すれば、死亡率が高いこともあり、大きな被害が発生する可能性は否定できない。ラナウイルスについても、カエルツボカビと同様に、防疫およびモニタリングが必要と考えられる。

#### （2）対策について

ラナウイルスに関する対策は総説（文献1）にまとめられている。両生類の感染症防止対策はアメリカやオーストラリアでまとめられてきた（文献8～12）。イギリスでも2008年にガイドラインが出された（ARG-UK, 2008）。2009年にはラナウイルスの消毒に関して実験的検証結果が報告された（文献13）。

真菌やウイルスを人間の介在によって生息地から生息地へ運ばないようにするためには、日常的に靴底や機材・器具の消毒を実施することが必要である。上記の文献から消毒方法について主なものをまとめると以下ようになる。

##### 1) カエルツボカビ、ラナウイルスの両方に有効な消毒方法

- 70%エタノール 1 分間
- 3%次亜塩素酸ナトリウム（漂白剤） 1 分間
- 60℃以上の熱に15分間以上
- ペルオキソ一硫化カリウム（1 mg/ml） 1 分間

\*これらはいずれも両生類に対して毒性が強く（または安全性が未確認）であり、器具などの消毒には使用できるが、生体に接触する部分で用いることはできない。以下の薬品の毒性は上記のものよりは弱い。

2) カエルツボカビでのみ有効性が確認されている消毒方法

- 塩化ベンザルコニウム（1 mg/ml）1 分間
- 塩化ジデシルジメチルアンモニウム（>0.0012%）2 分間

3) ラナウイルスでのみ有効性が確認されている消毒方法

- クロルヘキシジン（0.75%）1 分間

この他に、アメリカ、イギリス、オーストラリアで実施されているモニタリングの事例（文献14～16）、国際的な取り組み（文献17）、検体の保存、送付方法に関する資料（文献18、19）をまとめた。

## Ecology and pathology of amphibian ranaviruses

両生類におけるラナウイルスの生態と病理

Gray, M. J. et al., 2009, Diseases of aquatic organisms, 87: 243–266.

### 要約

少なくとも1990年代初頭から、イリドウイルス科ラナウイルス属のウイルスを病原体とする両性類の大量死が世界的に発生している。この病原体は両生類の複数種で幼生及び成体に感染し、両生爬虫類及び硬骨魚類が保有宿主となっている可能性がある。ラナウイルス粒子の宿主外環境下での生存期間は水系では恐らく数週間かそれ以上である。ウイルスは間接及び直接の経路で感染し、たとえば汚染された水や土壌への暴露、感染個体との軽微もしくは直接の接触、捕食・共食い・死肉食による感染組織の摂取などである。肉眼的病変所見としては、四肢や体幹の腫脹、紅斑、腫脹し脆弱化した肝臓、出血などがある。感受性のある両生類は通常、複数臓器における慢性的な細胞死の結果死亡し、それは感染後数日以内に発生することもあれば数週間かかることもある。両生類でも種によってラナウイルスに対する感受性が異なり、各両生類種と当該病原体との共進化の歴史に関係があるのではないかと考えられる。近年広く発生しているラナウイルスによる両生類個体群の大量死は、恐らく、宿主の抑制された未感作な免疫力、人的ストレス因子、そして新たなウイルス株の導入といった因子の相互作用によるものと考えられる。本総説では両生類のラナウイルスに関する生態学的研究を総括し、発生要因や保全戦略について議論し、将来の研究の方向性について述べる。また、ラナウイルス感染症の一般的な病変や診断法、サーベイランス(監視調査)手法についても述べる。ラナウイルス感染症は国際獣疫事務局(OIE)により届出疾病に指定され、両生類の存続に対する脅威であることから、バイオセキュリティのための予防措置を多くの国が実施し、ラナウイルス粒子の個体群間移動の可能性を低減することを勧告する。この予防措置には、両生類が生息する地上水に接触した靴や器材の消毒や、商業的に輸送される両生類に対する病原体検査などがある。また、天然資源担当機関に対し野生両生類個体群におけるラナウイルスの定期的サーベイランスを確立するよう奨励する。

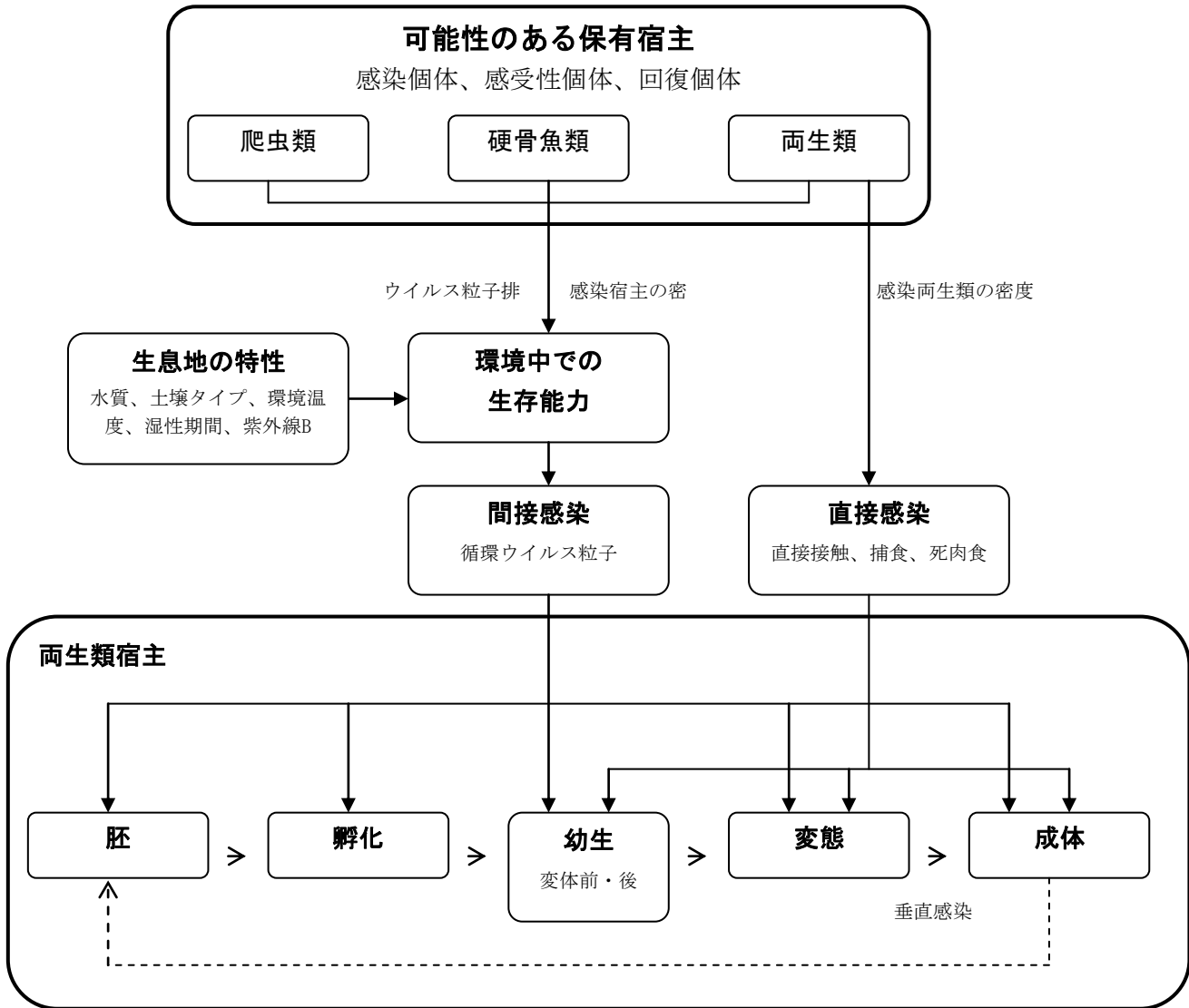
<以下、概要>

### 導入

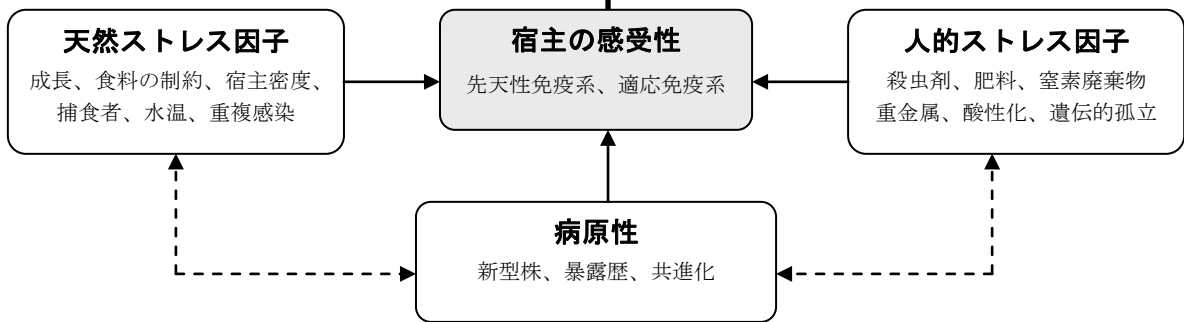
両生類の個体数は世界的に減少している。この中で新興感染症は単一・複数個体群の大量死に関与している。報告されている両生類の大量死事例の殆どがカエルツボカビ症とラナウイルス属による感染症と関連がある。ラナウイルスに関連する死亡事例は世界中で、殆どの有尾目及び無尾目で報告されている。ラナウイルスの生態には、保有宿主となる種、感染経路、環境における生存性、ストレス因子、そして宿主免疫の間の複雑な相互作用が含まれる(図)。

図：両生類ラナウイルスの生態に関する概念モデル

【感染動態】



【感染確率】



## 両生類の大量死とラナウイルス

ラナウイルスによる両生類の大量死はアメリカ、欧州、アジアで発生しており、北米での発生が最も多く報告されている。オーストラリアでも野生下の両生類からウイルスが分離されているが、野生下での大量死は報告されていない。

ラナウイルスは毎年くりかえされる大量死によって個体群構成や種の存続に影響を与えかねず、その脅威は個体数が多くない種で高くなる。

## 可能性のある保有宿主

### 両生類保有宿主

両生類はラナウイルスの主要な保有宿主の1つである。両生類の多くが二相性の生活環を有していることから、両生類の保有宿主は水陸双方の環境で生じ得る。

水環境中では、幼生が一季節以上かけて発育する種や、幼形進化の種、成体が水中生活に特化した種が保有宿主となる可能性が高く、水環境中の幼生及び成体が水系におけるウイルスの維持に貢献している可能性がある。

一時的な湿地や、幼生や成体が水環境では越冬しない両生類個体群においては、変態後の若い集団が保有宿主として重要と考えられており、変態後の両生類が宿主個体群中におけるウイルスの維持に重要な役割を果たしている可能性がある。

ある両生類の種がラナウイルスに持続感染するかそれとも死亡するかは、おそらく種特異的な免疫反応と生活史によって決まる。恒常的な湿地に生息し、幼生が長い時間をかけて発達する種は、複数世代にわたる反復的な暴露により獲得した免疫のおかげで死亡することは少ないと考えられ、これに該当するウシガエルのオタマジャクシはラナウイルスの重要な保有宿主であると考えられる。

### その他の保有宿主

魚類や爬虫類も両生類のラナウイルスの保有宿主の可能性はある。魚類についてはラナウイルスの型と宿主となる魚の種によって保有宿主になるかどうかが決まるようである。両生類のラナウイルスが爬虫類によって維持されるという興味深い可能性が示されているが、更なる研究が必要である。

## 感染

宿主-病原体の動態モデルに基づく予測や病気のリスクを低減する管理戦略の構想には、感染の経路・形態についての理解が不可欠である。感染経路には間接経路と直接経路があり、前者はウイルス粒子の環境中における生存性に依存する。

### 間接感染

成体・幼生が池を利用する両生類では水や底質が病原体伝搬の効果的な経路となる。水環境中に排出されたウイルス粒子は新たな宿主に上皮表面から感染することが示唆されている。

宿主体外におけるラナウイルスの生存性については殆ど解明されていない。トラフサンショウウオウイルス (ATV) は環境中で最長2週間は生存すると考えられている。ウイルス粒子は湿った土壌で生存し、干上がった土地では生存期間が短くなる可能性がある。これとは別に大量死発生中及びそれ以前における環境中のウイルス粒子濃度についての



情報も必要である。

### **直接感染**

ラナウイルス感染により衰弱もしくは死亡した個体を食べることは普通にある。また、幼生が共食いをする種があるほか、多くの両生類が胚を摂食することが知られており、これらの幼生や胚がラナウイルスに感染している可能性もある。また、サンショウウオの幼生や無尾目の変態後の個体の間で皮膚の直接接触で感染が起こることが報告されている。

卵子や精子の両生類体内における感染による垂直感染は証明されていない。

### **ストレス因子**

ストレス因子とは、生体内でコルチコステロイドホルモンを産生させる要因と定義される。コルチコステロイドホルモンは短期的に生き延びるのに役立つが、慢性的にストレス因子に晒されると免疫機構に有害な影響を与える。ストレス因子は免疫機構を抑制することにより病原体の感染率と感染による死亡率を増加させ得る。

両生類の個体群にラナウイルスが感染する際には、以下のような天然のストレス因子と人的ストレス因子が組み合わさって、宿主の免疫力およびウイルスの病原性に影響を与えていると考えられる。

#### **天然のストレス因子**

成長：一般に、変態時の免疫機能は全成長過程おそらく最も低く、病原体への感受性が高い時期である。変態を終えたばかりの若い個体も感受性が高い。その後免疫力は増強し、成体の免疫機能は最も高い。しかしイギリスの無尾目では成体のみでラナウイルスの感染が見られており、さらに研究が必要である。

水温：特に春の早い時期や冬に幼生が成長する種にとってストレス因子となる。低温誘導性の免疫抑制が無尾目の複数種やブチイモリで示されている。また、ラナウイルスの病原性は低水温下の方が高いことも示唆されている。野外でのラナウイルスによる大量死例の多くは夏に報告されているが、これは、調査実施は夏の方が多い、多くの両生類個体数変動の季節性、水温以外の要因などの理由による可能性が考えられる。

捕食の脅威と食料の制約：幼生にストレスを引き起こし得る。

密度：競争によるストレス、あるいは同種・同属間の接触機会増加により密度依存性に感染が増加する可能性がある。

分散：成体にとってストレスとなり、慢性感染を繰り返しウイルス排出が増加する可能性がある。

繁殖：多くの個体が集まることで個体間が直接接触する機会が増え、感染が増加する可能性がある。

#### **人的ストレス因子**

両生類は毒物を取り込んでしまう半透性の皮膚を有しており、水域及び陸域環境におけるストレス因子への感受性が特に高い。

農業による土地利用：湿地帯における牛の放牧や施肥は窒素化合物（非電離アンモニア、硝酸塩、亜硝酸塩）を付加して水質を低下させ、両生類の免疫力を低下させる

可能性がある。牛が利用している湿地は、水質の低下及び草を食べることによる生息地構造の変化が組み合わさることにより、ラナウイルス発生のホットスポットになるかもしれない。高濃度硝酸ナトリウムの存在下ではラナウイルスが不活化されるとの仮説もあり、窒素や肥料の影響に関してはさらに研究が必要である。

