

F-3 侵入種生態リスクの評価手法と対策に関する研究

(2) 随伴侵入生物の生態影響に関する研究

独立行政法人国立環境研究所

環境リスク研究センター

麻布大学獣医学部

五箇公一

宇根有美

＜研究協力者＞	国立感染症研究所 細菌第一部	川端寛樹 高野 愛
	国立感染症研究所 ウィルス第一部	安藤秀二 岸本嘉男
	大原総合病院附属大原研究所 独立行政法人森林総合研究所 千葉大学 園芸学部	藤田博巳 岡部貴美子 角田 隆

平成16～18年度合計予算額	61,111千円
(うち、平成18年度予算額)	20,539千円)

〔要旨〕 ペット用あるいは産業用に輸入されている輸入爬虫類およびに輸入昆虫類における寄生生物の持ち込み状況の把握と生態影響に関する研究を行った。輸入爬虫類の寄生生物に関する研究では、輸入爬虫類に寄生するウィルス、真菌、細菌、原虫類などのマイクロ・パラサイトを採集し、分類同定を行った。ヒョウモントカゲモドキのクリプトスポリジウムの日本への侵入を初めて確認し、インドネシアで捕獲されたツリーモニターから新種ヘルペスウイルス感染症を検出した。リクガメが保有する病原体・感染症のリスク評価を行うために大量死した事例の解析を行った結果、世界で3例目のリクガメの核内コクシジウム症を発見した。

さらに、世界中で猛威を振るっているカエルのツボカビ症を、アジアで初めて確認した。今回、世界中の両生類の個体数の減少に関っているとされるツボカビが国内で確認されたことから、麻布大学・国立環境研究所が中心となって緊急検査体制を確立した。

輸入爬虫類に寄生するマクロパラサイトとして、マダニ類の持ち込み状況を調べた結果、様々な国から輸入されるトカゲ、ヘビ、カメ類からマダニが採集された。マダニを形態分析およびDNA分析に基づき分類同定を行った結果、多くが未記載種であることが示唆された。さらに一部のマダニ体内から新型ボレリア原虫が検出され、寄生性ダニの持ち込みが未知の病原体の侵入をもたらすリスクがあることを実証した。

輸入昆虫類の寄生生物に関する研究では、様々な地域から輸入されているペット用甲虫類からダニ類を採集して、分類・同定を行った。宿主-寄生生物間の共種分化ユニット解析の事例として、クワガタムシと寄生性ダニの分子系統比較を行った。その結果、宿主の系統分化と地理的分布拡大に合わせて、寄生性ダニも宿主特異的に分化するとともに、宿主転換をして分布拡大してきた歴史的背景が明らかとなった。寄生性ダニとクワガタムシの宿主交換実験を行った結果、外国産のダニ

は日本産クワガタムシにも感染可能であり、外国産クワガタムシの侵入に伴う寄生ダニの浸食が懸念された。

[キーワード] 輸入昆虫、輸入爬虫類、寄生生物、ダニ、原虫

1. はじめに

2005年6月より施行予定の「特定外来生物被害防止法」では、侵入種の在来種および在来生態系に対する生態影響、即ち、「被害」の判定基準として、①在来種の捕食、②在来種との競合、③植生の破壊や変質、および④交雑による遺伝的攪乱を挙げている。しかし、侵入種の最も深刻な生態リスクは外来病害寄生生物の随伴侵入である¹⁾。ハワイ諸島の固有鳥類の多くが、19世紀のおわりに持ち込まれた鳥マラリアによって絶滅した事例²⁾は有名である。我が国ではこれまで人畜共通感染症あるいは家畜伝染病をもたらす哺乳類・鳥類以外の輸入生物種に対する検疫はほとんど行われておらず、侵入寄生生物による生態系被害という概念は今回新しく制定された法律にも盛り込まれてはいない。一方、近年我が国では様々なペット用生物や魚の餌生物など無数の生物が億単位で大量に輸入されており、それらに寄生する生物の実態把握と影響評価を急ぐ必要がある。また、寄生生物の生態影響回避の科学的根拠として、宿主と寄生生物間の共進化関係という進化生態学的視点からの考察も重要である。寄生生物による病害は、免疫を進化させていない新しい宿主への感染によって発生するものであり、自然宿主と寄生生物の長きにわたる共進化関係の人為的攪乱こそが寄生生物の生態影響・健康影響の根元といえる。宿主生物のみならず、寄生生物に関してもその進化的歴史を把握することが寄生生物被害の生態的防除には必要と考えられる。

2. 研究目的

爬虫類、両生類、昆虫類などの輸入生物種あるいは野生化侵入種における寄生生物のサンプル採集を行い、それらの寄生生物の種を特定するとともに生態的・病理学的特性に関する情報を収集してデータベース化する。さらに、採集された寄生生物について感染実験により在来種に対する影響評価を行う。また、宿主-寄生生物間の共進化関係を明らかにして、宿主-寄生生物間相互作用系の進化的重要単位 (ESU) を明らかにする。

①輸入爬虫類・両生類に由来する野生生物感染症のリスク評価に関する研究

1) 輸入爬虫類・両生類に由来する野生生物感染症のリスク評価に関する研究

近年、日本の住宅事情の変化や愛玩動物への嗜好の多様化から、野生動物やエキゾチックアニマルの輸入数および販売数が増加している。爬虫類を始めとして動物園でも見られないような稀少あるいは貴重なものをはじめ、多様な動物がペットショップ等で販売されているのが現状である。しかし、この種の動物が保有する病原体や感染症に対しての調査は、一部を除き現時点では実施されておらず、特に爬虫類・両生類に関しては、全くなされていないのが現状である。本研究課題は、このように輸入される外来爬虫類に随伴して国内に持ち込まれる寄生生物種の発掘 (確認) と在来種への影響を評価することを目的としている。本課題では以下の項目について調査を実施した。

a. トカゲ類の *Cryptosporidium* が在来種およびその他、爬虫類に及ぼす影響。

b. オオトカゲ (エメラルドツリーモニター *Varanus prasinus*、コバルトツリーモニター *Varanus*

macraei) のヘルペスウイルス感染症の病理学的研究。

c. リクガメの核内コクシジウム症。

2) カエルツボカビ症の生態リスク評価と緊急検査体制の構築

世界の両生類は5,743種、このうち2,469種(43%)で生息数が減少、1,856種(32%)が絶滅の恐れがある種、120種が1980年以降に絶滅したと考えられている。この減少・絶滅の原因は生息地破壊、気候変動、化学物質汚染、外来種圧、過剰採取等の他にChytridiomycosis(ツボカビ症)がその大きな要因と考えられている。アジアを除く諸外国で猛威を振るっているカエルツボカビ症を、本研究課題では日本国内、アジアで初めて発見した。

カエルツボカビの分類学的位置は以下ようになる。

菌界 Fungi

藻菌類 Phycomycetes

接合菌門、子囊菌門、担子菌門

ツボカビ門 Chytridiomycota

ツボカビ綱 Chytridiomycetes

ツボカビ目 Chytridiales

ツボカビ科 Chytridiaceae

本種は生活環中に鞭毛を持ち、キチン、セルロース、ケラチンなど通常では分解しにくい物質を利用する。条件寄生性で、植物、昆虫、原生動物などに寄生する一方で、植物片、死骸などに腐生性に付着する。このツボカビに属する*Batrachochytrium dendrobatidis*が初めての脊椎動物に寄生するツボカビとして1998年にオーストラリアとパナマの雨林で発見された。1999年1属1種の新種のカビとして登録された。学名は、Batracho: カエル、chytrium: ツボカビdendrobat: *Dendrobates* (ヤドクガエル))と種の記載にコバルトヤドクガエル由来株を用いたことより、命名された。このツボカビには、以下のような特徴がある。

- ・ 溪流に発生 (やや涼しい環境を好む)
- ・ 水中と土壌中に生息
- ・ 遊走子(カビの孢子に相当)で感染、増殖
- ・ 水、空気、土、接触などで感染

本種によって既にパナマやオーストラリアではカエルの局所個体群が絶滅したという事例があり、IUCNの「世界の外来種ワースト100」にも登録されている。2006年12月に本研究課題によって輸入種から発見された。本課題では、日本国内における感染拡大状況の把握とともに、流通商品および野生個体の緊急検査体制の構築を図った。

3) 輸入爬虫類に寄生するマダニ類とマダニ体内における病原体生物の生態リスク評価

野生生物に寄生する吸血性マダニ類は、Q熱リケッチアやライム病ボレリアなど、様々な人畜感染症病原体を媒介する恐れがあり、外来マダニ類の侵入は自然生態系のみならず、人間生活に対しても重大な影響をもたらす恐れがある。本課題では、輸入爬虫類の外部寄生ダニ類の検査を実施し、これらダニ類の国内持ち込み状況の把握を行うとともに、マダニ体内における病原体生物の存在を調査した。