農薬：両生類の免疫機能への悪影響、食物網の変化によるストレスが考えられるが、農薬やその分解産物による影響、ラナウイルスの不活化等についてはさらなる研究が必要である。

### その他の人的影響

生息地の分断化：遺伝的孤立による近交劣化や遺伝的多様性の喪失による感受性の増加が考えられるが、大量死により感受性が強いものが選択されるという説もある。

また孤立による感染個体との接触機会の増加も考えられる。

気候変動、オゾン層減少：気温や気候パターンの変化、紫外線の増加等が、高地で人的ストレス因子となる可能性がある。高標高地の方がラナウイルス感染率が高いという報告もあるが、さらに研究が必要である。

新ウイルス株の導入：汚染された水や媒介物、感染個体の釣餌としての利用、非在来種の放流等により起こる。流域間では余暇を楽しむ人や、農民、研究者によって運搬される可能性があり、媒介物としては長靴、釣道具、研究器材、農具、ボート等がある。釣人や餌業者も流域横断的に感染した両生類を運搬している。また、ペット、食料、伝統薬として国家間で生きた両生類の運搬が行われている。（米国の3つの主要輸入港では年平均466万匹のカエルが生体で輸入されているが、そのうち8.5%がラナウイルスに感染している）。

## 病理と診断

野外での症状と肉眼病変：（略）

組織学的病変：（略）

死に至るまでの時間：感染経路と宿主の特性により異なる。アカガエル科のオタマジャクシ2種にラナウイルス感染組織を摂食させたところ、数日後から死亡個体が出始め、90%以上が5日または12日以内に死亡したとの報告がある。一方、上記と同種のオタマジャクシをラナウイルスによる死亡個体に水を介して接触させた場合には死亡までの時間にはより幅があり、4日または6日後に死亡個体が出始め、75%以上が6日または20日以内に死亡したと報告されている。

診断：ラナウイルスの感染とその結果としての疾病（ラナウイルス感染症）を区別するには複数の検査が必要である。ラナウイルスを特定するために有効な診断法は、組織学、細胞学、ウイルス分離、電子顕微鏡、分子生物学的手法（PCR、RFLP、SDS-PAGEなど）がある。多くの検査は生体でも死体でも実施できるが、死体での検査は死後最小限の時間で実施されるべきである。疾病が起きていることの診断は組織学的検査が最良であり、特にどの臓器が影響を受けているかが分かるのはこの方法のみである。免疫組織化学的染色や電子顕微鏡を併用することもある。しかし死体でなければ実施できないことが欠点である。

サーベイランス（監視調査）：病原体のサーベイランスは、疾病監視の基礎である。し

かしながらラナウイルスについて広範囲に積極的な調査が実施されているという情報はない。ただし、米国でテネシー州野生生物資源庁が2地域40カ所で初期的なサンプリングを援助しているほか、ECがラナ・プロジェクトを通じて将来のサーベイランスに必要な枠組みを開発中である。英国では非営利団体がラナウイルスやその他の理由による大量死に関する報告を支援している（文献15参照）。

ラナウイルスの検査として4つの試料が利用されている。全身、内臓、尾または趾端、皮膚のスワブ（ぬぐい液）であるが、全身感染についての証拠が得られる内臓（特に肝臓と腎臓）の使用を推奨する。その他の試料は陽性でも単に体表にウイルスが暴露しただけかもしれないからである。ウシガエルのオタマジャクシを用いた予備試験では、尾端では全身感染に関して20%の偽陰性、6%の偽陽性を、皮膚スワブは22%の偽陰性、12%の偽陽性を示した。従って、死亡個体の回収が困難な状況では、皮膚スワブよりも尾端の検査が推奨される。

ラナウイルス検査のために採集した個体は安楽死し、零下80度で保管するか、95%エタノールで保存する。凍結と融解の反復は検査の正確性に影響を与えるため、試料は検査まで凍結しておく。

### ラナウイルスの発生

新興病原体は以下のように定義される。

疾病を起こすもので、

- ①最近感染率が増加もしくは地理的に拡大している、あるいは
- ②これまでと異なる宿主から分離された、または
- ③既知の病原体と遺伝的に明らかに異なる。

ラナウイルスに関しては大量死の報告の多くは1990年代半ば以降であり、新興病原体のように見える。しかし調査頻度の増加や診断技術の進歩の影響もあるので調査結果だけから新興病原体と結論づけるのには注意が必要であり、上記のうち2点以上の条件を満たす場合に新興のラナウイルスとすることを推奨する。

新興病原体の発生は新しい型のウイルスの導入による場合と、ストレス因子に伴う宿主の免疫機能低下による場合がある。ラナウイルスの場合はどちらも可能性があり、いずれに該当するかは宿主とウイルスの系統発生学的な一致分析により決定される。

ラナウイルスは複数の種に感染すること、ゲノムの一部が保持されていることから、ラナウイルスの発生はウイルス進化の結果によるものではないと推定されている。しかしながらATV分離株にみられる相当程度の遺伝的なばらつきや宿主変更についての遺伝学的な証拠は、ラナウイルスの急激な進化が可能とする説を支持している。

### 保全

#### **両生類の種の存続に対するラナウイルスの脅威**

複数の流行性疾患モデルは、病原体の感染が密度依存性であれば個体の死により宿主密度の低下がおこるため、地域個体群絶滅の直接原因とはならないと予測する。しかしながら、複数の保有宿主の存在、病原体の環境中での高い生存率、そして頻度依存性の感染様式は病気による種の絶滅の可能性を高め、ラナウイルスー宿主関係ではこれらが

全て該当しうる。ただし、すべての両生類について該当するわけではなく、ATV-サンショウウオ間では保有宿主はほとんど存在せず、環境中のウイルス生存性は低く、密度依存性の感染が認められている。従って、ある両生類の種がラナウイルスにより地域絶滅を起こすか否かは、ウイルスの生存性や感染に影響する両生類の社会構造や生息地の特性に依存している。

### 実施可能な保全戦略

ラナウイルス感染は天然のストレス因子の影響や在来種のウイルス排出により発生することもあるが、人間活動の結果として発生することもありうる。それは多くの場合、人的ストレス因子による免疫抑制や新しいウイルス株の導入が関係しているため、これらを減らす戦略がラナウイルス感染症の人的影響による発生を減少させることになる。

両生類の繁殖地の周囲にかく乱されていない植生を緩衝として設置することが水性環境への人間の影響を最小化するために推奨されており、その幅としては少なくとも30mとの提言がある。著者らは過去に、両生類の繁殖地から20mに電気柵を設置することで牛による影響やラナウイルスの出現を抑える効果があると示唆する報告をした。また、化学物質の利用を無風の日に限定したり、航空機による殺虫剤の散布に際しては両生類繁殖地にかからないようにしたりするといった良識的な農業を実践することで、化学物質によるラナウイルス感染症発生への潜在的影響を低減することができるであろう。

病原体による汚染を削減するための保全戦略も実施することができる。両生類の幼生および成体が垂致死的に（死亡せずに）ラナウイルスに感染することがあることから、流域をまたぐ両生類の輸送は新しいウイルス株の導入を防ぐために規制されるべきである。テネシー州では釣り餌として利用できる両生類は当該流域で捕らえられたものに限られており、これと同様もしくはさらに厳格な規制の適用を奨励する。また、地域的な両生類生体の輸送にはラナウイルス陰性証明書の添付を推奨した。さらに、釣り餌としての両生類の商業的売買は中止されるべきである。両生類の国際的取引については、ラナウイルス検査の義務化を輸出の要件として検討すべきと提言した。

ラナウイルスが両生類の大量死に関連しており、当該ウイルスが垂致死的に感染した個体により運搬されうることから、最近、国際獣疫局（OIE）はラナウイルス感染症を届出病として指定し、国際輸送に際しての両生類の事前検査とラナウイルス陰性申告のためのガイドラインを策定した。また、両生類のラナウイルス感染の診断ガイドラインを準備中である。

ラナウイルスが環境中で比較的長期間生存する可能性があることにかんがみ、両生類が生息する場所の水や土壌に触れた機材の消毒を実施すべきである。70%エタノールがFV3の不活化に有効であったとの報告があるほか、3%漂白剤溶液や0.75% Nolvasan

（2%クロルヘキシジン二酢酸塩）を用いた1分間の消毒がラナウイルスの不活化に有効との報告がある。一般市民にとって機材の消毒は実際的ではないかもしれないが、水域環境で活動する科学者は実践すべきである。

天然資源担当機関は、水に接触した機材やレジャー用品を消毒することが両生類や水生脊椎動物の疾病対策に役立つことを、ホームページやパンフレットで普及啓発することを検討すべきである。

## 研究の方向性

両生類のラナウイルスに関する今後の研究課題として次のようなものがある。

- ・ 遺伝学的研究
  - ・ 遺伝子の機能
  - ・ 遺伝子操作によるワクチン開発など
- ・ ラナウイルス感染症の発生機序。
  - ・ 異なるラナウイルス株に対する種特異的的感受性
  - ・ 大規模なサーベイランスによるラナウイルスの発生と流行に関する調査
  - ・ ラナウイルスの系統発生的解析
- ・ ラナウイルスの生態
  - ・ ラナウイルスの感染経路と環境中での生存様式
  - ・ 両生類の成長段階による感受性の差
  - ・ ストレス因子とラナウイルス感染症発生の関係
  - ・ 他の病原体との相互関係
  - ・ トラフサンショウウオ以外の両生類（アメリカサンショウウオ科や無尾目など）やATV以外のラナウイルス（特にFV3）に関する、宿主-病原体動態の研究
  - ・ 個体数モニタリングと組み合わせた大規模な毎年のサーベイランス。死亡個体の病理組織学的検査やカエルツボカビの検査も併せて実施するのが望ましい。

文献 2

## Amphibian chytridiomycosis in Japan: distribution, haplotypes and possible route of entry into Japan.

日本の両生類ツボカビ症：分布、ハプロタイプと日本への考えられる侵入ルート

Goka K, et al., 2009, *Molecular Ecology*, 18: 4757-4774.

### 要約

日本でカエルツボカビ *Batrachochytrium dendrobatidis* による両生類の重篤な疾患が初めて確認されたのは、輸入されたペットのカエルから2006年の12月に発見された事例に遡る。それがアジアでのツボカビ症に係る初めての報告であった。日本原産のカエルに対するツボカビ症広域感染のリスクを評価するため、本研究では日本の野生及び飼育下のカエル個体群における当真菌の感染実態について調査を実施した。軽度の感染個体をわずか0.001pg (1 fg) のカエルツボカビDNAから検出できるように、2組のPCRプライマーを利用してリボソームRNAのITS領域を増幅するnested PCR法を確立した。ペットショップで売られていた両生類265個体、飼育下繁殖した294個体、北日本から南西日本にかけての野外で採集した2103個体からスワブ（ぬぐい液）を採取した。調査の結果、国内産および外国産並びに野生および飼育個体の双方で感染が認められた。また、PCR産物の塩基配列解析により、カエルツボカビのITS領域内において26種類のハプロタイプが確認され、系統発生的分析により、このうち3タイプはオオサンショウウオ (*Andrias catesbeiana*) に特異的で、在来種

のオオサンショウウオとの間に片利共生関係を確立しているのではないかということが示された。そのほかの多数のハプロタイプは海外からの両生類に感染しており、ウシガエル (*Rana catesbeiana*) で、カエルツボカビの最も高い遺伝的多様性が認められた。カエルツボカビのいくつかの系統については日本在来の両生類に特有のものと考えられたが、多数の外来系統のカエルツボカビは、輸入両生類によってもたらされて続けている。ツボカビ症のリスク管理を改善するためには、当真菌の宿主特異的な感染に対して人為的な攪乱が起こったことにより、カエルツボカビが宿主を替えてしまう危険性について考慮する必要がある。

#### <考察より>

この疾病の感染が世界中に広まった原因として、1) 感染宿主が新たな地域に人為的に持ち込まれたため、2) 環境の変化によって、両生類がもともと常在していたカエルツボカビに対する感受性が高くなったため、という2つの仮説がある。本研究ではこれらの仮説の両者の組合せによって感染が広がったことが示唆された。

本研究で、日本の両生類に感染したカエルツボカビから26種類のITS-DNAハプロタイプが検出され、以前の研究で明らかになっている日本以外の国で発見されているカエルツボカビのハプロタイプと比較すると、日本におけるハプロタイプは多様性が高いことが分かった。日本の在来種の両生類ではツボカビ症の被害の報告がほとんどなく、抵抗性を持つことが示唆される点と考え合わせると、カエルツボカビはアジア起源であるという大胆な仮説が提唱できる。

文献 3

### **Endemic and introduced haplotypes of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Japanese amphibians: sink or source?**

日本の両生類におけるカエルツボカビの固有種と外来種：受け入れ側か供給側か？（文献2に関するコメント）

Fisher M. C., 2009, *Molecular Ecology*, 18: 4731-4733.

#### **概要**

- Goka et al. (2009) はアジアにカエルツボカビが広く存在することを示す最初の報告である。
- 全国的に、在来種・外来種、域内・域外をカバーした体系的な調査結果であることを評価する。
- ウシガエルとアフリカツメガエルに多いことが知られており、日本で外来種のこれらから出ても不思議はない。しかし、さらに多くのハプロタイプが検出され、在来種からも検出されたことは注目に値する。ウシガエルが日本にカエルツボカビを持ち込み、それが日本の固有種で広がったのか？
- しかしデータを見ると、以下の疑問が生じる。

- 1) 沖縄にはウシガエルが生息するようだが、それらには感染がなく、固有希少種のイモリで50%の感染が見られ、4つのハプロタイプが見られる。これらは日本の他の地域のウシガエルで見られ、沖縄では、ウシガエルからイモリに感染し、もとの外来種のウシガエルは（確率論的な個体数変動で）絶滅したのではないかと現状ではわからないが。
  - 2) オオサンショウウオが域内・域外ともに感染している。これは系統解析の結果と合わせると議論の余地のあるものである。系統解析の結果では、これらは他の種や外来種からみつかると大きく異なっているという。これは一体どういう意味か？
- ・ 著者らはまた1902年まで遡った標本の感染の事実（未発表）も述べている。もしそうであれば、カエルツボカビは日本で、いままで記録されたどこよりも長期間、固有であったことを示唆している。これは今まで信じられていたアフリカではなく、日本または他の東南アジアがカエルツボカビの起源ということか？
  - ・ もちろん結論を出すのはまだ早い。
  - ・ 著者らが開発したnested PCR-assayは、特定のリボソームのハプロタイプに偏っていると考えられる。協調進化の断絶により、リボソームDNAの並びがマルチコピーの場合は、カビ個体において異型的である可能性があることに留意しなければならない。そうだとすれば、在来種からのカエルツボカビのもっと多くの遺伝子をシーケンスしなければ真の系統はわからない。
  - ・ James et al. (2009) (文献4) の報告と比べると、日本の「固有の」カエルツボカビが原種なのか、それとも近縁の別種なのか、考えさせられる。
  - ・ また、オオサンショウウオのカエルツボカビが最近の系統よりも病原性が強いのか否かを示すことによって、共進化の可能性なども明らかになるだろう。
  - ・ カエルツボカビがどこから来て、どこへ行くのか、理解する上で重要な貢献である。

文献 4

## Rapid global expansion of the fungal disease Chytridiomycosis into declining and healthy amphibian populations.

真菌性疾患ツボカビ症の、個体数減少している両生類個体群および健全な個体群への急速な地球規模の拡大

James T. Y. et al., 2009, PLoS Pathogens, 5: e1000458.