②輸入昆虫類に寄生するダニ類の生態リスク評価

日本では様々な昆虫類がペットとして輸入されており、特にクワガタムシに代表される甲虫類は人気・輸入量ともに突出している。これら外国産昆虫のほとんどは、野外生息地において採集されたものがそのまま輸入されており、様々な寄生生物が随伴して国内に持ち込まれている。昆虫の寄生生物に関する知見はまだ十分に揃っておらず、侵入寄生生物がもたらす生態リスク評価も基礎情報が不足している現状では難しい。寄生生物に関する生態学的情報のデータベース構築を急ぐ必要がある。本課題では、輸入クワガタムシ類に寄生するダニ類について形態およびDNA情報に基づく分類を行うとともに、宿主昆虫との共種分化関係をDNA系統樹に基づいて解析することを試みた。

3. 研究方法

①輸入爬虫類・両生類に由来する野生生物感染症のリスク評価に関する研究

1) 輸入爬虫類に由来する野生生物感染症のリスク評価に関する研究

a. トカゲ類の *Cryptosporidium* が在来種およびその他、爬虫類に及ぼす影響

飼育個体における浸淫状況を調査するため2001年より病性鑑定のために当研究室に持ち込まれたトカゲ類111例を病理学的に検索した。また、クリプトスポリジウム症を発症したヒョウモントカゲモドキの糞便から、QIAamp DNA Stool Mini Kitを用いてDNA抽出し、*C. parvum* 18srRNAをコードしたプライマーを用いたPCR増幅産物の塩基配列を検索した。また、8施設から飼育下の爬虫類から糞便を採取し、寄生虫学的に検索した。その内訳は12科47種181検体であった。さらに国内野生個体における感染状況を調べるため、全国各地で捕獲されたトカゲ類6種76検体を対象とした。剖検後、腸内容を寄生虫学的に検索した。その内訳は、ニホントカゲ、ニホンカナヘビ、ニホンヤモリ、タシロヤモリ、ホオグロヤモリ、ヒラオヤモリなどで、タシロヤモリ、ホオジロヤモリおよびヒラオヤモリは餌用に販売されていた野外採取個体を使用したため、生息地を特定することはできなかった。最後に、近年話題となっているインターネット通販でトレードされている商品個体における感染状況を調査するため、クリプトスポリジウム感染が疑われるヒョウモントカゲモドキを購入して病理学的及び寄生虫学的に検査した。外来種に随伴してきたクリプトスポリジウムが、在来種を含めたトカゲ類にどのような病原性を示すか感染実験を行った。ヒョウモントカゲモドキから分離、同定した *C. saurophirum* を用いた。予め、クリプトスポリジウムを接種・継代しているヒョウモントカゲモドキの腸内容および糞便 (0.1~0.2ml/匹、オーシスト約 $1.7\sim 2.5\times 10^5$ /ml) をトカゲモドキ科2種 (ヒョウモントカゲモドキ、オビトカゲモドキ)、ヤモリ科2種 (ニホンヤモリ、ヒラオヤモリ)、アガマ科2種 (フトアゴヒゲトカゲ、オキナワキノボリトカゲ)、カナヘビ科1種 (アオカナヘビ)、イグアナ科1種 (グリーンイグアナ)、スキנק科2種 (ニホントカゲ、オオシマトカゲ)、オオトカゲ科2種 (ナイルオオトカゲ、サバンナオオトカゲ) 計12種各々1~14匹に経口接種し、経時的に剖検を行い、病理学的及び寄生虫学的に検索した。

b. オオトカゲ (エメラルドツリーモニター *Varanus prasinus*、コバルトツリーモニター *Varanus macraei*) のヘルペスウイルス感染症の病理学的研究

インドネシアで捕獲されたエメラルドツリーモニター (*Varanus prasinus*) 10匹、コバルトツリーモニター (*Varanus macraei*) 5匹、ブラックツリーモニター (*Varanus beccarii*) 3匹、計18匹

がインドネシアの集積場を経由し、日本国内に輸入された。ブラックモニターを除くツリーモニターに、輸入直後から腹鱗が赤色を呈している個体が観察され、輸入2日後には吐血して1匹が死亡した。残りの個体は順次販売されていったが、最初の1匹が死亡してから10日間のうちに1匹を除いたエメラルドツリーモニター、コバルトツリーモニターが各飼育者のもとで同様の症状を呈して相次いで死亡した。最後の1匹も同様に発症したため病性鑑定のため安楽死を行なった。なお、2年前にも全く同様の事態が起きており、エメラルドツリーモニター、コバルトツリーモニターあわせて約8匹が死亡したが、病性鑑定は実施されていなかった。斃死したエメラルドツリーモニター (*Varanus prasinus*) 9匹と安楽死1匹、コバルトツリーモニター (*Varanus macraei*) 5匹計18匹を病理学のおよび分子生物学的に検索した。

c. リクガメの核内コクシジウム症

2003年12月から2004年3月にかけて4回産卵・孵化した計48頭の仔ガメのうち8頭に、2005年6月頃より食欲不振～廃絶、虚脱症状が現れた。閉眼、時折開口、緑色絮状物を含む尿酸を排泄。長い経過の後、脱水、沈鬱、虚脱と徐々に進行し4頭が衰弱死した。その後、生存している40匹の仔ガメの一般状態は一時的に改善したが、2006年4月に数匹が再発した。なお、仔ガメはサイズ別に複数のケージで飼育されていた。発症個体のみられたケージは他よりやや湿度が高くなる傾向にあったこと以外に餌、飼育環境に差はなかった。

今回、4例を病性鑑定のため麻布大学病理学研究室で安楽死後、剖検を行い、病理学的に検索を行なった。材料は、ケヅメリクガメ (*Geochelone sulcata*) 雌とヒョウモンリクガメ (*Geochelone pardalis*) 雄の交雑種の4頭で、いずれもオスで、年齢は2歳未満の幼体であった。

2) カエルツボカビ症の生態リスク評価と緊急検査体制の構築

2005年6月からカエルを飼育始め、2006年11月の時点で11種類の水棲および陸棲のカエル、計35匹を飼育する個人宅で、マダガスカル産、野生捕獲種のオオバガエルを導入したのちに、1週間に1匹程度の頻度でカエルが死に始め、その数は約2ヶ月で13匹に達し、1匹が発症した。その他、9月に1匹、翌1月1匹にも死亡した、カエルは単独の飼育容器で、数箇所の部屋に分散して飼育されていた。常態では佇んでいるカエルが、不安げに動き回ったり、暴れたり、活力低下、吐き戻しなどを呈して1～3日で死亡した。このうち、12月中旬に死亡したアマゾンツノガエル(飼育歴4ヶ月)とマルメタピオカガエル *Lepidobatrachus laevis* (飼育歴1年)、別名パジェットガエルの2匹と1月に死亡したナンベイウシガエル1匹を病性鑑定した。このうち、アマゾンツノガエルは死の2～3日前まで活力、食欲ともに良好であったが、頻繁に暴れるようになり、少量の血様便を排泄して斃死した。パジェットガエルは、脱皮が亢進し、水が混濁し易くなり、臭いも強く、反応が鈍化して死亡した。ホルマリン固定により皮膚表面に白色の薄膜が形成された。ナンベイウシガエルは、皮膚に異常な観察されなかったものの、硬直して、動きが不活発になり、仰向けにしても起き上がろうとはしなかった。内股部の皮膚に充血が見られた。なお、この飼育者は、カエル飼育歴が1年以上あるが、このような連続する不審死を経験していない。

死亡したアマゾンツノガエル、パジェットガエル、ナンベイウシガエルのホルマリン固定材料と発症したアルビノベルツノガエルの体表拭い液(スワブ)を用いた。

病理学的検索はホルマリン固定材料より、切り出しを行い、定法に従い、パラフィンブロック、

パラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行って観察した。

電子顕微鏡学的検索：ホルマリン固定材料から採材して、観察用標本を作製した。

遺伝子検査は死体については、ホルマリン固定材料より皮膚や指端の一部を採材してホルマリンを除いた後に、PCR法を用いてツボカビ遺伝子の検出を行った。

また、これらの検査と並行して、国内の流通個体および野生個体における感染状況をモニタリングするために緊急の検査体制を構築した。各都道府県に専門の獣医師を確保し、コア獣医師ネットワークを構築し、このネットワークを通じて、病理検査検体が麻布大学へ、遺伝子検査検体が国立環境研究所へ集約されるシステムを構築した。

3) 輸入爬虫類に寄生するマダニ類とマダニ体内における病原体生物の生態リスク評価

2001年～現在までに国内の愛好家、業者（ペット、貿易商）、展示施設で飼育されていたトカゲ類111例の病性鑑定を行った。このうち、採集された寄生性ダニのマダニ類について、ミトコンドリアDNAハプロタイプにより系統分類を実施するとともに、病原体保有状況をPCR法により病原体の感染状況を調べた。得られた病原体についてもDNA分析により系統解析を行った。

②輸入昆虫類に寄生するダニ類の生態リスク評価

輸入昆虫類の寄生生物に関する研究では、昆虫卸売市場に赴き、様々な地域から輸入されているペット用甲虫類からダニ類を採集して、分類・同定を行った。宿主-寄生生物間の共種分化ユニット解析の事例として、クワガタムシと寄生性ダニの分子系統比較を行った。クワガタムシの輸入解禁（1999年）以降に日本のクワガタナカセ相が変化したかどうかを調査した。日本産クワガタムシは輸入解禁以前の個体を含めて、主として乾燥標本の体表面及び鞘翅裏側に付着しているダニを採集した。またペットショップから購入したクワガタムシからもダニを分離した。さらに外国産と日本産ダニの生活史調査を行い、繁殖力の差を調べた。外国産と日本産クワガタムシの間で寄生性ダニの宿主交換実験を行い、宿主選好性の比較を行った。

4. 結果・考察

①輸入爬虫類・両生類に由来する野生生物感染症のリスク評価に関する研究

1) 輸入爬虫類に由来する野生生物感染症のリスク評価に関する研究

a. トカゲ類の*Cryptosporidium*が在来種およびその他、爬虫類に及ぼす影響

飼育個体における浸淫状況については、クリプトスポリジウムに何らかの関連があるトカゲが44例含まれていた。これらを、寄生虫学および病理学的に検索したところ、死後変化高度で判定できないものを除いて、少なくとも28例にクリプトスポリジウムの感染を確認した。その内訳は、ヒョウモントカゲモドキ23、オビトカゲモドキ2、トゲオイグアナ1、チャクワラ1、ウオータードラゴン1であった。このうち、オビトカゲモドキは、2003年に天然記念物に指定されたが、2001年当時、ペットトレーディングの対象となっており、このトカゲの渋い魅力と希少価値とにより愛好家が多くいた。一部の愛好家は、繁殖個体を生息地に戻し、個体数を増やす計画を立てているものもいた。今回、病性鑑定したオビトカゲモドキも、そうした繁殖を目指す愛好家宅で発症したもので、1匹は食欲不振と消瘦といった非特異的症状を呈し、もう1匹は突然死であった。病理組織学的には、主として小腸に夥しい数のクリプトスポリジウムの寄生を観察し、ヒョウモントカゲモド

キの病変に比較して重篤であった。なお、今回、対象としたトカゲ類は、愛好家、業者（ペット、貿易商）および展示施設より送付された。

病性鑑定の結果、ヒョウモントカゲモドキ以外のトカゲ類や、異なる由来のトカゲ類からもクリプトスポリジウムが検出されたことから、国内飼育下トカゲ類にすでにクリプトスポリジウムが浸淫していると判断された。そこで、神奈川県衛生研究所黒木俊郎研究員の協力を得て、主に展示施設の動物を対象としてトカゲ類の糞を収集し、クリプトスポリジウムの保有状況を調査した。結果は、表2のとおりである。展示施設で飼育されているトカゲ類のクリプトスポリジウム保有率は平均11.0%で（0～20.0%）、6科（トカゲモドキ科、ヤモリ科、アガマ科、オオトカゲ科、カナヘビ科、イグアナ科）、11種に感染が確認され、保有率は0～100%と様々で、カメレオン科100%（1/1）、ヒョウモントカゲモドキが属するヤモリ科は10.7%（9/84）であった。クリプトスポリジウムを保有していたトカゲの種類は、表2のとおりで、11種類に及んだ。施設別保有率は、0%～20.0%と施設によって異なっており（表3）、さらに、個人飼育のトカゲ類では、24検体中16検体（66.7%）と高率に検出され、かなり汚染が広がっていることが分かった。なお、クリプトスポリジウムが検出されたトカゲ類の中には、食欲不振がある、食べても太らないといった症状を呈するものもあったが、このような症状は良く遭遇する所見である上に、ほとんどのトカゲ類が見かけ上健康であったため、飼育者自身はクリプトスポリジウムによる汚染に気が付いていない場合がほとんどだった。

以上のように、すでに国内飼育下の展示施設や個人の愛好家など由来に関わらず、さらに、多くの種類のトカゲ類にクリプトスポリジウムが広く浸淫していることが明らかになった。

表1 動物園で飼育されているトカゲ類における
クリプトスポリジウム保有状況。

科名	種数	検体数	陽性数	保有率
トカゲ目(12科)	47	181	20	11.0
アガマ科	5	14	2	14.3
アシナシトカゲ科	1	1	0	0
イグアナ科	10	33	4	12.1
オオトカゲ科	7	18	4	22.2
カナヘビ科	1	2	0	0
カメレオン科	1	1	1	100
コブトカゲ科	1	1	0	0
スキנק科	10	19	0	0
テュー科	1	1	0	0
ドクトカゲ科	2	6	0	0
ヤモリ科	7	84	9	10.7
ヨロイトカゲ科	1	1	0	0

表2 クリプトスポリジウムが検出された動物。

目	科	種
トカゲ	アガマ科	フトアゴヒゲトカゲ マリトゲオアガマ

イグアナ科	ウォータードラゴン エンジェルアイランドチャクワラ トゲオイグアナ
オオトカゲ科	サバンナオオトカゲ ザラクビオオオトカゲ ナイルオオトカゲ ミズオオトカゲ
カメレオン科	ベルコーカサスカメレオン
ヤモリ科	ヒョウモントカゲモドキ

表3 施設別クリプトスポリジウム
保有率。

施設	検体数	陽性数(%)
トカゲ目		
B	20	3(15.0)
C	13	0
D	122	14(11.5)
E	5	1(20.0)
F	12	1(8.3)
G	6	1(16.7)
H	2	0
I	1	0

飼育下のトカゲ類がクリプトスポリジウムに汚染されていることを受けて、続いて、野生のトカゲ類を対象として調査を行った。

ニホンヤモリの1検体とヒラオヤモリの1検体から *Cryptosporidium* sp. が検出されたのみであった。なお、ヒラオヤモリはペットショップで販売されていたもので、元々クリプトスポリジウムを保有していたものか、販売中に汚染されたものか不明であった。

次にインターネット流通商品として購入したヒョウモントカゲモドキは、クリプトスポリジウムに感染していた。インターネット上での取引のみならず、ペットショップで、見かけ上健康なヒョウモントカゲモドキを購入し、以前から飼育していたヒョウモントカゲモドキと同居させたところ、新規導入動物が死亡し、さらに同様の症状で、同居動物が死亡した。このヒョウモントカゲモドキは病性鑑定でクリプトスポリジウム症と診断された。このことから、同ペットショップで飼育されている他のヒョウモントカゲモドキ19匹の糞を収集、検査したところ、1/3からクリプトスポリジウムが検出された。

糞へ排泄されるオーシスト数は、哺乳類に比べれば、爬虫類は劇的に少なく、夾雑物も多く、非常に検査が難しい。さらに、感染ヒョウモントカゲモドキの糞中クリプトスポリジウムの排泄数を経時的に検査したところ、検査日によって排泄数は変動し、全く排泄されない時もあった。このような状況を鑑みると、先のペットショップでは、すでになんかなり汚染が広がっているものと考えられる。以上のことから、様々な流通手段によって、飼育下トカゲ類にクリプトスポリジウムが今現在

も拡大し続けていると考えている。

現在のところ、国内野生トカゲ類では、クリプトスポリジウムの感染は極めて稀である。しかしながら、飼育下のトカゲ類の間では、確実に浸淫し続けていると考えている。そこで、外来種に随伴してきたクリプトスポリジウムが、在来種を含めたトカゲ類にどのような病原性を示すか感染実験を行った。

ヒョウモントカゲモドキ、オビトカゲモドキ、ニホンヤモリ、ヒラオヤモリ 2 種、オキナワキノボリトカゲ、アオカナヘビで感染が成立した。このうち、ヒョウモントカゲモドキは接種後40週から斃死する個体がみられ、自然回復は見られなかった。オビトカゲモドキでは経過が早く、5週で斃死するものがあった。ヒョウモントカゲモドキとオビトカゲモドキを除く他のトカゲ類では、観察期間中の斃死例はなく、12週では原虫寄生率が減少し、病変が軽減していた。斃死例の肉眼および組織像は自然発生例と同様であった。種類によって、原虫の分布、寄生率と病変の程度に違いがあったが、在来種では病変がより高度であった。以上のことから、国内で分離されたクリプトスポリジウムは、広い宿主域を有し、在来種では高感受性で、特に2003年に天然記念物となったオビトカゲモドキでは、進行も早く、致死的事であることが明らかで、その病態はヒトの後天性免疫不全症に類似していた。

クリプトスポリジウムは各種消毒薬に抵抗性でかつ治療もなく、水系感染もすることから、クリプトスポリジウムは飼育下爬虫類に多大な損失を与えるのみならず、多くの在来種がクリプトスポリジウムに感受性を有しているということは、万が一、クリプトスポリジウム保有爬虫類が野外に放逐あるいは脱走し、在来種にクリプトスポリジウム感染が広まった場合、貴重な在来種の存亡に関わる事態になるものと考えられ、警戒すべき重要な病原体で、早急に何らかの対処をする必要がある。

b. オオトカゲ (エメラルドツリーモニター *Varanus prasinus*、コバルトツリーモニター *Varanus macraei*) のヘルペスウイルス感染症の病理学的研究