### 要約

*Batrachochytrium dendrobatidis* によって発生する真菌性疾患ツボカビ症は、個体数が減少している種類にも、明らかに健全な（減少していない）種類にも地球規模で発生している不可解な疾病である。このため、最近発見された場所では病原体が導入されたものであるか、その土地固有のものであるか、が議論となる。本研究では、世界の個体数が減少しつつある集団および健全な集団から採取したカエルツボカビの系統を、17ヶ所の核遺伝子座とミトコンドリアゲノムの大きな断片におけるDNAの塩基配列解析により分子集団遺伝

学的に検討した。その結果、各遺伝子座で配列変化による2個の対立遺伝子しか認められず、DNAの多型性は低かったが、2倍体の遺伝子型は多様であった。遺伝子座の半数は異型接合体の遺伝子型が過剰で、主にクローン的な繁殖モードと一致した結果であった。明瞭な性別は認められないにもかかわらず、遺伝子型の多様性は高かった（59系統で44の独自の遺伝子型があった）。観察された遺伝子型の変異は、減数分裂における組み替えによって異型性が喪失して生じた可能性があることを示した。あるウシガエルから分離された一つの系統は、世界中の試料から得られるのに匹敵する対立遺伝子の多様性を有しており、現在の流行も元をたどれば単一の同型系統の流行であったことが示唆された。これらの結果は、新しい病原体による現在のツボカビ症の流行が、近年、急速にその範囲を拡大していることと矛盾しない。健全な集団と減少している集団の両方に同じ系統が広く感染していることは、疾病の発症は環境要因と宿主の抵抗力次第であることを示唆している。

文献 5

## Amphibian Commerce as a Likely Source of Pathogen Pollution.

両生類の取引が病原汚染源である疑い

Picco A. M. and Collins J. P., 2008, *Conservation Biology*. 22: 1582-1589.

### 要約

野生生物の取引は世界規模で行われている。このような取引は、動物をもとものの個体群から除去するだけでなく、結果として外来種の放逐、導入に結びつくこともあり、その動物が保有していた病原体も導入してしまうことがある。カエルツボカビツボカビ症やラナウイルス感染症などの新興感染症が、このような国際的取引によって両生類に広がり、世界中の両生類の個体数減少や大量死との関連性が議論され、両生類の商取引が病原体汚染の源であるかもしれないことが示唆されている。本研究ではアメリカ西部で釣り餌として流通されているトラフサンショウウオについてPCR法でラナウイルス、カエルツボカビの検査を実施し、釣り餌店の聞き取り調査結果と感染個体のラナウイルスのDNA塩基配列を合わせて、取引によってどのように地理的に移動したかを検討した。また、どのくらいの頻度でトラフサンショウウオが釣り餌として使われ、どのくらいの頻度で釣り場に放されるかを調べるため、釣り人の調査を2回実施し、釣り餌店にも一度仕入れたトラフサンショウウオを野外に放すことの有無について調査した。アリゾナ州、コロラド州、ニューメキシコ州で取引されていたトラフサンショウウオからラナウイルスが検出され、カエルツボカビはアリゾナの釣り餌店で検出された。ラナウイルスは釣り餌取引によって地理的に拡大していた。餌として売られているトラフサンショウウオはすべて野生のものから集められており、一般に東から西へ、北から南へ移動しており、それに伴い様々な系統のラナウイルスも移動していた。また、26-73%の釣り人がトラフサンショウウオを餌として用い、26-67%の釣り人が餌として購入したトラフサンショウウオを釣り場で放しており、4%の釣り餌店で感染個体と一緒に飼育したトラフサンショウウオを野生に放していた。アメリカ西部におけるトラフサンショウウオの釣り餌取引は、両生類とその病原体が取引を通じて



規制なく人為的に移動した場合のなりゆきを理解するための有用なモデルである。

<考察より>

以下の対策を提案する。

- ・ 餌動物（両生類）の収集と移動のモニタリング、
- ・ 釣り餌店で両生類の病原体検査（餌動物と飼育水）を頻回に実施し、釣り餌店に対して病原体フリーの店である許可証を発行する、
- ・ 釣り人と釣り餌店員に対して、取引による両生類の病原体のリスクについて教育する。

文献 6

## Magnitude of the US trade in amphibians and presence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and ranavirus infection in imported North American bullfrogs (*Rana catesbeiana*).

アメリカにおける両生類取引の規模と輸入されたウシガエルにおけるカエルツボカビとラナウイルスの感染

Schloegel L.M. et al., 2009, Biological Conservation, 142:1420-1426.

### 要約

両生類は人為的な生息地の喪失、野生生物の取引や新興の疾病により、世界的に脅威にさらされている。両生類のツボカビ症 (*Batrachochytrium dendrobatidis*) やラナウイルスは生きた両生類の国際的取引が原因で感染が広がっているという仮説を過去に提案した。ウシガエル (*Rana catesbeiana*) は両病原体のキャリアー（保菌者）と考えられているが、生きた商品として世界的に取引され、アメリカの市場では生体が売られている。本研究では、アメリカの主要港3ヶ所（ロサンゼルス、サンフランシスコ、ニューヨーク）において、生きた両生類とその派生品のすべての輸入データを2000年から2005年にわたり入手した。これらの港における6年間の生きた両生類の輸入量は合計2800万匹近くであった。輸入したばかりの市場のウシガエルから試料を採取し、PCR検査を実施したところ、すべての都市のすべての季節において感染が認められ、感染率はカエルツボカビで62% (306/493)、ラナウイルスで8.5% (50/588) であった。本研究によりこれら2つの重要な病原体が市場に輸入されたばかりのウシガエルの生体に存在していることが明白となり、両生類の取引によって新たな地域に導入される可能性が示唆された。今回の結果は、これら2つの病原体が近年国際獣疫事務局（OIE）の報告対象リストにあげられたことを支持するものであり、これらの病原体を国際取引から撲滅する対策を取ることの根拠を提供するものである。

### 概要

ウシガエルの輸入元は、最も多いのが台湾、次にブラジル、エクアドル、中国であった。

## Quarterly mortality reports.

野生動物四半期毎死亡報告

U. S. Geological Survey, National Wildlife Health Center

[http://www.nwhc.usgs.gov/publications/quarterly\\_reports/index.jsp](http://www.nwhc.usgs.gov/publications/quarterly_reports/index.jsp)

2008年第4四半期から2009年第3四半期までの1年間に報告された両生類・爬虫類の死亡事例は以下の表のとおりである。

病因	死亡動物種	死亡数 (推定)	発生時期	発生州
R ; Bd 疑	カエル類、アマガエル類	200	2009年7-10月	アイダホ
未決	ウシガエル	50	2009年7-8月	ネバダ
R ; 飢餓	カミツキガメ	15	2009年7-10月	フィラデルフィア
F <sup>1)</sup>	セイブヒキガエル	100万	2009年7-8月	ワイオミング
飢餓	サンショウウオ類	108	2009年7-9月	ワイオミング
R	ブロンズガエル、ヒョウガエル類、ウシガエル	800	2009年7-8月	ワイオミング
肺炎	アカミミガメ	15	2009年4-5月	イリノイ
F <sup>2)</sup>	チュウブイモリ	7	2009年5月	インディアナ
未決	ミューゼンベルグイシガメ	4	2009年6月～	マサチューセッツ
R	カナダアカガエル	5,000	2009年5月	マサチューセッツ
Bd	ヒョウガエル類	4	2009年4月	ニューヨーク
R	サンショウウオ類、カナダアカガエル、スプリング・ピーパー (アマガエル類)	8	2009年5-6月	テネシー
R	トラフサンショウウオ	15	2009年6月	ワイオミング
未決	ウシガエル	18	2009年1-3月	カリフォルニア
未決	アカウミガメ、アオウミガメ	200	2004年1-4月	フロリダ
Bd	ヒョウガエル類	6	2008年11月 -2009年1月	ネバダ
R	ハコガメ	6	2008年11-12月	メリーランド
R	ヒキガエル類、サンショウウオ類	111	2008年9-10月	カリフォルニア
R	ウシガエル	12	2008年9月	オレゴン

病因 R: ラナウイルス感染 Bd: カエルツボカビ症 F: (カエルツボカビ以外の) 真菌感染 疑: 疑い

1) *Saprolegnia* sp.

2) *Amphibiocystidium viridescens*: 2003年に同定されたメソミセトゾア綱の一種

## Biosafety during Amphibian Handling and Mortality Events.

両生類の取り扱い時および大量死発生時のバイオセーフティー

U.S. Fish & Wildlife Service, Abnormal Amphibian Monitoring-Other Standard  
Operating Procedures

<http://www.fws.gov/contaminants/Amphibian/OtherSOPs.html#BIOSAFE>

Adapted from *How to reduce risks of you transmitting an infectious agent between frogs and between sites* (Spear .R, Berger .L, Hines H, 1998).

<http://www.jcu.edu.au/school/phtm/PHTM/frogs/prevent.htm>

### A. 目的

- 1) あなた（調査担当職員）が病原体にさらされる危険性の減少。
- 2) 感染地内の両生類間での感染リスクの減少
- 3) 非感染地の両生類への（長距離・短距離の病原体運搬による）疾病感染の減少。

### B. 問題点

- 1) カエルに病原性を示す病原体は環境中に存在する。  
－病原体には毒素、細菌、ウイルス、寄生虫、真菌などがある。
- 2) 一つの両生類個体群内における感染率は上昇することがある。
- 3) 疾病は人に感染したり、別の場所の感染していない両生類に感染したりする可能性がある。
- 4) 地域的個体群の減少のような長期的影響を及ぼす可能性もある。

### C. 背景

- 1) 微生物
  - a) 持続性があり、さまざまな自然環境下で存続する。
  - b) 水中や底質、感染したカエルに存在する。
  - c) 感染粒子の数（接種量）によって結果がきまる。  
－微生物の数が少なければ発病しない、あるいは軽度の疾患となる。  
－微生物の数が多ければ急性に発生し、重度の疾患となる。
- 2) 持続性のある微生物の感染力を減少させる方法。
  - a) 対策をしてもすべての病原体を殺したり、暴露を防げるわけではない。
  - b) 病原体の数を減らせば結果が良くなる可能性がある。
  - c) どのような疾病管理対策も費用対効果に基づいて実施する。  
－（絶滅危惧種など）感染予防が極めて重要な場合には、リスクを最小にするために高価で単調な予防法も正当化されることがある。

### D. 感染地内での両生類間の感染リスクの減少

- 1) 病気あるいは死亡した両生類に接触している間、あるいはその後に、感染していない個体に触れてはならない。
- 2) 感染した両生類に対する趾切りなどの侵襲的処置は、感染していない個体の趾などへの病原体の接種を増加させることになる。

E. 感染している両生類に触る時に感染の可能性を減少させる方法

- 1) 手を消毒用の石鹼で良く洗う、または消毒液ですすぐ。
- 2) 個々の動物を扱うたびに、使い捨てのビニール手袋を交換する。
- 3) 両生類の捕獲、取り扱いは個体毎に別々のビニール袋に入れて行う。
- 4) 両生類と取扱者の皮膚または衣類を接触しない。
  - a) 接触した場合には洗えるような、防護服、ウェーダー、ビニールエプロン、つなぎ等を着用する。
  - b) 使用済みの手袋・ビニール袋が未使用のものに触れないようにする。
- 5) 侵襲的処置を実施する場合には、疾病感染のリスクを減少させる。
  - a) 使い捨ての滅菌器具、あるいは使用した器具は滅菌して使用する。
  - b) 感染リスクを減少させるため切開創（趾端やPITの穴）はすべてふさぐ。  
ーシアノアクリレート製剤を使用すると自然治癒するまで傷口をふさぐことができる。
  - c) 洗浄した器具を、（以下のいずれかの方法で）消毒液あるいは沸騰した湯に、決められた時間漬ける：
    - (ア) 70%メタノールに30分間漬ける、
    - (イ) 100%メタノールに漬けてから炎にあてる、
    - (ウ) 1%グルタルアルデヒドに15分間漬ける、
    - (エ) 10分間煮沸する。

F. 両生類を消毒液に触れさせてはならない。

G. 汚染した水または消毒液を水域に流してはならない。

- 1) 水域から少なくとも200m以上離れたところで消毒する。

H. 非感染地への感染拡大のリスクを減少させる。

- 1) 常に、非感染地域（短期的な生息地など）を感染が疑われる地域（持続的湿地帯など）よりも先に訪れる。
- 2) 調査者の長距離移動は新しい病原体を導入する可能性を大きくする。
- 3) 両生類に触れた後は、その場所を離れる前に（手などの）皮膚を消毒する。
- 4) （場所を移動する時に）着替えをし、脱いだ衣類は袋に詰め、（後で）洗濯をする。
- 5) 長靴、捕獲網、機材は目に見えるような泥や汚れを流し落とす。
- 6) 石鹼と水でこすり洗いする（生分解性の石鹼は多くのアウトドア・ショップにある。機材を野外で洗浄する場合は生分解性石鹼の使用が望ましい。下水道設備のある家を利用できる場合は、一般的な洗剤が良い。ヨウ素系の石鹼は使ってはならない。消毒

剤と抗生物質の混合液も使用してはならない。)

- 7) 長靴、捕獲網、機材を5%漂白剤に10-15分間漬けて消毒する。その後すすいではならぬ。次の場所に移動する前に風乾させる。離れた場所で採取を行う場合は、できれば2組の用具を準備すると便利である。
- 8) 車の外側と下側の汚れを落とす。車内に泥や水が持ち込まれた場合は、床やペダルを消毒液でこする。
- 9) 両生類の成体、卵、オタマジャクシを野外で長距離移動して放すことはしない。
- 10) 飼育下の両生類やオタマジャクシを、特に、それらが他の飼育下の両生類やオタマジャクシと接触があった場合には、野生には戻さないように配慮する。
- 11) 貴重な両生類(絶滅危惧種など)を野生に戻す場合には、放す前に疾病専門家による検査を要請する。

(注釈、連絡先等：略)

文献 9

## Hygiene Protocol for the Control of Disease in Frogs.

カエルの疾病管理のための衛生プロトコル

NSW<sup>3</sup> National Parks and Wildlife Service, 2001<sup>4</sup>, Information Circular No.6.

<http://www.marshall.edu/herp/hyprfrog.pdf>

### 1. 序論

本文書は以下の対策について概説している。

- ・ 野生のカエル個体群内あるいは個体群間の病原体の移動を防ぐあるいは減少させる。
- ・ 放逐する前に、飼育下のカエルが感染していないことの確認。
- ・ 非意図的に運ばれたカエルの安全な取り扱い。
- ・ 野生下の病気あるいは死亡したカエルの適切な判別と取り扱い。

#### 1. 1 誰がこの文書を読むべきか？

このプロトコルはカエルの野外調査にかかわる全ての研究者、野生生物コンサルタント、動物調査者、学生を対象としている。また、国立公園野生生物局(National Parks and Wildlife: NPWS)の職員、カエルの飼育者、野生生物の救護組織、爬虫両生類あるいはカエルに関わる団体、動物園職員、その他のカエルを定期的に扱う、あるいは関わる可能性のある人々も本プロトコルを読むべきである。

このプロトコルはカエルの個体群を扱う際に実施すべき予防手順についてNPWSの要望を

<sup>3</sup> NSW: New South Wales オーストラリアの州

<sup>4</sup> 本書は2008年にアップデートされているが、部局名や連絡先の変更が主で、内容は変わっていない。  
(<http://www.environment.nsw.gov.au/resources/nature/hyprfrog.pdf>)

概説したものである。州の野生生物取り扱い許可の新規申請あるいは更新申請の際には本プロトコルの遵守が条件となる。ある特定の研究やカエルを扱う場合にはプロトコルの一部を変更する必要があるかもしれないが、そのような場合には許可申請に変更したプロトコルを添付しなければならない。

## 1. 2 背景

### 1. 2. 1 両生類のツボカビ

種や地域個体群の絶滅を含めた明らかなカエルの減少について、国内外の関心が高まってきた。カエルの減少要因について多数の提案が行われているが、多くの地域での減少パターンは流行性疾患が原因であることを示唆している。近年の研究では、オーストラリアや他地域での減少の多くは水媒介性の真菌 *Batrachochytrium dendrobatidis* が原因であると考えられている。この真菌は一般的にカエルツボカビとして知られており、カエルツボカビ症の病因である。

カエルツボカビはツボカビ門に属する真菌である。この門に属する真菌のほとんどは水中や土壌中に遊離して存在する腐生性真菌で、砂漠や極地域のツンドラ、熱帯雨林などほとんどの環境中で見つかり、重要な一次分解者と考えられている。しかしカエルツボカビはツボカビ綱では特異な寄生生活者であり、オタマジャクシなど両生類の皮膚に侵入し、時に死亡率100%に達するような散発死の原因となる。ツボカビ症はオーストラリアで40種以上の在来両生類で確認されているが、この真菌がオーストラリア固有のものか、外来のものかは現時点ではわかっていない。

カエルツボカビは遊走子で感染し、感染には水の存在を必要とする。感染した両生類から排出された遊走子は同じ水域に生息する他の両生類に感染する可能性がある。野外での感染動態についてはさらに研究が必要である。カエルツボカビは季節的な温度変化や乾燥、塩分、水のpH、光、養分、水の溶存酸素濃度などに影響されることが知られている。

## 1. 3 目的

本消毒プロトコルの目的は以下のとおりである。

- カエルを扱う NPWS 職員、研究者、コンサルタント、その他の個人に対し最善の方法を推奨する。
- 定期的に野外でカエルと関わる仕事をする人々、あるいはカエルツボカビなどの病原体を広める可能性のある湿地や水域環境で活動する人々を対象に、実施可能な戦略を提案する。
- カエルに関する活動を指導したり助言したりしている人々に対して、基礎的な情報を提供する。
- カエルに関する活動に関わる人々に対する取り扱い許可の標準的条件を提供する。
- 動物飼育倫理委員会 (Animal Care and Ethics Committee : ACEC) による研究承認のための検討情報を提供する。

## 2. 調査地の衛生管理

カエルを調査する際には、しばしば複数の調査地を回ってカエルを採集することがある。カエルツボカビなどの病原体の侵入に対し特に敏感な個体群もある。また、景観の中でのカエル個体群の配置によっては、特に感染症が広がりやすくなる。よってカエルに関わる従事者は調査地間の境界線を意識し、感染を広めないような対策を実施することが重要である。

絶滅危惧種や危険にさらされている個体群が生息することが知られている場合は、このプロトコルはきわめて短距離の場所に適用する。すなわち1調査地域であっても、さらに区分して別々の地域として扱うことが必要となることもある。

複数地域を調査する場合は常に、カエルツボカビの感染地域に入る前に、感染が確認されていない地域の調査から開始する。

### 2. 1 調査地の区分

調査地点間の境界線を明らかにすることは難しい場合もある。境界線が明らかな場所もあるが、そうではない所もある。数多くの地点で作業をする場合や、あるいは歩ける距離の間隔の一連の地点で定期的に調査を実施する場合には、境界線の設定が難しい。二ヶ所の間境界の設定方法が地域によって異なることもあり得る。自然地形あるいは人工物が地点間の境界の論理的な目印となることもある。例えば道路、川や海などの水域、生息地環境の大きな変化や流域の境界などである。

**原則として、個別の水域は別々の地域と考える。**

川や流れに沿って、あるいは湿地や連結した一連の池の周囲で作業するような場合は、多くの場合、本プロトコルで一つの地域として扱うことが妥当である。複数の池の間でカエルの自由な交流が知られているような場合も同様である。

河川がいくつもの支流や集水域を持つ場合、あるいは明らかな断絶や分断がある場合には、別々の調査地として設定すべきである。特に、それぞれの地域の間でカエルの交流が知られていない場合はそうである。

### 2. 2 調査地の衛生管理

調査地から調査地へ移動する場合、靴、機材あるいは車による病原体の移動を最小限に抑えるために、以下の予防衛生措置を実施することを推奨する。

#### 靴

**靴は調査開始前および調査地点間で、十分にきれいにし、消毒する。**

まず長靴の泥を落とし、靴底を消毒液に浸す。長靴のほかの部分は洗うか、塩化ベンザルコニウムの消毒液をスプレーする。消毒液は水域に流れないようにする。

“ガムブーツ”あるいは“ウエリントブーツ”と呼ばれる長靴は汚れを落としたり、消毒したりするのが簡単であり、推奨される。

汚れを落とす代わりに、調査地間で履き替えるための替えの靴をいくつか持っていく方が実用的な場合もある。

#### 機材

捕獲網、はかり、ノギス、袋、メス、ヘッドランプ、懐中電灯、ウェットスーツ、ウェーダー等の機材は、一箇所で使用した後、他の地点で再度使用する前に汚れを落とし、消毒する。

可能であれば使い捨てのものを使用する。そうでないものは、一回の野外調査で1回のみ使用して後から消毒するか、複数回使用する間の地点にて、下記の2. 4の方法で消毒する。

#### 自動車

リスクが高い場所では自動車のタイヤに消毒液をスプレーするか、かける。

自動車による疾病の移動が問題となることはあまりないと考えられる。しかし車でカエルの生息地を横断すれば、他の水域やカエルの生息地の泥や水を運ぶ可能性があり、ホイールやタイヤを洗浄、消毒する必要がある。消毒を実施の際には、消毒液が水域に流れ込まずに土にしみこむように、水域から十分に離れた場所で行う。

車のホイールやタイヤの消毒には、“Toilet duck”（商品名、有効成分は塩化ベンザルコニウム）のスプレーが適している。

車に乗る前に靴を消毒することによって、車の床やペダルに病原体が付着することが防げる。

#### 2. 3 野外におけるカエルの取り扱い

カエルツボカビなどの病原体の拡散は、カエルに触ることによって起こる可能性もある。

カエルには必要な場合にのみ触る。

カエルを触らなければならない場合には、以下の方法で病原体の伝播を最小限に抑えるようにしなければならない。

- ・一つの試料（個体）から次の試料に移る際に手を洗浄・消毒するか、または使い捨て



手袋を交換する。最も簡単な方法は、作業場に消毒液の入った容器とペーパータオルを用意することである。

- ・とくに一人がカエルの処理、一人が捕獲というように複数人数で作業する場合、一匹のカエルには一つの袋を使用するようにする。袋は再利用してはならない。
- ・オタマジャクシを採集する場合も、一つの袋に一匹とし、袋は再利用しない。

(注：本プロトコルではカエルツボカビに汚染された池に生息するカエルすべてが感染しているわけではないと考えている。感染を起こす程度に水の汚染度が高くないかもしれないからである。このため、個体間で感染を起こさないように手袋を変えるなどの注意をする必要がある。)

趾切りやPassive Integrated Transponder (PIT)<sup>5</sup>による標識は、カエルの個体間で病原体を感染させるリスクが高い。カエルの体内に直接病原体を入れてしまう可能性があるからである。以下のような器具を用いることによってリスクを最小限にすることができる。

- ・使い捨ての滅菌した器具。
- ・一回使用した後、消毒した器具。
- ・カエルの個体が替わる毎に消毒した器具。

指切りやPITでついた傷は、病原体が入らないようにVetbond<sup>®</sup>などのシアノアクリルレートで覆う。NPWS ACECは、どのような外科的処置の場合でも、その前後に局所麻酔剤のXylocane<sup>®</sup>クリームと消毒液Betadine<sup>®</sup> (1%溶液)を塗布することを推奨しており、その後傷口を覆う。

すべての使用済み消毒液、手袋やその他の使い捨て器具は刃物容器またはその他のゴミ容器に保管し、調査終了後に適切に処分、あるいは消毒する。消毒液は絶対カエルに直接触れないように処理し、どのような水域にも流して汚染させてはならない。

## 2. 4 消毒方法

手および器具の消毒薬は、細菌および真菌の栄養期・孢子期の両方に効果があるものでなければならない。以下の消毒液を推奨する。

- ・クロラミン、クロルヘキシジンが主成分のHalamid<sup>®</sup>、Halasept<sup>®</sup>、或いはHexifoam<sup>®</sup>は細菌・真菌ともに効果がある。これらの製品は手指、靴、器具などの消毒に適している。使用に際しては製品取り扱い説明書に従って希釈する。
- ・漂白剤やアルコール(エタノールまたはメタノール)は適切な濃度で希釈すれば細菌・真菌ともに有効である。しかしこれらの薬品は腐食性、危険性があるため、実用には向かない可能性がある。  
メタノールを使用する場合には以下のいずれかの方法をとる。

---

<sup>5</sup> マイクロチップのような体内に挿入する標識

- 70%メタノールに30分間漬ける。
- 100%メタノールにくぐらせた後、10秒間炎にかざす、または湯で10分間煮沸する。

漂白剤（5%溶液、希釈調整したばかりのもの）はラナウイルスなど、カエルのその他の病原体にも有効である可能性がある。

以上の要領で消毒するのが難しい器具の場合は、70%イソプロピルアルコールをしみこませたワイプIsowipe®を用いて良くふく。

文献 10

## Survival of *Batrachochytrium dendrobatidis* in water: Quarantine and disease control implications.

カエルツボカビの水中における生存率：検疫および疾病管理に関連する意味あい  
Johnson ML, Spear R. 2003. Emerging Infectious Diseases. 9: 922-925.

### 要旨

両生類のツボカビ症は、感染した両生類の取引によって国際的に移動していると考えられている新興感染症である。病因である真菌のカエルツボカビ *Batrachochytrium dendrobatidis* は水生で運動性のある遊走子を作る。遊走子を含む水に両生類を暴露することによって実験的に感染が成立している。しかしながら、この真菌が両生類の宿主がいないう状況で、環境中で生き残る能力については知られていない。本研究では、カエルツボカビが水道水やイオン交換水の中でそれぞれ3または4週間生存することを示した。湖水においては、遊走子添加の7週間後においても感染性が認められた。両生類と接触のあった水の管理における、疾病管理および検疫戦略の策定のために、水が7週間後まで感染性を保ち続け得るという知見は重要である。

### <考察より>

#### 有効な消毒戦略

- 熱 (>47°Cで30分間)
- 塩化ジデシルジメチルアンモニウム (>0.0012%、2分間)
- 次亜塩素酸ナトリウム (>1%、1分間)

文献 11

## Hygiene Protocol for Handling Amphibians in Field Studies.

野外調査における両生類取り扱い時の衛生対策プロトコル

## 一般原則と背景

1. 効果的な野生生物管理は確実な科学的証拠に基づくものであり、その証拠収集のために、時には野生の両生類に触れたり、計測、処置等が必要となる。
2. 衛生対策プロトコルは最善の科学的証拠に基づくべきである。
3. 衛生対策プロトコルはフィールドで実施できるよう実務的でなければならない。
4. 野生両生類は、水や湿った土壌などの環境や他の両生類との接触によって感染症の危険性にさらされているのが常である。これらの経路で遭遇する病原体の数やレベルは、両生類への病原体感染の背景リスクを表すことになる。
5. 野生両生類にとって最も重篤な疾病はカエルツボカビ (*Batrachochytrium dendrobatidis*)によって引き起こされるツボカビ症であり、それほどではないにせよ、ラナウイルスによっておこるラナウイルス感染症がある。野生両生類におけるカエルツボカビ症の発生はオーストラリア東部、アデレード周辺、ウェスタン・オーストラリア州南西部で記録されている。オーストラリアの野生両生類でのラナウイルス感染症の発生は検出されていないが、ラナウイルスの一種、Bohle イリドウイルスは野生下に存在している。
6. カエルツボカビがある水域中に一度入れば、その水域全体に自然に拡散するようである。
7. 両生類に触れるときは、感染症への暴露リスクを、人間との接触なしで通常経験するリスクよりも増加させないような方法で実施しなければならない。両生類を取り扱うことによって自然界に存在するリスク以下に感染リスクを減少させることができるなどと期待してはいけない。
8. 現在のデータでは、オーストラリアや他の国々において、野生下におけるツボカビ症や他の両生類の病原体の感染拡大に科学的活動が重大な役割を果たしたとは言えない。
9. カエルツボカビやその他の両生類の病原体が、車や靴、衣服などによって流域間で感染したという証拠は無い。
10. カエルツボカビは 29°C以上の高温に非常に弱く、32°Cで死滅するため、人の皮膚では生育しない。両生類の他の主な病原体であるラナウイルスも温度に敏感で、33°C以上では生育しない。
11. 完全な乾燥はカエルツボカビを死滅させるがラナウイルスは死滅しない。
12. 病原体の感染の可能性が最も高いのは、両生類が互いに接触する状況にある時、同じ容器に入れられている時、あるいは両生類を収容した後、別の両生類を入れる前に消毒をしていない容器に入れられている時である。
13. カエルツボカビやラナウイルスに伴うリスクを減らすための様々な使用目的のために、科学的根拠に基づく効果的な消毒方法 (表 1 参照) が確立されている。
14. 両生類は皮膚に様々な強力抗細菌物質を持つ。そのため、趾を切っても感染率が低いのかもしい。
15. 両生類は触られた後にストレス症状を表さないようであるが、不必要な取り扱いを避