肉眼病変は、口腔～上部食道内に主座し、口腔内の充血、出血がみられ、口腔内に滲出物が認められ、肝臓に白色結節、口腔内の充血、出血などが認められた。組織学的には口腔粘膜に細菌の感染を伴う壊死が認められた。個体によって程度に差がみられたが口腔粘膜の壊死は、口腔の吻側において比較的軽度であり、食道に近い部位ほど高度になる傾向にあった。舌粘膜上皮は残存していることが多く、この上皮細胞に変性、壊死が観察され、好酸性ないし両染色性の核内封入体の形成が認められた。この他、同様の封入体は口腔の下顎粘膜固有層に存在する唾液腺細胞にも認められた。また、いくつかの個体で肝臓に細菌の感染を伴う巣状壊死が認められ、同部の肝細胞に好酸性ないし両染色性の核内封入体が観察された。

電子顕微鏡学的検索により、唾液腺組織の感染細胞の核内にエンベロープを持たない直径約100nmで円形の未熟なウイルス粒子が認められ、電子密度の高いcoreと厚い膜を有するウイルス粒子も認められた。これらのウイルス粒子は形態、サイズ、および粒子の存在位置においてヘルペスウイルス科のそれと一致した。さらに、PCR法を用いて行われた分子生物学的検索で、口腔粘膜および肝臓から抽出したDNA産物からヘルペスウイルス特異DNAが検出された。以上の所見より、ツリーモニターのヘルペスウイルス感染症と診断した。なお、本ウイルスの塩基配列は、過去に報告のあるヘルペスウイルスのそれと一致するものではなく新種のウイルスと考えられた。

ヘルペスウイルスは、トカゲでは1972年に初めて、イグアナ科グリーンイグアナ2匹で確認された。いずれのイグアナも、臨床的に健康で、病変は観察されていない。しかしながら、分離されたウイルスを培養細胞に接種すると培養細胞に細胞変性効果（CPE）を示し、電子顕微鏡を用いた検索によりヘルペスウイルスが証明されている。これまでにトカゲのヘルペスウイルス感染症はヨロイトカゲ科、イグアナ科、アガマ科、カナヘビ科において報告がある。ヘルペスウイルス感染により死亡したアガマ科のRed-headed agama (*Agama agama*) では、核内封入体形成を伴う肝臓、脾臓の巣状壊死が認められ、電子顕微鏡学的にヘルペスウイルスが確認されている。また、カナヘビ科の*Lacerta viridis*では皮膚に形成された乳頭腫にヘルペスウイルスが認められた。これらのアガマ科、カナヘビ科におけるヘルペスウイルス感染症では口腔内の病変の記載はない。しかしながら、ヨロイトカゲ科のSudan plated lizard (*Gerrhosaurus major*)、Black-lined plate lizard (*Gerrhosaurus nigrolineatus*) でみられたヘルペスウイルス感染症の報告では口腔内、特に舌粘膜に壊死性の炎症と伴い好酸性の核内封入体が認められ、今回検索を行なったツリーモニターの病変に類似していた。

今回、みられたヘルペスウイルス感染症には2つの機序が考えられた。第一は、潜伏感染したヘルペスウイルスの再活性化で、ヘルペスウイルスの特徴として、ウイルスは発症の有無にかかわらず特定の臓器、組織にゲノムの状態で生存し続ける。潜伏感染したウイルスは、宿主のストレス、免疫力の低下などにより再活性化し、宿主は再び発症し、ウイルスの体外に排泄される。臨床的に無症状のグリーンイグアナからヘルペスウイルスが分離された報告も、ヘルペスウイルスが潜伏感染することを示唆している。今回のオオトカゲの場合でも臨床的に無症状な潜伏感染個体が捕獲や輸送によるストレスや免疫力の低下から発症し、さらに免疫力の低下した個体へ感染が広がったと推測もできる。

第二は、新たにヘルペスウイルスに暴露されたことにより感染・発症する機序である。今回対象とした動物は、ペット用として流通していたもので、流通の過程で、他の動物が保有するヘルペスウイルスに暴露され、発症に至ったとも考えられる。もしこのような機序で発生に至った場合、今回の事例では、輸入直後から死亡個体が見られることから、ウイルスが感染したのはインドネシアの集荷場であった可能性が高い。

ヘルペスウイルスは、種特異性が高く、Clarkらは、グリーンイグアナから分離されたヘルペスウイルスはグリーンイグアナ由来の培養細胞およびハコガメ由来の培養細胞に対してはCPEを示したが、ヤモリ、ヘビ、ワニ、両生類、魚類、鳥類、哺乳類由来の培養細胞ではCPEを示さなかったと報告している。しかしながら、サルBウイルスや、豚ヘルペスウイルス1型のオーエスキー病のように α ヘルペスウイルスの常として、異種に感染が成立した場合、固有宿主よりも重篤な症状を示す。今回確認されたヘルペスウイルスの固有宿主や宿主域も不明であったが、同一ロットのすべてのトカゲが短期間に死亡したことから、異種の動物のヘルペスウイルスに暴露された可能性もあった。以上のように、2つの機序が考えられたが、今回の検索のみでは、その発生機序を明らかにするに至らなかった。

爬虫類におけるヘルペスウイルスの生体内への感染経路については明らかになっていないが、今回の検索で病変が口腔内中心であったことから、経口感染した可能性が高く、発症個体から唾液などを介し直接感染したと考えた。

本研究の対象とした、エメラルドツリーモニター、コバルトツリーモニターと同時に輸入された

ブラックツリーモニターにはヘルペスウイルス感染症の発症はみられなかった。感染が成立しなかった理由としては、発症のみられた2種のツリーモニターとは異なり、ブラックツリーモニターはヘルペスウイルスに抵抗性があったため感染が成立しなかった、もしくは現地ストック場および輸送の過程で、ウイルスに暴露されなかったと考えられるが不明である。

死亡したツリーモニターについて微生物学的検査を行った結果、口腔スワブ、肝臓、糞便から多くの種類の細菌が分離されたが、特定の細菌が優位に分離されることはなかった。爬虫類の口腔や消化管内には様々な種類の細菌が常在しており、生体の免疫状態によって、特にグラム陰性菌による日和見感染が起きることがある。そのうち *Aeromonas hydrophila*、*Providencia* 属、*Citrobacter freundii*、*Enterococcus* 属、*Klebsiella* 属、*Streptococcus dysgalactiae*、*Staphylococcus aureus* 属、は過去に爬虫類の口内炎で分離された報告がある。また、リクガメヘルペスウイルス感染で引き起こされた口内炎には、二次的に細菌感染が頻発する。以上のように、特定の細菌がコンスタントに病変部から分離されないこと、細菌感染の見られない口腔粘膜や唾液腺などの上皮細胞に変性と壊死が観察されることから、ウイルス感染による口腔における生体防御機構の破綻が細菌感染の素地となり、口腔粘膜への細菌感染に引き続き、敗血症に陥り死亡したものと考えられた。

今回、検出されたヘルペスウイルスは、ある種類のツリーモニターに致死的であることから、この種のトカゲの飼育に際しては、十分に注意すべき疾患と考えられる。本研究で対象としたコバルトツリーモニターは、近年、インドネシアのバタワンタ島で、発見された種類で、この島以外での生息は確認されていない稀少種である。種の保存という観点からもヘルペスウイルス感染症は重要かつ注意しなければならない感染症であり、ヘルペスウイルスの侵入を未然に防ぐことが重要である。

c. リクガメの核内コクシジウム症

調査したカメは高度の体重減少があり、重度の脱水、眼瞼は軽度に腫脹し、口周囲に乾燥した唾液が付着し、口粘膜は蒼白であった。脾臓は萎縮的で、大腸など周囲組織に癒着していた。肝臓は褐色調で、小葉様の構造が明視された。大腸には硬固な濃緑色の内容物と偽膜様の内容物がみられた。腎臓は水腫性で、膀胱には尿・尿酸が大量に貯溜していた。剖検した他の3匹にもほぼ同様の肉眼像が観察されたが、膀胱内には尿・尿酸に混ざって緑色の絮状物が認められた。

組織所見：脾外分泌細胞核内に好酸性胞状、分葉状あるいは好塩基性放射状など様々な封入体が観察され、腺房壊死やチモーゲン顆粒の減少がみられた。肝臓では一部に肝細胞の腫大があり、肝細胞核内に脾臓と同様の封入体が観察され、肝細胞の壊死も見られた。胆管上皮内にも核内封入体がみられ、好塩基性で花冠状を呈していた。また、脈管周囲に少数のリンパ球と時に偽好酸球も浸潤していた。十二指腸は杯細胞の減少、核の腫大を伴う封入体形成があり、上皮内へリンパ球やマクロファージが浸潤していた。この他、消化管全域上皮、尿細管上皮、肺胞上皮、気管支上皮、脈絡膜上皮、脾臓、膀胱移行上皮でコクシジウムを確認した。電顕検索では、好酸性胞状の封入体と一致するトロフォゾイトや好塩基性封入体と一致するメロントおよび残体と $3 \times 0.8 \mu\text{m}$ の三日月状のメロゾイトも見られた。さらに、マクロガメートサイトやマイクロガメートサイトも見られた。なお、1頭のカメには、肝臓・大腸のアメーバ寄生、肝壊死や壊死性大腸炎が観察された。よって、本事例は、リクガメの核内コクシジウム症（肝細胞変性と壊死、脾外分泌細胞の変性と壊死、十二指腸腸上皮変性）と診断された。