けるべきである。

16. 接触している時間は可能な限り短時間にすべきである。それは、たとえ大変痛みを伴う処置であったとしても、迅速な処置は長時間のものよりストレス影響が少ない可能性があるからである。

### 具体的な作業方法

1. 両生類の個体に触る場合、個体が変わる度に、その個体が普段生息している水で手を洗えば素手で扱っても良い。これによりカエルへの暴露リスクが環境中レベル以上に上がるのを防ぐことができる。
2. 個体毎に手を洗う水がない場合は、使い捨て手袋あるいは手袋の代わりに使うビニール袋を個体が変わる毎に交換するか、アルコールが主成分の消毒液で手を拭く。
3. 捕獲した両生類を自然に帰す前に容器に入れておく場合は、以前に他の両生類を入れた容器を用いてはならず、容器を再使用する場合は、使用前に表 1 の方法で消毒しなければならない。
4. 趾切りを行うハサミなどの外科器具は、個体が変わる度に、70%エタノールあるいは表 1 の方法で消毒する。
5. 趾切りを行う場合は、趾の遊離した部分の長さの 50%以上を切ってはならない。
6. 両生類の取り扱いは迅速に行い、なるべく早く放すこと。
7. 両生類は捕まえた場所で放すこと。
8. 陸生の個体は、同じ容器に同時に 1 個体以上を決して入れてはならない。
9. オタマジヤクシは通常一つの水容器に複数個体を入れるが、それによる体の接触の増加はない。従って、すべての個体が同じ場所で採集したものであれば、オタマジヤクシは集団で収容できる。
10. 野生下に戻す予定のオタマジヤクシは、同じ水域の別の場所あるいは他の水域で捕獲した個体と一緒に収容してはならない。
11. 1 カ所の水域で使用した外科器具以外の機材は、他の水域で使用する前に表 1 にあげたいずれかの方法で消毒すること。
12. 靴は別の流域、あるいは最初の調査地とは隔離された水域で使用する前に、洗って泥を完全に落とし、表 1 にあげたいずれかの方法で消毒すること。
13. 現時点では、車はカエルツボカビ感染拡大になんら影響のある証拠が無いので、特に対処の必要は無い。
14. 両生類の死体あるいは明らかに病状のある両生類は、外見上正常な両生類よりも感染リスクが高いと見なし、手袋或いはビニール袋で触る。病気あるいは死んだばかりの野生両生類が見つかった場合は、採集、保存して診断に供する。

表 1 : 野外調査においてカエルツボカビまたはラナウイルスの消毒に適した方法。表内の濃度と時間は有効とされた最小値を示した。

使用目的	消毒薬	濃度	時間	効果のある病原体
外科器具あるいはその他の器具（物差し等）の消毒	エタノール	70%	1分	Bd, R
	ビルコン（ペルオキソー硫酸水素カリウム）	1mg/ml	1分	Bd, R
	塩化ベンザルコニウム	1mg/ml	1分	Bd
捕獲道具や収容容器	次亜塩素酸ナトリウム（漂白剤）	1%	1分	Bd
	次亜塩素酸ナトリウム（漂白剤）	4%	15分	R
	塩化ジデシルジメチルアンモニウム	1/1000に希釈	0.5分	Bd
	完全乾燥		3時間以上	Bd
	熱	60℃	5分	Bd
			15分	R
	熱	37℃	4時間	Bd
	滅菌用紫外線照射		1分	R
靴の消毒	次亜塩素酸ナトリウム（漂白剤）	1%	1分	Bd
	次亜塩素酸ナトリウム（漂白剤）	4%	15分	R
	塩化ジデシルジメチルアンモニウム	1/1000に希釈	1分	Bd
	完全乾燥		3時間以上	Bd
布製品（バッグ、衣類等）	湯で洗浄	60度以上	5分	Bd
			15分	R

Bd: カエルツボカビ、 R: ラナウイルス

#### <参考資料>

上記、プロトコルで記述された主要成分を元に、日本で手に入る消毒薬の商品名（例）を表2にまとめた。

表2 消毒薬の主要成分と商品名（例）

分類	一般名	商品名（例）
第四級アンモニウム塩	塩化ベンザルコニウム	ザルコノック、逆性石鹼液、チアミトール、エゾール、オロナイン-K、パラステロール、プリビーシー、ホエスミン、ザルコニン、クレミール、カネトール、ビオシドール、オスバン、トリゾン、ハイデシン、ヤクゾール
	塩化ベンザルコニウム含有石鹼液	シャボーXL
	塩化ベンザルコニウムエタノール溶液	ソグティアンドクリーン、ビオシラビング、ウエルパス、ベルコムローション、カネパス、ネオザルコニンG消毒液、ホエスミンラビング、トリゾンフォーム、トリゾンラブ、ラビネット液、ALクレミール、アルボナース
	塩化ジデシルジメチルアンモニウム	アストップ、カチオデット、クリアキル、クリンエール、クリンジャーム、デスマック、動物用コリノン、トライキル、パンパックス、ベスシール、メイクリアー
クロルヘキシジン	グルコン酸クロルヘキシジン	マスキン液、マスキンスクラブ、ヘキザック、オールカット液、ヒビスクラブ、ヒビテン液、ステリクロン液、マイクロシールド、ネオクレミール、グルクロ、ラポテック液、フェルマジン液、ベンクロジド、アビルテン、クロヘキシジン、クロキジーナ、グリゲン
	グルコン酸クロルヘキシジン-エタノール溶液	ヒビスコール、サラヤンジェル、ヒビソフト、クロヘキシジンアルコール液、ウエルアップ、ネオステリクロンR消毒液、スピーデス、ヘキザックアルコール、イワコールラブ
	グルコン酸クロルヘキシジン含有石鹼液	スクラブイン、クロヘキスクラブ
塩素系 注意:手指の消毒不可。金属腐食性があるので金属での使用不可	次亜塩素酸ナトリウム	ジアクリーナー、ジアノック、ピュリファン、ハイター、キチンキレイキレイ除菌&漂白、ドメスト、ミルトン、ブリーチ、ミルクボン、カビキラー、アルボースキレーネ、ピュラックス、ジアエース、アサヒラック、次亜塩6%「ヨシダ」、バイゲンラックス、バイヤラックス、テキサント、ハイポライト10
	ペルオキソー硫酸水素カリウム	アンテック ビルコンS

分類	一般名	商品名（例）
アルコール系	エタノール	アルベットE、消毒用エタノール、アルサワー、キレイキレイアルコール除菌スプレー、ダイヤコール、消毒用エタプラス、リフレッシュ、アルタン、サニットコール、アルチェック、サポステ、エピケア、ハンドクリーンC、フマキラーアルコール除菌スプレー
	イソプロピルアルコール(プロパノール)	イソプロピルアルコール「長堀」、消毒用イソプロパノール「アマカス」、イソプロパノール「ツキシマ」、消毒用イソプロ「コザカイ」、東豊消毒アルコール、イソプロ「ヒシヤマ」、イソプロ「ヨシダ」、イソプロパノール「アトル」、イソプロパノールワコー

文献 12

## Disinfection of field equipment and personal gear

野外調査機材と個人所有物の消毒方法

Miller D. L. and Gray M. J., 2009, SEPARC<sup>6</sup> Information Sheet #10.

<http://www.uga.edu/separc/TaskTeams/DiseasesParasites/SEPARCDisinfectingGuidelinesFinal.pdf>

### ・ 消毒の重要性

人為的な病原体の伝播（病原体汚染）が世界的に両生類や爬虫類の健康の脅威となっていることが認められてきた。野外研究者が病原体汚染を広めていると疑われている例もいくつかある。カエルツボカビ*Batrachochytrium dendrobatidis*やラナウイルスなどの病原体の拡散防止が進められている状況下で、生物学者や研究者が通常の野外調査中の病原体拡散を防ぐための基本的な消毒作業を行うことは必須となってきた。水域でレクリエーションを行う人々にも、できる範囲で道具の消毒を実施することを奨励する。以下の記述はラナウイルスとカエルツボカビに焦点を置いているが、これらの方法や消毒薬は複数の病原体による病原体汚染を防ぐのに有効である。

ラナウイルスやカエルツボカビの自然環境下での生存に対する知見は限られているが、これらの病原体は宿主体外の水環境中で数ヶ月は生存する可能性がある。魚類のイリドウイルス（EHNV）は水中で約3ヶ月間生存すると報告されている。同じくカエルツボカビも水中で約2ヶ月間生存するという報告がある。これらの報告は両生類の病原体が水中で持続している可能性を示し、両生類が生息している水環境に靴や道具が接触した場合に、病原体を運ぶリスクがあるということを強調している。

<sup>6</sup> Southeastern Partners in Amphibian and Reptile Conservation (SEPARC: 米国東南部両生爬虫類保全パートナーシップ): アメリカの主に両生類保護活動を行っているNGOの南東支部。

## ・ 方法

1カ所の水辺でサンプリング終了後に次の調査地に行く前、あるいは野外調査から戻る前に、すべての調査道具（網、バケツ、水質検査器等）と個人所有物（長靴、ウェーダー等）を（調査地あるいは水道水）水で洗い、すべての汚れや泥を洗い流す。ボートやカヌーの表面も洗う。車やボート・トレーラーのタイヤも、両生類の生息する水に触れた場合は洗う。次に消毒薬で消毒する。消毒の前に汚れや泥を洗い流すことが不可欠であり、それは有機物や土が消毒薬の効き目を減少させるからである。

ラナウイルスの不活化には、漂白剤の3%溶液（有効成分：次亜塩素酸ナトリウム）、0.75% Nolvasan®（有効成分：クロルヘキシジン・ジアセテート）または1% Virkon S®（有効成分：ペルオキソ-硫酸カリウム）が有効であるという報告（文献13）がある。一般的にカエルツボカビの不活化には漂白剤10%溶液が推奨されているが、漂白剤1～4%<sup>7</sup>溶液で十分であったという報告（文献10）もある。これらのことから、漂白剤4%溶液は両者に有効である。またエタノール（70%）も両者に効果的であるという報告がある。漂白剤やエタノール、Virkon®は両生類やその他の水生生物に有毒となる可能性があるため、文献13ではNolvasan®が推奨されている。しかしこの薬物のカエルツボカビに対する有効性はまだ試験されていない。病原体を完全に不活化するためには、消毒薬には最低5分間は接触していなければならない。これは他の調査地に移動する間でも可能である。消毒薬に含まれる化学物質は道具を傷め、水生生物に対して毒性があるので、最小限の消毒時間の後すぐに靴や道具は水道水で洗い流す。消毒薬を散布したり水で流すのに、手持ちのスプレーボトルやポンプスプレーがあると便利である。

調査地から戻ったら、調査道具や個人所有物を水で丁寧に洗い、再度消毒することが望ましい。道具や衣類はつるして完全に乾燥させる。多くの場合、乾燥させることは病原体の不活性化の一手段となる。限られた情報による知見だが、ラナウイルスとカエルツボカビはおそらく完全乾燥後2週間で不活化すると考えられる。漂白剤を消毒薬として使用する場合には、空気、日光、有機物にさらされると分解するので、漂白剤は希釈後5日目以降は廃棄する。

文献 13

## **Efficacy of select disinfectants at inactivating ranavirus**

ラナウイルスに対する消毒薬の効果

Bryan L. K. et al., 2009, Diseases of aquatic organisms, 84: 89-94.

### 要約

ラナウイルスは爬虫類と両生類に病原性がある。宿主体外での生存期間が不明なことから、ラナウイルスの伝搬を阻止するためには器材の消毒が不可欠である。しかしながら、両生

<sup>7</sup> 文献10では1%が有効とあるが、4%については触れられていない。



類のラナウイルスに対する消毒薬（クロルヘキシジン (Nolvasan®)、次亜塩素酸ナトリウム（漂白剤）、カリウム化合物）の効果は調べられていない。本研究の目的は、クロルヘキシジン（0.25、0.75及び2.0%）、次亜塩素酸ナトリウム（0.2、1.0、3.0及び5.0%）、及びペルオキソ-硫酸カリウム（Virkon S®、1.0%）について、1分及び5分の暴露時間におけるラナウイルス不活化の有効性について決定することであった。過マンガン酸カリウム（KMnO<sub>4</sub>、2.0及び5.0 ppm）についても60分の暴露時間で試験した。Nolvasan®の0.75%及び2.0%、次亜塩素酸ナトリウムの3.0%及び5.0%は、1分及び5分の暴露時間ともに有効であった。Virkon S®も両方の暴露時間で有効であった。他方、過マンガン酸カリウムはいずれの濃度でも有効ではなかった。ラナウイルスを1分間の暴露で不活化する最低濃度は、Nolvasan®、次亜塩素酸ナトリウム、Virkon S®について、それぞれ0.75%、3.0%、1.0%であった。

<結果および考察より>

ウイルス力価が最も減少したのは暴露時間1分及び5分ともに次亜塩素酸ナトリウムの3.0%及び5.0%であった。ウイルス力価が3 log<sub>10</sub>以上に減少する最低濃度・最短時間はNolvasan®0.75%の1分間暴露であった。また、次亜塩素酸ナトリウムの3.0%と5.0%の1分間暴露の効果は同等であった。一般論として低濃度の消毒薬は環境への有害性が低く、器材へのダメージも小さい。また、低濃度の消毒薬への短時間の接触は、両生類による消毒薬の潜在的な毒性への暴露リスクを低減させる。このため、クロルヘキシジン0.75%の利用が次亜塩素酸の利用よりも多くのケースで望ましいといえる。1%VirkonS®については両生類に対する毒性が確認されていないので、直接接触する場での使用は避けるべきである。

なお、今回の実験は感染個体が排出するとされるウイルス濃度（10<sup>3</sup>~10<sup>4</sup>PFU/ml）や、両生類のいくつかの種において致死性であったウイルス濃度（10<sup>3</sup>PFU/ml）を遥かに超えるウイルス濃度（10<sup>8</sup>PFU/ml）で行ったため、この結果は殆どの環境や実験状況で適用可能と考えられる。他方で、有機物や無機物の存在下での有効性については調べていないため、フィールドでの適用にあたっては消毒に先立ち器材に付着した土や有機物を洗い流しておくことが推奨される。

さらに、生物学者や養殖業者、動物園などがしばしば用いるその他の化学物質（例えば魚類の外部寄生虫の治療に用いられるホルマリン（150-250ppm）や、魚類のEHNVを不活化することが報告されているエタノールは標本固定に広く用いられている）についても、使用前にラナウイルス不活化に関する有効性について試験しておくべきである。これらの物質はこれまでに評価されたことがないが、もし有効であれば、ここであげた消毒薬よりも適した代替品となるかもしれない。

表：実験に利用した消毒薬の濃度（%）。（ ）内は有効成分の濃度（%）。

消毒薬	有効成分	最低濃度	両生類用推奨濃度	製造者推奨濃度	最高濃度
漂白剤	次亜塩素酸ナトリウム	0.20 (0.012)	1.00 <sup>a</sup> (0.060)	3.00 (0.180)	5.00 <sup>b</sup> (0.300)
Nolvasan®	クロルヘキシジン	0.25 (0.005)	0.75 <sup>a</sup> (0.015)	2.00 (0.040)	NA
VirkonS®	ペルオキソ-硫酸カリウム	NA	NA	1.00 (0.204)	NA
KMnO <sub>4</sub>	過マンガン酸カリウム	0.00020	NA	なし	0.00050

NA: 適用不可、a: Hadfield & Whitakerによる推奨濃度（2005）、b: 米国魚類野生生物局による推奨濃度（2008）

## Amphibian Research and Monitoring Initiative: Concepts and Implementation.

両生類研究調査イニシアティブ ARMI : コンセプトと実施

Corn PS et al. 2005, Scientific Investigations Report 2005-5015. USGS.

<http://pubs.usgs.gov/sir/2005/5015/pdf/SIR2005-5015.pdf>

### 概要

このプログラムが創設された背景として、個体数減少や奇形の現状と原因に関する関心と、情報提供の要請の高まりに応じて、アメリカ議会により2000年に両生類研究調査イニシアティブ (ARMI) が創設された。ARMI計画はアメリカ地質調査局 (U. S. Geological Survey : USGS) と内務省 (Department of the Interior : DOI) 科学研究所が連携して行われている。この計画の最終目的は内務省管轄の土地において両生類個体数の傾向と減少の原因を明らかにすることである。また、この計画は国立公園局 (National Park Service : NPS) や、魚類野生生物局 (U. S. Fish and Wildlife Service : USFWS)、土地管理局 (Bureau of Land Management : BLM) も協力している。USGSはこのような取組を開発し、科学的なリーダーシップを取るのに唯一の適任機関である。というのは、USGSは長期にわたる両生類の生活史、試料採取技術、毒性学、健康関連事項の研究を行っており、また多くの自然資源について地域、国、大陸規模の多くのモニタリングプログラムを実施しているからである。

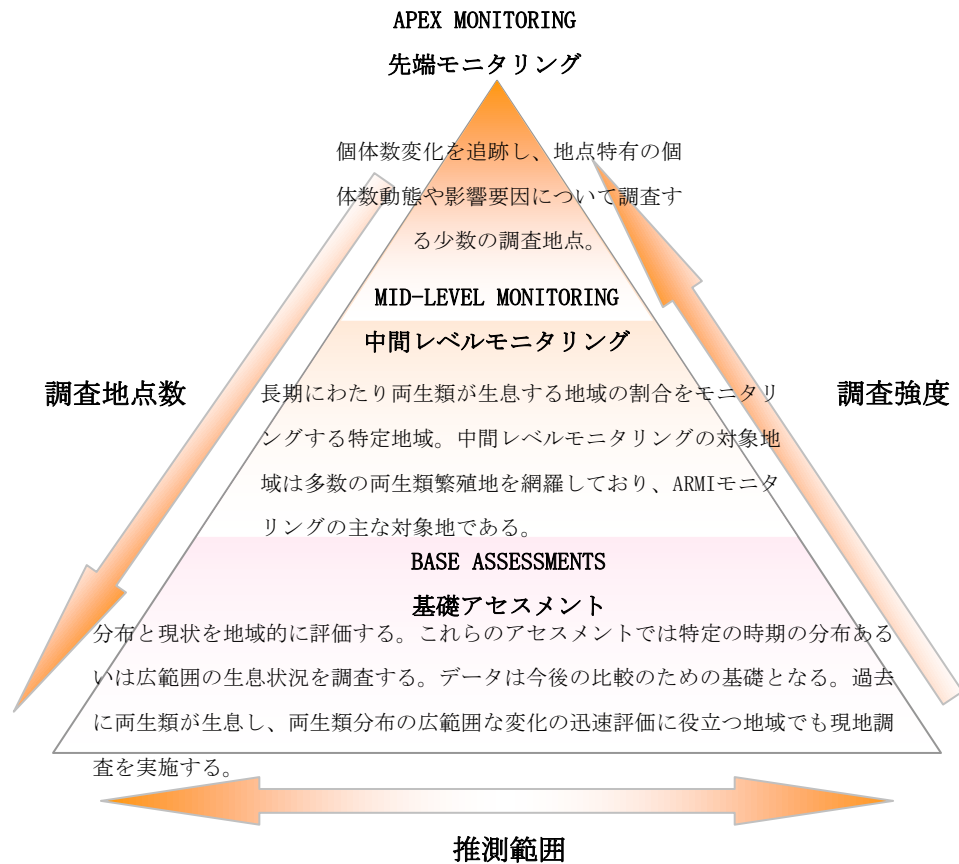
ARMI計画の目的は両生類の個体数変化の動態をより良く理解することであり、具体的には以下の内容が含まれる。

- ・ アメリカ国内および領内 (たとえばプエルトリコやアメリカ領バージン諸島) における両生類の種や群集の分布や個体数の状況と変化をモニタリングするネットワークを構築する。
- ・ 両生類に影響があると知られている環境条件を特定・監視し、その条件の国内全域における変異について記述する。
- ・ 両生類の個体数変化や奇形の原因を特定する研究を実施する。
- ・ 両生類保護を支援する管理者、政策立案者、一般市民に対して情報提供する。

ARMI調査は下図のようなピラミッド型の枠組となっている。

疾病スクリーニングは中間レベルモニタリングのデータ収集に含まれる。データはUSGS 国立野生生物健康管理センター (National Wildlife Health Center) によって考案された方法に従い収集される。

図 ARMIモニタリング概念図



文献 15

## Unusual Amphibian Mortality Report

両生類異常死報告

Froglife <http://www.froglife.org/disease/FMPform.asp>

ロンドン動物学協会 (Zoological Society of London: ZSL) の動物学研究所とFroglife (1989年に設立されたイギリスの基金) が実施している両生類大量死プロジェクトの一環で、ホームページ上からアンケートに記入、送付できる仕組みになっている。対象はイギリス国内である。

\* 下記のアンケートはほとんどの質問がチェック・プルダウンで選択できるようになっている。

-----

両生類の異常死が見られた場合、このアンケート用紙に情報を記入してください。出来るだけ詳しく記入してください。もし、さらに他にコメントがありましたら、最後の備考欄に記入してください。

セクション1：死んだ両生類について

何年ごろから死んだ両生類を見ましたか（該当の年にチェック☑を入れる）？

	カ エ ル	ヒキガエル	イ モ リ
2004年以前	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2005年	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2006年	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2007年	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2008年	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2009年	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

両生類の数はどのように変わりましたか？

増えた    減った    同じ

一番最近の死亡例について

死んでいたのは何月ですか（プルダウンで年月を選択）？

年  月頃から  年  月

全部でどのくらい死んでいましたか？

匹

どのくらいの卵の数が見られますか？

卵の塊の数あるいは1平方フィート内にいくつか？を選んでください（プルダウンで単位を選択）。

卵塊あるいは1平方フィート内に  個

今年の卵はどうでしたか？

- まったく卵は無い。 すべての卵が孵らなかった。 いくつかの卵は孵った。

今年のおタマジヤクシはどうでしたか？

- オタマジヤクシが突然に全部死んでしまった。  
 オタマジヤクシが時間をおいて全部死んだ。  
 いくつかのおタマジヤクシは足が生えていなくなった。  
 時期的に早くてまだ分からない。

病気のあるいは死んだ両生類に以下にある症状が見られた場合はチェックしてください。  
 (該当するものすべてをチェックする)

- 症状はみられなかった。

表皮の色	体の状態
薄い体色 <input type="checkbox"/>	体の血管が浮き出ている。 <input type="checkbox"/>
表皮または脚が退色している。 <input type="checkbox"/>	出血している。 <input type="checkbox"/>
体に赤い斑点がある。 <input type="checkbox"/>	目に異常がある。 <input type="checkbox"/>
皮膚の状態	腹が破裂している。 <input type="checkbox"/>
シミがある。 <input type="checkbox"/>	脚の骨が折れている。 <input type="checkbox"/>
傷や潰瘍がある。 <input type="checkbox"/>	舌がとび出ている。 <input type="checkbox"/>
皮膚が腐っている。 <input type="checkbox"/>	全体的に不活発。 <input type="checkbox"/>
体の形/サイズ	その他 (具体的に)
痩せている或いは削瘦している。 <input type="checkbox"/>	
膨らんでいる。 <input type="checkbox"/>	
ねじれている、あるいは痙攣している。 <input type="checkbox"/>	

## セクション2：池について

池はどこに位置しますか？

市街地、郊外、地方の村、開けた林野

最後に魚や植物を池に入れたのはいつごろですか？

病気になっていた種類のほかに池にはどんな生き物がいますか？

カエル       ヒキガエル       イモリ       貝類       トンボ類

池には魚はいますか？ はい いいえ

もしいるならどんな種類が何匹いますか？

種類	数

どこでその魚を買いましたか？

両生類の死亡が確認されてから、魚は死にましたか？

確認前から 確認中 確認後 死亡は確認されていない。

魚の治療薬を池に入れましたか？ はい いいえ

今年は使用しましたか？ はい いいえ

どのメーカーの治療薬を使用しましたか？

### セクション3：庭について

庭にはナメクジがいますか？ はい いいえ

庭に化学薬品あるいは肥料（有機肥料を含む）を撒きましたか？

	使用の有無	商品名
殺ナメクジ剤	<input type="checkbox"/> はい <input type="checkbox"/> いいえ	
肥料	<input type="checkbox"/> はい <input type="checkbox"/> いいえ	
除草剤	<input type="checkbox"/> はい <input type="checkbox"/> いいえ	
その他（具体的に）	<input type="checkbox"/> はい <input type="checkbox"/> いいえ	

池に化学薬品あるいは以下のものを入れましたか？

	使用の有無	商品名
殺藻剤	<input type="checkbox"/> はい <input type="checkbox"/> いいえ	
浄水器	<input type="checkbox"/> はい <input type="checkbox"/> いいえ	
その他	<input type="checkbox"/> はい <input type="checkbox"/> いいえ	

今年、池や庭でその他の動物の死体を見たことがありますか？（ある場合は種名と個体数を書いてください。）

## セクション4：その他

もし何か他にコメントあるいは書ききれなかった情報があったら書いてください。

## セクション5：あなたについて

(住所氏名、連絡先を記入する)

文献 16

### **Background document for the Threat Abatement Plan: Infection of Amphibians with Chytrid Fungus Resulting in Chytridiomycosis.**

脅威軽減計画の背景文書：両生類のツボカビ感染によるツボカビ症

Department of the Environment and Heritage 2006.

<http://www.environment.gov.au/biodiversity/threatened/publications/tap/pubs/chytrid-background.pdf>

## 導入

オーストラリア原産の両生類が病原真菌、カエルツボカビ *Batrachochytrium dendrobatidis* によって引き起こされるツボカビ症の脅威にさらされている。この感染症は世界中の両生類に影響を及ぼしている。カエルツボカビはクイーンズランド州南東部に1970年代中ごろから後期に導入されたと考えられ、その後、オーストラリア東部に広がり、クイーンズランド州北部のビッグ・テーブルランドからビクトリア州メルボルンまで広がった。他にも以下の3地域に存在することが判明した：ウェスタン・オーストラリア州南西部、アデレード、そしてタスマニア。キンバリー中央部でも1例報告があるが、現在のところ確定されていない。

「両生類のツボカビによって引き起こされるツボカビ症」は環境保護および生物多様性保全法 (Environment Protection and Biodiversity Conservation Act 1999 : EPBC Act) において、重要な脅威として記載された。記載されたと同時にオーストラリア政府の環境および遺産大臣は脅威軽減計画 (Threat Abatement Plan: TAP) が、この疾病の脅威を軽減する実現可能で、有効、効率的な方法と認め、オーストラリアの両生類に対するカエルツボカビの影響の管理を指導するTAPを全国的に協調して策定するように指示した。TAPは簡潔で利便性のあるものとするのが意図されているが、本背景文書には、カエルツボカビに関する広範囲の情報を提供するもので、生物学、個体数動態、感染方法や診断方法、生物多様性と管理に対する影響などが盛り込まれている。

種の保全をはかる上で、TAPは種の回復計画や現行の国や地域のプログラムに関して政策決定支援を提供する。また、重要生息地、特にまだ感染が起きていない島嶼部に、カエルツボカビが定着しないような対策を取る。さらに、管理や緩和方法と宿主への影響をより

良く理解するため、情報の収集と普及に重点を置く。特に現在感染の見られる地域、あるいは新たに感染が確認された地域のうち管理できる規模の地域が対象となる。

文献 17

## **Amphibian Conservation Action Plan Proceedings: IUCN/SSC Amphibian Conservation Summit 2005.**

両生類保全活動計画

Gascon C. et al. ed. 2007, IUCN.