脊椎動物に寄生するコクシジウムは一般に腸管上皮の細胞質内で体内発育を行う。しかし、稀で

はあるが数種類のコクシジウムが核内で生活環を営むことが報告されている。これまでにEimeria, Isospora, Cyclosporaで11種類、寄生動物種としては爬虫類、ガチョウ、牛、モグラ、魚類で観察され、特に爬虫類での検出例が多い。爬虫類の核内コクシジウム感染は主としてトカゲで、非病原性あるいは低病原性である。しかしながら、ホウシャガメにおいて核内コクシジウム症の報告があり、6例中2例の発生で腎炎、膵炎、肝炎、腸炎がみられた。これまで、リクガメの核内コクシジウム症の集団発生は2例の報告があるだけで、本例は、本邦第1事例となった。今後、種の同定を含め、生活環および病原性についてさらなる検索が必要である。また、国内でもホウシャガメに致命的に働く核内コクシジウムが存在することが明らかになったことから、新規に動物を導入する場合、本疾患も考慮した検疫が必要と考える。

2) カエルツボカビ症の生態リスク評価と緊急検査体制の構築

観察されたカエルツボカビの発生状況は表4の通りである。

【組織学的所見】：アマゾンツノガエルとバジェットガエル2匹ともに同様の所見で、急性ツボカビ症と診断された。広範囲に表皮細胞の風船化が強く、表皮表層の剥離もあった。ところどころに肥厚した表皮(過形成)が観察され、この部分に特徴的な所見がみられた。表皮表層の有棘細胞層とケラチン層内に大小の球形構造物(遊走子嚢)が存在した(図1、2)。この構造物には3型があり、1つは、表皮細胞の核のサイズとそれほど変わらない、クロマチン豊富な球状体を通常1つ(未熟なツボカビ)を含むもの、2つ目は小型の円形から楕円形の粒子(遊走子)を多数含むもの、また、遊走子嚢の一部がツボの口のように外方へ飛び出す排出管も認められた。3つ目は遊走子を放出した後の遊走子嚢で中空の構造物として観察された。そのような病巣の表面には多数の細菌が認められた。ナンベイウシガエルは、ツボカビ感染数が少なく、表皮の過形成が高度で、慢性ツボカビ症と診断された。

【電子顕微鏡観察】：放出管を有する多数の遊走子嚢を確認した(図3、4)。

【PCR結果】2匹のカエルの皮膚を材料として、*Batrachytrium dendrobatidis* に特異的なプライマー(Bd1aとBd2a: Annis, S. L. ら(2004))を用い、PCRを行ったところ、*B. dendrobatidis*に特異的な300bpのバンドが観察された。なお、発症し隔離中のベルツノガエルとナンベイウシガエルの皮膚swabも同様にPCR陽性となった。

以上の成績から、4例を真性ツボカビ症と診断した。*B. dendrobatidis*はこれまでのところ、北中南米、アフリカ、オーストラリア、ニュージーランド、欧州に分布しており、確認されていないのは、アジア地域のみとされてきたため、本事例がアジアで初のツボカビ症の報告となった。

今回、2006年12月にツボカビが確認されたが、国内へのツボカビ侵入が2006年に起きたということの意味していない。国内侵入時期を特定するためには、遡及的調査が必要である。

表4 発生状況

	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月
アマガエルWC ①		7/12(水) 導入		9/10(日) 死亡			
バジレットガエル CB①		7/30導入			10/31 異常	11/1(水) 死亡	
バジレットガエル CB②					11/1 異常	11/2(木) 死亡	
ファンタジーツノ ガエルCB				9/3(金) 導入		11/8(水) 死亡	
アマゾンツノガエル CB①						11/9(木) 死亡	
コロンビアツノガ エル				9/7導入		11/4-10死 亡	
アマガエルWC ②					10/25 導入	11/21(火) 死亡	
アジアウキガエ ル						11/28 8匹 中1匹死亡	
アマガエルWC ③					10/25 導入	11/29(水) 死亡	
ナンベイウシガ エルCB						11/25導入	12/8(火) 死 亡
バジレットガエル CB③							12/13(水) 死亡
アマゾンツノガエ ルCB②						11/25導入	12/19(金) 死亡
バジレットガエル CB④							12/17(土) 死亡
アマゾンツノガエ ルWC③							12/20(水) 死亡
アルビノベルツノ ガエル							死産

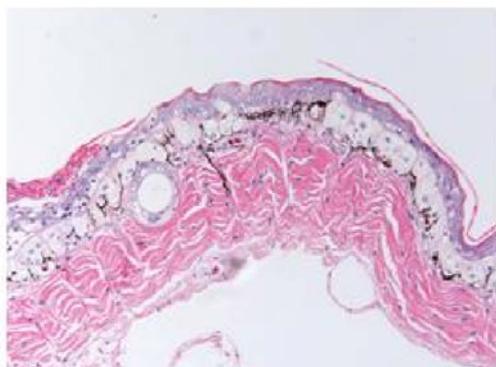


図1 アマゾンツノガエル
皮膚、HE染色
病変軽度の部分、画面左のケラチン層に
少数のツボカビが観察される



図2 アマゾンツノガエル
皮膚、HE染色
病変重度の部分、ケラチン層および表皮
細胞層が不規則に肥厚している。肥厚した
ケラチン層に多数のツボカビが観察される。

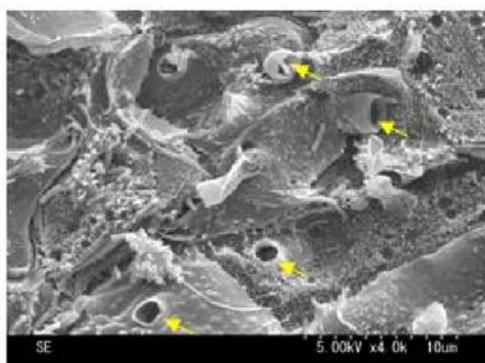


図3 アマゾンツノガエル
皮膚表面、走査型電子顕微鏡
放出管

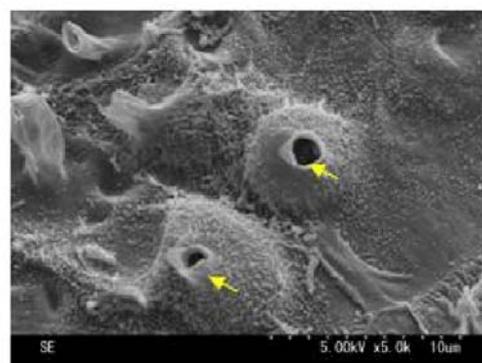


図4 アマゾンツノガエル
皮膚表面、走査型電子顕微鏡
放出管を備える遊走子嚢

今回の流行は、マダガスカル産野生捕獲種ヒメアマガエルを新規に導入したことから、流行が起

きているように思われるが、カエルの種類によって、潜伏期間や発症、死に至るまでの時間が異なるため、一概にこのカエルが感染源であるとは考察できない。また、仮に、このカエルが感染源と仮定しても、現地であるいは国内外の流通経路で感染したかは不明であった。また、このカエルも死亡しており、自然宿主ではないと考えられる。

感染経路としては、水による伝播が考えられる。この愛好家宅では、単独飼いで、飼育場所が分散しているにもかかわらず、不審死が連続した。伝播は、1週間に1度行われる水槽の水替えを同一の容器で行ったことにより、生じたものと推察した。

以上の結果から、世界で両生類の減少に猛威を振るっているカエルツボカビ菌が、我が国にも上陸していることが明らかとなった。この事態に本研究課題では、緊急検査体制を構築することを図った。その結果、全都道府県に専門知識を備えたコア獣医師の設置が完了し、コア獣医師ネットワークを通じて、病理検査用の生体・死体標本およびPCR検査用の皮膚スワブ標本がそれぞれ麻布大学および国立環境研究所に集約されるシステムが完成した（図5）。麻布大学および国立環境研究所ではホームページを通じてカエルツボカビ菌の情報を発信するとともに、検査受付についての解説を行い、普及啓発およびサンプル収集に現在も取り組んでいる。このような重大な野生生物感染症の侵入を迅速に発見するとともに、モニタリング体制を構築できたのは、本推進費プロジェクトで培われた研究機関間のネットワークによる功績である。

カエルツボカビ疑惑個体検査体制フローチャート

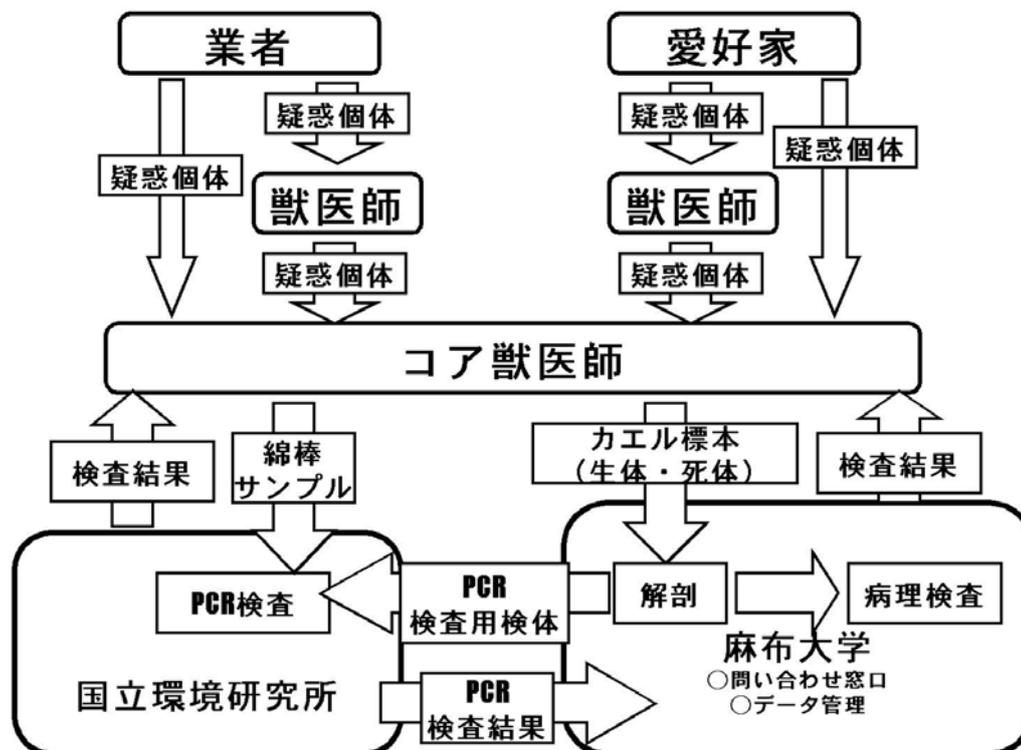


図5. カエルツボカビ感染個体の検査・モニタリング体制。

3) 輸入爬虫類に寄生するマダニ類とマダニ体内における病原体生物の生態リスク評価

アフリカ原産のボールパイソン、ヒョウモンリクガメ、およびグリーンイグアナ、およびタンザニア産サバンナオオトカゲから、吸血性ダニの 1 種キララマダニ *Amblyomma sparsum* がおよび *Aponoma* 属マダニが検出された (表 5)。

表 5. 輸入外国産爬虫類から検出されたマダニ類。

通し番号	寄生宿主情報			Ti情報
	種類品種	採取日	W/B輸入先	形態同定結果
1	ST-ヘビボールパイソン	2004.7.8	W トー(アフリカ)	<i>Aponoma</i>
2	ST-カメヒョウモンリクガメ	2004.7.8	W スー(アフリカ)	<i>Amblyomma spa</i>
3	ST-カメヒョウモンリクガメ	2004.7.8	W スー(アフリカ)	<i>Amblyomma spa</i>
4	ST-トカゲグリーンイグアナ	2004.7.8	W スリ(アフリカ)	<i>Amblyomma spa</i>
5	ST-トカゲグリーンイグアナ	2004.7.8	W スリ(アフリカ)	<i>Amblyomma spa</i>
6	ST-トカゲグリーンイグアナ	2004.7.8	W スリ(アフリカ)	<i>Amblyomma spa</i>
7	ST-トカゲグリーンイグアナ	2004.7.8	W スリ(アフリカ)	<i>Aponoma</i>
8	ST-ヘビボールパイソン	2004.7.8	W トー(アフリカ)	<i>Aponoma</i>
9	KK-ヘビアオダイショウ	2005.6.13	B 神奈川県秦野市	<i>Amblyomma test</i>
10	TA-トカゲサバンナオオトカゲ	2005.10.25	W タンザ(アフリカ)	<i>Aponoma</i>
11	TA-トカゲサバンナオオトカゲ	2005.10.25	W タンザ(アフリカ)	<i>Aponoma</i>
12	TA-トカゲサバンナオオトカゲ	2005.10.25	W タンザ(アフリカ)	<i>Aponoma</i>

これらのダニのミトコンドリア DNA 塩基配列情報を既存のマダニ DNA 情報と組み合わせて系統解析を行った結果、キララマダニと同定された 5 個体 (ST-2, 3, 4, 5, 6) には系統的に異なる 2 グループ (系統樹のクレード) が含まれており、また同様に *Aponoma* 属と同定されたもの (ST-1, 7, 8, TA-1, 2, 3) は既知の種とは異なるハプロタイプを保有していることが示され、形態同定のみで寄生性ダニの分類を行うことは困難であることが示された。さらに、これらのダニが病原微生物を保有していないかを PCR 法により検査した結果、4 個体 (ST-1, 2, 3, 7) からボレリア細菌が検出された。これらボレリア細菌のミトコンドリア DNA 塩基配列情報を既存のボレリア細菌 DNA 情報と組み合わせて系統解析を行った結果、これまでに知られていないボレリア細菌であることが示唆された (図 6)。今後、この新型ボレリアの病原性について早急に検証を行う必要がある。以上の結果から、輸入爬虫類から「新型」系統のマダニ類およびその体内より「新型」ボレリアが検出され、寄生生物にも未知なる多様性が存在すること、さらに爬虫類の輸入により、そうした未知の寄生生物が侵入してくるリスクが浮き彫りとなった。

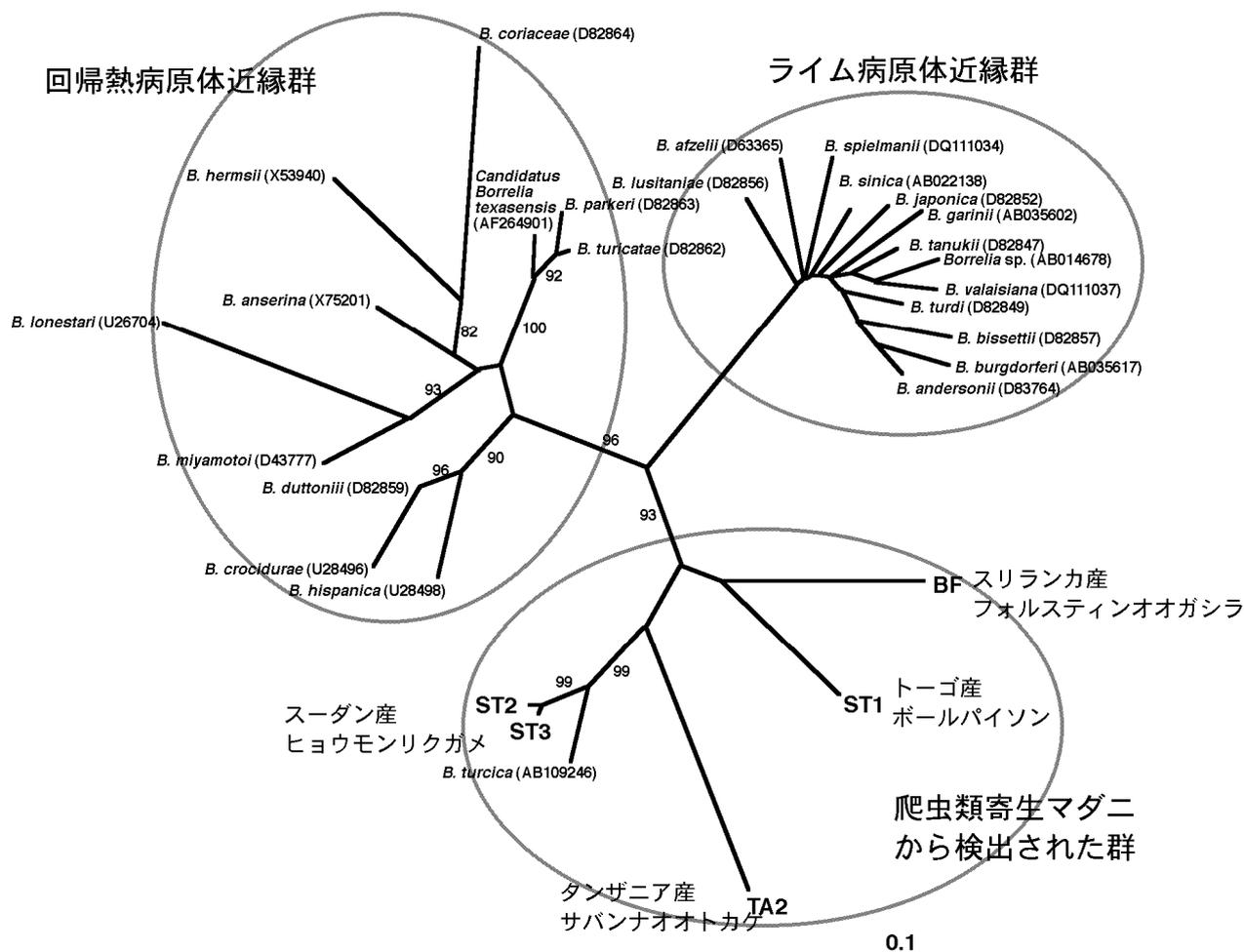


図6. マダニ類から検出されたボレリア細菌と既知のボレリア細菌種の鞭毛遺伝子f1aB系統樹。

②輸入昆虫類に寄生するダニ類の生態リスク評価

輸入昆虫類の寄生生物に関する研究では、2004年度にペット用として大量に輸入されている甲虫類について、輸入業者2社に赴き、寄生性ダニの感染状況の調査とサンプル採集を行い、得られたサンプルについて形態精査により分類同定を行った。その結果、様々な甲虫類からダニ類が検出された。これらのダニ類の多くは分類が確定していないものも多く含まれており、外来種と在来種の判別を可能にするためにも、今後も多くの地域からのサンプル収集を急ぐとともに、分類および記載を急ぐ必要があると考えられた。