[http://www.amphibians.org/ASG/Publications\\_files/ACAP\\_1.pdf](http://www.amphibians.org/ASG/Publications_files/ACAP_1.pdf)

### **要旨抜粋**

近年の世界両生類調査 (Global Amphibian Assessment) によって、両生類に対する世界的な脅威の性格と広がりの方々に科学界の注目が集まった。この調査は一般メディアによって国際的に多く取り上げられた。

世界的な両生類の減少・絶滅危機にあたり運営委員会が2005年9月に開催され、両生類の保全にかかわる9つのテーマの中から保全と研究に関する以下の優先活動を設定した: 1) 両生類の保全地区ネットワーク構築—重要生物多様性地域、2) 淡水域と周辺の陸域、3) 気候変動、生物多様性の喪失と両生類の減少、4) 感染症、5) 両生類の過剰採集、6) 両生類個体数減少にかかわる環境汚染の評価、7) 飼育プログラム、8) 再導入、9) 評価継続の必要性: 世界両生類調査の継続、10) 分類と保全、11) 両生類保全のための生物資源バンク

サミットに続き宣言が発表された。それは両生類保全のための4つの実施項目で、すべてが緊急を要するものである。

1. 減少と絶滅の原因の理解を深める。
2. 両生類の多様性と、それがどのように変化していくのかを継続して記録する。
3. 長期にわたる保全プログラムの開発と実施
4. 緊急事態や差し迫った危機への対応

文献 18

## **Collection, Preservation and Mailing of Amphibian for Diagnostic Examinations.**

両生類診断のための採集・保存・送付方法

USGS, National Wildlife Health Center

[http://www.nwhc.usgs.gov/publications/amphibian\\_research\\_procedures/specimen\\_collection.jsp](http://www.nwhc.usgs.gov/publications/amphibian_research_procedures/specimen_collection.jsp)

以下のガイドラインは診断を目的とした健康な、あるいは病気の、または死亡した両生



類の採集に関するものである。

診断のためにもっとも良い検体は病気の生体である。両生類の死体は利用が限られている。これは水生生物は陸上動物よりはるかに腐敗が早いので、死体にはほとんど常に腐敗菌や真菌類が多く体中に付着している。この腐敗が早く進むこと（自己分解）によって意味のある、あるいは有用な細菌・真菌培養結果が非常に得にくくなる。従って意味のある細菌・真菌培養のためには生体の入手が必要である。さらに、様々な血液検査を実施するための血液は生体からのみ入手できる。

その他の研究のために、生体を採集して安楽死させる必要がある場合には、まず、行動を観察・記録する。病気の生体が得られない場合には、新鮮な死体を選び、2つのグループに分ける。おおよそ半分の死体（できれば最も新鮮な死体）は腹部正中線にそって腹腔を切り開き（胸骨から恥骨まで）10%ホルマリンで保存する。後の半分はすぐに凍結する（ウイルス培養あるいは毒素の検査用）。

特によく知られていない種の場合などでは、病気の個体や死体の所見の判断のために、健康な生体をコントロールあるいはベースラインとして提出することが必要になることもある。

複数の疾病が同時に一つの個体群に感染することもあり、常に複数個体の採集が推奨される。感染している種および地域を代表する種を採集・送付する。可能であれば、たとえ健康そうに見える、あるいは感染していないように見えても、発生地には生息する外来種を送付するのが望ましい。もし発生地に他に固有種の両生類（絶滅危惧種を除く）あるいは爬虫類や魚類が生息していれば、死因に関するより広範囲の動物伝染病的調査のため、それらも送付しても良い。可能な限り、生体と死体を同じ容器に入れてはならず、また、複数種を同一容器に入れてはいけない（しかし、死体をホルマリンに入れる場合は複数種を一つの容器に入れても良い）。

両生類を野外で採集する場合には、ただちに冷蔵するため、氷が入ったクーラーボックスを持っていく（暖かい気候を見込んで）。凍結と融解で病原体の分離が困難になることがあり、また通常、顕微鏡検査のための組織を損なってしまう。従って、試料の凍結の有無、凍結の時期については、ケースバイケースで指示がある。しかし野外で24～36時間以内に電話あるいは送付が不可能な場合は、両生類の死体の半分を凍結し、半分をホルマリン固定し、生体は冷蔵する。

水生の両生類（アメリカサンショウウオ、マッドパピー（ホライモリ科）、テキサスサンショウウオ（*Eurycea neotenes*）、オタマジャクシや幼体）の生体は、輸送前にフタつきの硬い入れ物に入れる（GladまたはZiplocの容器が良い。袋は好ましくない。袋は送付中に開いたり、保冷剤でつぶされたりするため）。各容器の中に十分な酸素があるか確認することが非常に重要である。入れ物は水が空気に触れる面積が大きいものが好ましい。各容器の中の水と空気の量が同じくらいが良い。陸生の両生類は蓋に穴を開けたプラスチック容器かビンに入れる。この時に少量の湿ったもの（水滴が落ちるほどではない状態）、例えば採集場所の水生植物や水から出ている植物、葉、コケなど、または漂白していない

(茶色の) ペーパータオルを湿らせたもの一緒に入れておく。スポンジは使用してはいけない。スポンジの多くは水生・陸生両生類に対して毒性がある。プラスチックの容器や袋にはラベルを書く。消せないフェルトペンが望ましいが、後から消せる油性鉛筆を使えば、入れ物を再利用できる。

それぞれの容器のラベルには以下の情報を書く。

- ・ 種名
- ・ 場所 (州・郡・町)
- ・ 採集者 (名前・住所・電話番号)
- ・ 採集日
- ・ 死体で発見されたものか安楽死かの別
- ・ 裏面に状況等の備考

送付には、周りが硬いクーラーボックスあるいは発泡スチロール製のクーラーボックスを段ボール箱に入れる。クーラーボックスの中には大きなビニール袋を入れる。両生類が入っている容器や袋の周りには死体を冷やすために保冷剤を置く (試料を袋に入れなければならない場合は、袋が中で動いたり、封が開いてしまったり、保冷剤につぶされないように硬い入れ物に入れなければならない)。送付中に水が漏れないので氷より保冷剤が良い。生体の場合には、蓋の周りに空気が入るように詰める。クーラーボックスの中には、死体を入れた袋が動かないように、また保冷剤が死体を入れた袋と接触しているように、あるいは断熱や余分な水分を吸い取るために、丸めた新聞紙あるいは同様に吸収性のあるものを詰める。

クーラーボックスまたは箱を閉じて確実に封をし、National Wildlife Health Centerのあと先を書く。また“診断試料-野生生物”とラベルに書く。これによって解剖部の受付へ届けられる。翌日到着サービスで送付し、送付前にNWHCに連絡し、送付後は予定到着時刻の確認の連絡をする。

死体あるいは瀕死の動物が見つかった場所については常にバイオセキュリティを考慮しなければならない。バイオセキュリティには同程度に重要な3つの側面がある：1. 周辺の間人あるいは研究者の安全性、2. 他の場所や他の個体群に病原体を広げないための野外で使用した道具 (特に長靴、捕獲網等) の消毒、3. 野外のすべての他の個体群、あるいは研究室内の飼育動物群に感染を広げないために、病気の生体を注意深く検疫 (隔離) すること。

第一に気をつけることは1つ以上の脊椎動物の綱や門の生物 (すなわち鳥類、カエル、魚類、カタツムリ類、昆虫など) が同時に病気になったり死亡しているかどうかである。もし、そういう状況であれば死亡の原因は毒素 (毒物) である可能性が高く、哺乳類 (すなわち野外研究者) も中毒する可能性があるため、現場に入る時には十分に注意する。

第二に、もし両生類 (あるいは両生類と魚類) のみが死亡している場合、その死因は感染症の可能性が高い。その場合には、使用したり水に触れたりした道具 (すなわち長靴、ゴ

ム手袋、捕獲網、わな、三脚、水質検査道具等) をすべて洗浄・消毒をすることが重要である。現場で水の上を走った車のタイヤやホイールも含まれる。消毒薬は1オンスの漂白剤に1ガロンの清浄な水で薄めて、別の調査地点に行く前に使用した調査道具をすべてそれですすぐ。この方法で消毒する場合、感染地での調査の場合、ブラシと5~10ガロン入るバケツを調査道具として常備する必要がある。

第三に感染が起こった両生類(生死ともに)は接触感染するものと考えたほうがよい。このような生きた病気の両生類や死体は他の場所で放したり、捨てたりしては絶対にいけない。また、研究室に他の両生類、魚類や爬虫類と一緒に置いてはならない。

最後に野外において病気あるいは死んだ両生類(魚類、爬虫類)を扱うときは必ず使い捨て手袋を使用すること。もし、持っていない場合はビニール袋を中表にして手を入れ、それで生物を持ち、そのまま生物を袋に入れ封を縛って閉じること。

文献 19

## Collecting and shipping specimens for diagnostic testing.

診断のための試料採取・送付方法

Miller .DL, & Gray M, 2009. Southeastern Partners in Amphibian and Reptile Conservation, Disease, Pathogens and Parasites Task Team, Information Sheet#9  
SEPARC Information Sheet #9

[http://www.nwhc.usgs.gov/publications/amphibian\\_research\\_procedures/specimen\\_collection.jsp](http://www.nwhc.usgs.gov/publications/amphibian_research_procedures/specimen_collection.jsp)

<試料採集>

- ・ 試料には、丸ごとの生体、死体、一部の組織、病変や口や排泄孔などのスワブ、環境試料などがある。
- ・ 人間に害を及ぼす病原体もあるため、病気の個体に触れる時には使い捨ての手袋をすることが重要である。
- ・ 爬虫両生類は腐敗が早いので、試料としては、死にかけの個体あるいは死んだばかりの個体が望ましい。生体または死後24時間以内のものが推奨される。
- ・ 死体は個別に封ができるビニール袋に入れ、氷の上のせて輸送する。
- ・ 生体は個別にプラスチック容器に入れ、野外から戻った後に人道的な方法で安楽死する。
- ・ 両生類の安楽死は、トリカインメタンスルホネート(100-250mg/l)あるいは塩酸ベンゾカイン(>250mg/l)を10分間経皮暴露する。爬虫類についてはアメリカ動物園獣医師会(American Association of Zoo Veterinarians)の家畜以外の動物の安楽死ガイドラインを参照すること。

- ・ 新鮮な死体は氷に載せて検査機関へ1晩で輸送することを推奨する。
- ・ それが不可能な場合には短期間(1ヶ月以内)であれば通常の冷凍庫で凍結保存する。あるいは、95%エタノールまたは10%中性緩衝ホルマリンで保存する。
- ・ 凍結や保存液に入れていない試料は、組織学的検査や病原体の培養、分子生物学的検査を含めた、完全な解剖検査に向いている。
- ・ 保存液に入れた試料は、組織学的検査や一部の分子生物学的検査に用いることができる。
- ・ 凍結した試料は、分子生物学的検査およびたいの培養に用いることができるが、組織学的検査には向かない。

#### <輸送方法>

- ・ 生体や新鮮な死体、凍結試料は一晩の宅配便で送付しなくてはならず、個別の宅配業者のガイドラインに従って送付する。保存液に入れた場合は急ぐ必要はない。
- ・ 一般的に梱包は3重にし、各層に耐水性の筆記具でラベルする。一番内側は試料を入れた封のできるビニール袋か容器である。二重目は、それをいくつか入れた封のできる大きなビニール袋である。三重目は、詰め物を入れた箱または輸送用のクーラーボックスである。
- ・ 新鮮試料の場合は二重目の外に氷のパックを入れる。ドライアイスは組織を凍結させてしまい組織学的検査ができなくなるので、新鮮試料には用いない。
- ・ 凍結試料の場合は氷でもドライアイスのどちらも使用できる。
- ・ すべての内容物のリスト、必要な検査、連絡先を同封することが重要である。検査機関には輸送前に連絡し、その指示を得ることが望ましい。
- ・ エタノール、ホルマリン、ドライアイスの輸送には規制があり、適切なラベルを貼らなくてはならない。宅配便ではラベル方法や梱包方法に別の規則があるので、輸送前に確認する。

#### <検査機関>

(爬虫両生類の診断検査を実施している大学などの研究室のリスト)

- ・ 病原体検査の経費は検査機関、検査の種類、検体数によって異なる。
- ・ 通常、1検体あたり\$30~\$100である。

## 引用文献リスト

文献1～19（文献の番号は以下の番号と対応する）

- 1) Gray MJ, Miller DL, Hoverman JT., 2009. Ecology and pathology of amphibian ranaviruses. *Diseases of aquatic organisms*, 87: 243-266.
- 2) Goka K, Yokoyama J, Une Y, Kuroki T, Suzuki K, Nakahara M, Kobayashi A, Inaba S, Mizutani T, Hyatt AD., 2009. Amphibian chytridiomycosis in Japan: distribution, haplotypes and possible route of entry into Japan. *Molecular Ecology*, 18: 4757-4774.
- 3) Fisher MC., 2009. Endemic and introduced haplotypes of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Japanese amphibians: sink or source? *Molecular Ecology*, 18: 4731-4733.
- 4) James TY, Litvintseva AP, Vilgalys R, Morgan JAT, Taylor JW, Fisher MC, Berger L, Weldon C, du Preez L, Longcore JE., 2009. Rapid global expansion of the fungal disease Chytridiomycosis into declining and healthy amphibian populations. *PLoS Pathogens*, 5: e1000458.
- 5) Picco AM, Collins JP., 2008. Amphibian commerce as a likely source of pathogen pollution. *Conservation Biology*, 22: 1582-1589.
- 6) Schloegel LM, Picco AM, Kilpatrick AM, Davis AJ, Hyatt AD, Daszak P., 2009. Magnitude of the US trade in amphibians and presence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and ranavirus infection in imported North American bullfrogs (*Rana catesbeiana*). *Biological Conservation*, 142: 1420-1426.
- 7) U. N. Geological Survey, National Wildlife Health Center, 2009. Quarterly mortality reports. [http://www.nwhc.usgs.gov/publications/quarterly\\_reports/index.jsp](http://www.nwhc.usgs.gov/publications/quarterly_reports/index.jsp)
- 8) USFWS Biosafety during Amphibian Handling and Mortality Events. <http://www.fws.gov/contaminants/Amphibian/OtherSOPs.html#BIOSAFE>
- 9) NSW National Parks and Wildlife Service, 2001. Hygiene protocol for the control of disease in frogs. Information Circular Number 6. <http://www.marshall.edu/herp/hyprfrog.pdf>
- 10) Johnson M, Speare R. 2003. Survival of *Batrachochytrium dendrobatidis* in water: Quarantine and control implications. *Emerging Infectious Diseases* 9: 922-925.
- 11) Speare R, Berger L, Skerratt LF, Alford R, Mendez D, Cashins S, Kenyon N, Hauselberger K, Rowley J., 2004. Hygiene protocol for handling amphibians in field studies. James Cook University. <http://www.jcu.edu.au/school/phtm/PHTM/frogs/field-hygiene.pdf>
- 12) Miller DL and Gray MJ. 2009. Disinfection of field equipment and personal gear. Southeastern Partners in Amphibian and Reptile Conservation, Disease, Pathogens and Parasites Task Team, Information Sheet #10. <http://www.uga.edu/separc/TaskTeams/DiseasesParasites/SEPARCDisinfectingGuidelinesFinal.pdf>
- 13) Bryan LK, Baldwin CA, Gray MJ, Miller DL., 2009. Efficacy of select disinfectants at inactivating Ranavirus. *Diseases of aquatic organisms*, 84: 89-94.
- 14) Corn PS, Adams MJ, Battaglin WA, Gallant BA, James DL, Knutson M, Langtimm CA and Sauer JR. 2005. Amphibian Research and Monitoring Initiative: Concepts and Implementation. Scientific Investigations Report 2005-5015. U.S. Department of the Interior. U.S. Geological Survey. <http://pubs.usgs.gov/sir/2005/5015/pdf/SIR2005-5015.pdf>
- 15) Froglife. Unusual Amphibian Mortality Report. <http://www.froglife.org/disease/FMPform.asp>