収集されたダニのうち、Canestriniidae (コウチュウダニ科) に属する数種のダニは、広くアジア域に分布しているクワガタムシ類固有の寄生性ダニ (通称クワガタナカセ) で、宿主-寄生生物の特異性や共種分化を調べる材料として好適であると考えられた。そこで我々は、2004年度に国内外の様々な地域から採集されたクワガタムシからクワガタナカセを採集し、DNAを抽出してミトコンドリアDNAチトクロムオキシダーゼ(CO)遺伝子領域をPCR法により増幅して塩基配列を解析して、クワガタナカセ地域個体群の系統関係を調べた。得られた系統樹を宿主であるクワガタムシのDNA系統樹と照らし合わせることで、宿主(クワガタムシ)-寄生生物(クワガタナカセ)の分子共種分化関係を調べた。その結果、クワガタナカセにも宿主であるクワガタムシ

と同様に多様な遺伝的系統が存在し、地理的に分化していることが示された。また宿主による分化、即ち、宿主特異的種分化も示唆され、クワガタムシとの共種分化関係はおよそ 500 万年以上の歴史を経て形成されたことが推定された。

形態的変異も精査した結果、クワガタナカセから大きく4つの遺伝的系統を発見し、それぞれ形態学的にも分化していることが示された。クワガタムシとクワガタナカセの遺伝子系統樹を比較した結果（図1）、東南アジア域では同一地域に生息するクワガタナカセ間でも宿主の種や系統によって、遺伝的に分化していることが明らかとなった。また、日本のクワガタナカセには2系統存在し、それぞれの分布域から、氷河期における琉球列島弧経由および朝鮮半島経由で日本列島に進出してきた系統であることが示唆された。また、各系統内で、異なる宿主に同じ遺伝的系統のクワガタナカセが寄生しているケースも確認された。例えば、本土のヒラタクワガタとオオクワガタは遺伝的に分化した別種であるが、両者に寄生するクワガタナカセの遺伝的分化は極めて浅かった。これらのことから、クワガタナカセは宿主であるクワガタムシの遺伝的分化に伴い、宿主特異的な共種分化を果たし、氷河の後退と温暖化によるクワガタムシの北進に伴い、後追的に宿主転換を重ねながら分布を拡大してきたものと推察された。以上の遺伝子系統解析および形態分析の結果から、クワガタナカセの分類学的再考を行い、今回確認された4つの遺伝的系統を *Canestrinia spectanda* 群、*Coleopterophagus berlesei* 群、*Sandrophera amarae* 群、および *Noemiphera izabelae* 群の明らかな4種とその近縁種として再記載することとした（図2）。今回の調査結果から昆虫に寄生するダニ類にも高い多様性が存在することが示された。

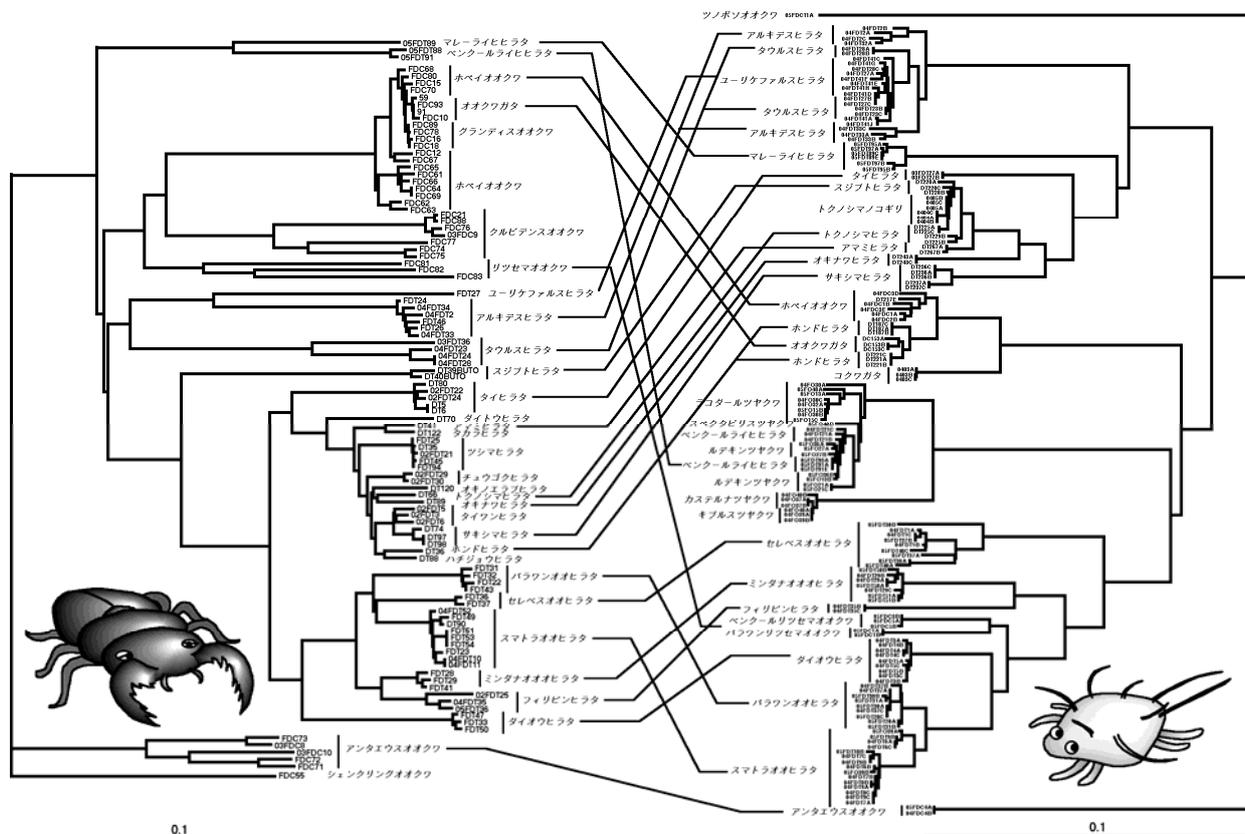


図7. クワガタムシとクワガタナカセの分子系統樹。

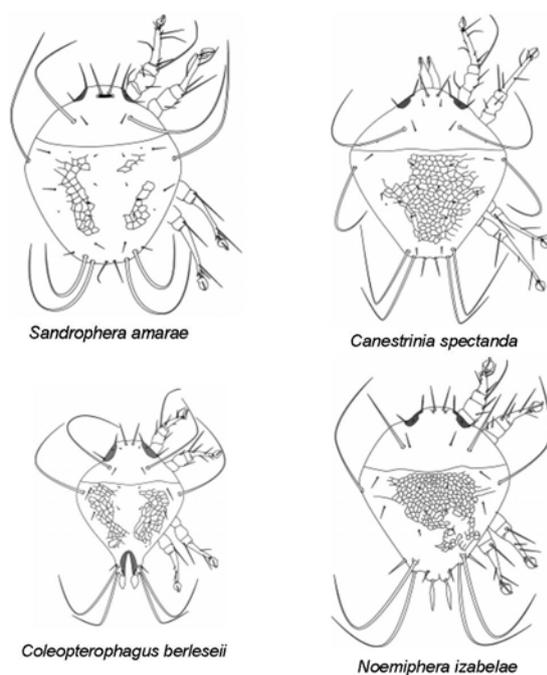


図8. 新種記載されたクワガタナカセ種群4種。

日本産クワガタナカセは寄主特異性が高く、クワガタナカセ輸入解禁以降も東南アジア産ダニが野外で繁殖している可能性は低いと考えられた。日本には少なくとも14種のクワガタナカセが生息しており、南西諸島、本土及び小笠原のクワガタナカセはそれぞれ形態的に明らかに異なっている。このことから島国である日本では海洋による地理的隔離が生じていると考える。また、亜高山帯のクワガタムシに寄生するクワガタナカセと平地に広く分布する種も、形態的に著しく異なっていることから、気温あるいは山地・河川などの地理的条件によって遺伝的に隔離されている現状が明らかとなった。

東南アジア産クワガタナカセも高い寄主特異性を示した。しかし、ペットショップで購入したクワガタムシの中には、明らかに本来の寄生者ではないクワガタナカセが発見されることがあり（例：*D. reichei*から*Odontolabis*属のクワガタナカセである*Noemiphera izabelae*が採集された。）、ペットショップという環境がクワガタナカセによる汚染の現場になっている可能性が示唆された。