- 16) Department of the Environment and Heritage. 2006. Background document for the Threat Abatement Plan: Infection of Amphibians with Chytrid Fungus Resulting in Chytridiomycosis. <http://www.environment.gov.au/biodiversity/threatened/publications/tap/pubs/chytrid-background.pdf>
- 17) Gascon C. et al. ed. 2007. Amphibian Conservation Action Plan, Proceedings: IUCN/SSC Amphibian Conservation Summit 2005. IUCN [http://www.amphibians.org/ASG/Publications\\_files/ACAP\\_1.pdf](http://www.amphibians.org/ASG/Publications_files/ACAP_1.pdf)
- 18) USGS, National Wildlife Health Center. Collection, Preservation and Mailing of Amphibian for Diagnostic Examinations. [http://www.nwhc.usgs.gov/publications/amphibian\\_research\\_procedures/specimen\\_collection.jsp](http://www.nwhc.usgs.gov/publications/amphibian_research_procedures/specimen_collection.jsp)
- 19) Miller .DL, & Gray M. 2009. Collecting and shipping specimens for diagnostic testing. Southeastern Partners in Amphibian and Reptile Conservation, Disease, Pathogens and Parasites Task Team, Information Sheet#9. [http://www.nwhc.usgs.gov/publications/amphibian\\_research\\_procedures/specimen\\_collection.jsp](http://www.nwhc.usgs.gov/publications/amphibian_research_procedures/specimen_collection.jsp)

それ以外の引用文献

- 20) Green DE, Gray MJ, Miller DL. 2010. Disease monitoring and biosecurity. *In* Amphibian Ecology and Conservation. Ed. by Dodd, Jr. CK. Oxford University Press, pp.481-505.
- 21) Une Y, Sakuma A, Matsueda H, Nakai K, Murakami M. 2009. Ranavirus Outbreak in North American Bullfrogs (*Rana catesbeiana*), Japan, 2008. *Emerging Infectious Diseases*, 15: 1146-1147.
- 22) 環境省自然環境局野生生物課 2009. 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. 112p.
- 23) ARG-UK. 2008. ARG-UK Advice Note 4, Amphibian disease precautions: a guide for UK fieldworkers. Version 1. FROGlife, ARG-UK, HCT, Natural England, Zoological Society of London. <http://static.zsl.org/files/biosecurity-arguk4-511.PDF>
- 24) Brem F, Mendelson III JR, Lips KR. 2007. Field-sampling protocol for *Batrachochytrium dendrobatidis* from living amphibians, using alcohol preserved swabs. Version 1.0 (18 July 2007). <http://www.amphibianark.org/pdf/Field%20sampling%20protocol%20for%20amphibian%20chytrid%20fungi%201.0.pdf>

その他参考文献

- 25) Kiesecker .J. 1997. Influences of Egg Laying Behavior on Pathogenic Infection of Amphibian Eggs. *Conservation Biology*, Vol.11, No.1, pp.214-220
- 26) 宇根有美. 2008. ラナウイルス <http://www.azabu-uac.jp/topics/detail2008/081210-ranavirus.htm>
- 27) Meteyer .C. 2000. Field guide to Malformations of Frogs and Toads, USGS. [http://www.nwhc.usgs.gov/publications/fact\\_sheets/pdfs/frog.pdf](http://www.nwhc.usgs.gov/publications/fact_sheets/pdfs/frog.pdf)

## 参考ホームページ

### <研究機関・NGO>

Amphibian and reptile conservation	<a href="http://www.arc-trust.org/">http://www.arc-trust.org/</a>
Frog Watch USA	<a href="http://www.aza.org/frogwatch/">http://www.aza.org/frogwatch/</a>
Partners in Amphibian and Reptile Conservation	<a href="http://parcplace.org/about.html">http://parcplace.org/about.html</a>
Frog life	<a href="http://www.froglife.org/index.htm">http://www.froglife.org/index.htm</a>
カエルのツボカビ症の感染（麻布大学）	<a href="http://www.azabu-u.ac.jp/wnew/detail07/070111.html">http://www.azabu-u.ac.jp/wnew/detail07/070111.html</a>
Society for the study of Amphibians and reptiles	<a href="http://www.ssarherps.org/">http://www.ssarherps.org/</a>
Amphibian Research and Monitoring Initiative	<a href="http://armi.usgs.gov/">http://armi.usgs.gov/</a>
U.S Geological Survey	<a href="http://www.usgs.gov/">http://www.usgs.gov/</a>
Wildlife Disease Association	<a href="http://www.wildlifedisease.org/">http://www.wildlifedisease.org/</a>
North American Amphibian Monitoring Program	<a href="http://www.pwrc.usgs.gov/naamp/">http://www.pwrc.usgs.gov/naamp/</a>
Canadian Amphibian and Reptile Conservation Network	<a href="http://www.carcnet.ca/english/index.html">http://www.carcnet.ca/english/index.html</a>
Amphibian ark	<a href="http://www.amphibianark.org/index.htm">http://www.amphibianark.org/index.htm</a>

### <カエルに関するデータベース>

Amphibian Diseases HP	<a href="http://www.jcu.edu.au/school/phtm/PHTM/frogs/ampdis.htm">http://www.jcu.edu.au/school/phtm/PHTM/frogs/ampdis.htm</a>
Amphibiweb	<a href="http://amphibiaweb.org/">http://amphibiaweb.org/</a>

### <消毒方法および薬品について>

動物医薬品検査所	<a href="http://www.maff.go.jp/nval/">http://www.maff.go.jp/nval/</a>
医薬品医療機器情報提供ホームページ	<a href="http://www.info.pmda.go.jp/">http://www.info.pmda.go.jp/</a>
東京都福祉保険局（消毒について）	<a href="http://www.fukushihoken.metro.tokyo.jp/joho/soshiki/anzen/shokuhin/index.html">http://www.fukushihoken.metro.tokyo.jp/joho/soshiki/anzen/shokuhin/index.html</a>

### <動物の検疫について>

厚生労働省検疫所(動物由来感染症について)	<a href="http://www.forth.go.jp/mhlw/animal/">http://www.forth.go.jp/mhlw/animal/</a>
動物検疫所	<a href="http://www.maff.go.jp/aqs/sosiki/">http://www.maff.go.jp/aqs/sosiki/</a>

### <動物の輸出入に関する統計>

e-Stat	<a href="http://www.e-stat.go.jp/SG1/estat/eStatTopPortal.do">http://www.e-stat.go.jp/SG1/estat/eStatTopPortal.do</a>
--------	---

## 引用・参考文献

※第3章2の文献は当該ページ（100ページ以降）に記載した。

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.

Goka K., Yokoyama, J., Une, Y., Kuroki, T., Suzuki, K., Nakahara, M., Kobayashi, A., Inaba, S., Mizutani, T., Hyatt, A. D., 2009. Amphibian chytridiomycosis in Japan: distribution, haplotypes and possible route of entry into Japan. *Molecular Ecology*: 18: 4757-4774.

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., Nicholis D. K., 1999. *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. Nov., a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia* 91: 219-227.





# カエルツボカビ感染実態把握調査実施要綱

## 1. サンプル採取地点の選定

### ●調査の目的

平成 20 年度までの調査結果に基づき、他の両生類と比べて高確率でカエルツボカビ DNA が検出されているウシガエル等を中心に、両生類を調査して感染状況を把握する。

### ●調査内容

平成 20 年度までに環境省が実施した野外調査において、カエルツボカビ DNA が検出されている地点にて、高確率で感染が確認された **ウシガエル等を中心に**、当該地域に生息する両生類について野外個体のサンプルを収集し、解析を実施する **モニタリング** の意味合いの強い調査です。

### ●サンプル採取地点

今年度は前年度までの調査を踏まえたモニタリング調査となります。そのため、**これまでにカエルツボカビ DNA が検出されている地点（こちらから調査地点を指定させていただきます）周辺にて調査を実施し、サンプルを採取**していただきます。

### ●採取サンプルについて

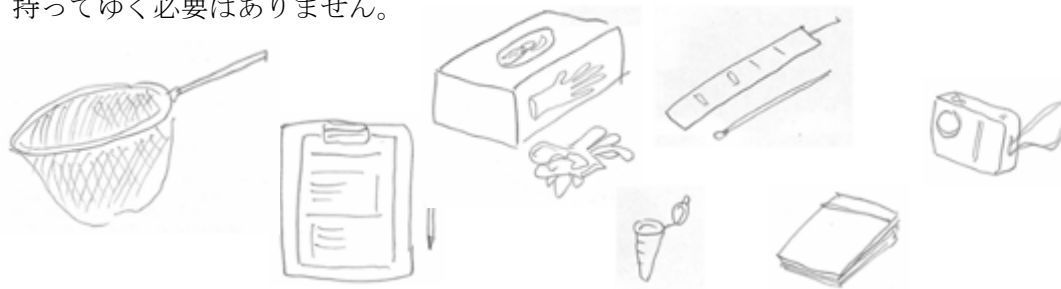
サンプルを採取するために捕獲する種は、カエルツボカビ菌へ感染している可能性の高いウシガエルを中心に捕獲を試みてください。また、採取するサンプルは、1 種当たり最高で 5 個体までとします。

## 2. 調査器具等

事前に送付するもの（綿棒、記録票、調査地点を含む地形図、謝金払込み用口座確認用紙、送付用チューブ、送付用ビニル袋、サンプル採取用の手袋、捕獲ガエル保持用ビニル袋）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。
- ・ **ニッパー or ハサミ**：サンプルを拭った綿棒を送付用チューブに入れる際、綿棒の柄を切断するのに必要です。個人的にはニッパーの方が使い勝手がよいと思います。
- ・ **携帯用クーラーボックス**：採集したサンプルを直射日光に当てないように保存するのに便利。保冷剤などを入れておくとなお良いです。
- ・ **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。
- ・ **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。
- ・ **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）。帰宅してから消毒する場合には現地に持つ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。帰宅してから消毒する場合には現地に持つ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。帰宅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

◇本調査予定地はカエルツボカビ菌の確認されている場所となります。そのため、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、なるべく消毒は帰宅してから行うようにしてください。帰宅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（特に網の本体部分）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・採取サンプルの締め切りについて

◇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。

◇**サンプルの締め切りは特に設けませんが、解析などの都合上、11月下旬くらいまでに採取と発送をお願いいたします。**

#### 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

- ◇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などを使って捕まえます。
- ◇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。

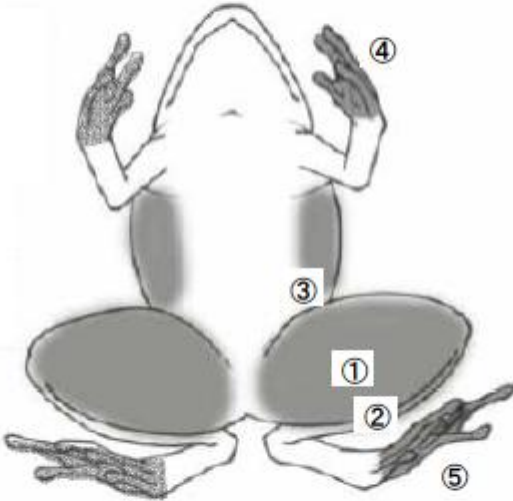
## ◆サンプルの採取

- ◇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、大きめのビニー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ール袋に入れてしまった後（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ール袋に入れてしまったほうがいいでしょう

- ◇綿棒（両生類1匹につき2本）、ラテックス手袋、チューブ（同）、ビニール袋（小：両生類1匹につき1枚）、油性サインペン、記録票を準備。
- ◇サンプル採取を複数人で行う場合、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・ビニール袋への保存、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。
- ◇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。

◇手袋は捕獲個体に触れた場合は取り換えてください。

## ◆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、撮影の必要はありません。**



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

◇全て終了したら基本的に捕獲地点で両生類を速やかに放します。

◇**帰宅するまでの間、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。

◇帰宅後、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。

◇帰宅後、**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)。



標本番号	種名 (わかれば)	調査年月日	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
090912-1	アマガエル	2009. 9. 12	調査地点A 東京都千代田区 日比谷公園内	あり	
090912-2		2009. 9. 12	〃	あり	
090912-3		2009. 9. 12	〃	あり	
090912-4	アマガエル	2009. 9. 12	〃	あり	
090912-5	〃	2009. 9. 12	〃	あり	
090912-6	アズマヒキガエル	2009. 9. 12	調査地点B 東京都千代田区 日比谷公園内	あり	
090912-7	〃	2009. 9. 12	〃	なし	

種名が不明の場合は空欄でも結構です

◆調査地点図

今年度の調査は、以前にカエルツボカビ菌への感染が確認されている場所でサンプル採取をお願いいたします。前回報告いただいた陽性個体採取地点を中心とした調査地点図を同封しましたので、今回採取を実施した場所の詳細地点として、記録票の調査地点名(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。

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。

## ◆記録票と調査地点図のコピーと送付手続き

- ◇記入の終わった記録票と調査地点地図をコピーしてください。なお、記録票と地図の原本はサンプルと一緒に国立環境研究所へお送りください。
- ◇お送りした調査機材に同封の謝金払込み用口座確認用紙に必要事項を記入してください。
- ◇**記録票（コピー）と調査地点地図（コピー）、謝金払込み用口座確認用紙**を郵送もしくはFAXで下記にお送りください。

発送先：〒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 8F・カエルツボカビ係

(担当・戸田光彦、高橋洋生、中島朋成)

電話：03-5824-0969 ファクス：03-5824-0970

## ◆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。
- ◇送付状に送送者名を記入の上、**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、サンプル送付先では**日曜日に荷物を受け取れません**ので、日曜日に荷物が到着しないように**到着日時の指定**をしてください。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。
- ◇発送は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、上記の記録票、地図等発送先宛にご連絡いただければ幸いです。



平成21年度カエルツボカビ等実態把握調査検討業務・協力専門家の氏名及び所属

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職員
宇	根	有	美	麻布大学獣医学部	准教授
太	田	英	利	兵庫県立大学	自然・環境科学研究所教授
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
平	良	眞	規	東京大学大学院理学系研究科	准教授
福	山	欣	司	慶応義塾大学経済学部	准教授
松	井	久	実	麻布大学獣医学部	講師

平成21年度

カエルツボカビ等実態把握調査検討業務報告書

平成22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。