さらにクワガタナカセの生態学的特性の実験的調査を実施した。クワガタナカセの鋏角（口器）の形態から食性について検討したところ、口針状ではなく、細長く鋸歯が少ないという特徴から（図9）、一般にクワガタナカセは吸汁性ではなく個体を摂食しており、ホストの体表面をから固化した分泌物などをこそげ取って摂食していることがわかった。またクワガタナカセの体内容物を検鏡した結果、菌糸等も摂食していることが明らかとなった。このことからクワガタナカセの多くはホストを直接傷つけることはないが、菌類を媒介する可能性が示唆された。



図9.クワガタナカセの口器。

フィリピン産パラワンオオヒラタクワガタ寄生のクワガタナカセおよび日本産コクワガタに寄生するコクワガタナカセの生活史特性を比較した結果、日本産クワガタナカセのほうが相対的に発育期間が短い、産卵数はフィリピン産クワガタナカセのほうが約4倍も大きいことが示された。またクワガタナカセの移動能力を検証した結果、感染した宿主個体と非感染の宿主個体間の直接の接触が無くとも、クワガタナカセの自律歩行により、非感染の個体への水平感染が起こることが確かめられた。このことは、クワガタムシの搬送や飼育に伴い、このダニの感染が拡大する可能性を強く示唆する。次に、インドネシア産スマトラオオヒラタクワガタ寄生のクワガタナカセと日本産コクワガタ寄生のクワガタナカセ間で宿主交換実験を行った結果、インドネシア産クワガタナカセはコクワガタ非感染個体への成虫接種後、定着・繁殖に成功し、個体群密度が高くなったが、日本産クワガタナカセはスマトラオオヒラタクワガタ非感染個体への成虫接種後、1週間で個体群が絶滅した。このことから、クワガタナカセの宿主特異性には変異があり、東南アジア産のクワガタナカセは宿主幅が広いものも含まれていることが示唆された。

以上の結果より、クワガタナカセという、これまでほとんど注意が払われていなかった小さな寄生性ダニにも多様な遺伝的変異が内包されており、その遺伝的分化は宿主であるクワガタムシとの共種分化によって形成されたことが示唆された。即ち、寄生性ダニ個体群にも地理的距離と進化時間によって隔てられた進化的重要単位(ESU)が存在することが示された。現在の外国産クワガタムシ個体の大量輸入・搬送が続けば、その過程で、寄生生物の遺伝子組成も攪乱され、この共種分化関係も崩壊する恐れがある。クワガタナカセがクワガタ体表の有機物および菌類を捕食しているものと推定されただけでなく、クワガタナカセの体表面からは、複数の寄生菌類(ラブルベニア菌)が採集された。そのうちの一種は *Coleopterophagus berlesei* (コクワガタに寄生するクワガタナカセ) に寄生するもので *Dimeromyces japonicus* と同定した(図10)。東南アジア産のクワガタナカセを含む複数のダニに近縁及び所属不明の寄生菌が付着しており、分類及び生態学的検討が必要である。このようにクワガタムシ-クワガタナカセの共種分化関係にさらに菌類を含む3者系の共種分化が成立していることも考えられる。この場合、クワガタムシ-クワガタナカセの共種分化関係の崩壊は、菌類との共生関係の崩壊にも結びつく恐れがあり、生態系影響を慎重に検討する必要がある。また、クワガタナカセが属するコナダニ類にはヒトに対してアレルゲンとなるアカリジ

オールという揮発性物質を生産するものも知られており、クワガタナカセについても、繁殖力の強い外国産クワガタナカセが飼育下で大量発生した場合に、健康被害に結びつくリスクも想定される。このようにダニ1種類だけでも未知なるリスクは多種多様に存在する。輸入昆虫における寄生生物の実態把握とリスク評価は今後の侵入種対策における重点課題の一つとして捉えるべきである。



図10.クワガタナカセの体表面に寄生する菌。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

クリプトスポリジウム症、新種のヘルペスウイルス感染症、核内コクシジウム症、カエルツボカビ症、マダニからの新型ボレリア属細菌の検出、など、海外から輸入される爬虫類・両生類から新たな感染症を多数発見し、新型感染症侵入のリスクを実証した。

輸入甲虫類から検出されたダニについて、宿主-ダニの共種分化関係を明らかとし、寄生生物にもESUが存在することを示した。

(2) 地球環境政策への貢献

本研究課題で得られたクリプトスポリジウム感染実態の成果に基づき、ヒョウモントカゲモドキは外来生物法の要注意外来生物リストに記載された。

IUCN外来種ワースト100にも指定されているカエルツボカビ症の国内侵入をいち早く発見し、法律の盲点となる外来寄生生物の防除のために麻布大学・国立環境研究所が中心となって緊急検査体制を構築し、得られた検査結果を環境省に提供した。世界最悪の野生生物感染症と唱われるカエルツボカビ菌の侵入は極めて深刻な事態であるが、この緊急事態に対して迅速な対応をとることが出来たのは、本推進費プロジェクトで培われてきた研究機関および研究者間のネットワークおよびこれまでの研究成果の賜である。

6. 引用文献

- 1) Bone RD. 第10章 消化器系 (1997) Beynon, EH. , Laton, M. EandCooper, J. E. 爬虫類マニ
ュアルー病気の診断と治療 田邊興記・田邊和子訳 学窓社 pp75-84.
- 2) Clark HF. and Karzon DT. (1972) Iguana virus, a herpes-like isolated from cultured cells
of a lizard, *Iguana iguana*. *Infect. Immune.* 5:559-569.
- 3) Cooper JE. 6. Bacteria. (1981) Cooper, J. E. and Jackson, O. F. Disease of reptile. pp165-191.
- 4) Garner MM, Gardiner CH, Wellehan JF, Johnson AJ, McNamara T, Linn M, Terrell SP, Childress
A, Jacobson ER. (2006) Intranuclear coccidiosis in tortoises: nine cases. *Vet. Pathol.*
43:311-320.
- 5) Jacobson ER, Schumacher J, Telford SR, Greiner EC, Buergelt CD, Gardiner CH. (1994)
Intranuclear coccidiosis in radiated tortoises (*Geochelone radiata*). *J. Zoo Wildl. Med.*
25:95-102.
- 6) 川口寧 第3章 4. ヘルペスウイルスと感染症 (2004) 見上彪 獣医微生物学 第2版 文永
堂 pp203-207.
- 7) Kenny MJ, Shaw SE, Hillyard PD, Forbes AB. (2004) Ectoparasite and haemoparasite risks
associated with imported exotic reptiles. *Vet. Rec.* 154:434-435.
- 8) Pietzsch M, Quest R, Hillyard PD, Medlock JM, Leach S. (2006) Importation of Exotic Ticks
into the United Kingdom via the International Trade in Reptiles. *Exp. Appl. Acarol.*
38:59-65.
- 9) Raynaud A, and Adrian M. (1976) Lesions cutanees a structure papillomateuse associees
a des virus chez le lezard vert (*Lacerta viridis*) *C.R. Acad. Sci. Paris.* 283 : 845-847.
- 10) Watson GL. (1993) Herpesvirus in red-headed (common) agamas (*Agama agama*). *J. Vet.*
Diagn. Invest. 5 : 444-445.
- 11) Wellehan JFX, Nichols DK, Ling-ling L, and Kapur V. (2004) Three novel herpesviruses
associated with stomatitis in Sudan plated lizards (*Gerrhosaurus major*) and a Black-lined
plated lizard. *J. Zoo. Wild. Med.* 35:50-54.
- 12) Zeigel RF, and Clark HF, (1972) Electron microscopy observations on a new herpes-type
virus isolated from *Iguana iguana* and propagated in reptilian cells in vitro. *Infect.*
Immune. 4 : 570-582.
- 13) 五箇公一：外来種ハンドブック（日本生態学会編）、215（2002）
「寄生生物」
- 14) IUCN:ISSG Office, 11(2000)
“100 of the World Worst Invasive Alien Species.”
- 15) L. Xiao, U. M. Ryan, T. K. Graczyk, J. Limor, L. Li, M. Kombert, R. Junge, I. M. Sulaiman,
L. Zhou, M. J. Arrowood, B. Koudela, D. Modry, and A. A. Lal: Applied and Environmental
Microbiology, 70, 891-899 (2004)
“Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. in captive reptiles”

7. 国際共同研究等の状況

なし

8. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文(査読あり)>

- 1) K. Goka, H. Kojima and K. Okabe: Global Environmental Research 8:67-74. (2004)
 “Biological invasion caused by commercialization of stag beetles in Japan.”

<その他誌上発表>

- 1) 五箇公一・小島啓史：日本環境動物昆虫学会、15, 137-146(2004)
 「外来昆虫の引き起こす問題-外国産クワガタムシの輸入を巡って」
- 2) 五箇公一・小島啓史：昆虫と自然、39 (11) 、29-34 (2004)
 「外国産クワガタムシの生態リスクと外来生物法」
- 3) 五箇公一：生物科学、56 (2) 、69-73 (2005)
 「外国産クワガタムシの商品化がもたらす生態リスク」
- 4) 林谷秀樹、中臺文、黒木俊郎、森哲、TRAIN Thi Phan LY Thi Lien Khai、石橋徹、宇根有美、
 加藤行男、堀坂知子、岩田剛敏：獣医畜産新報58：329-330(2005)
 「野生ならびに輸入爬虫類におけるサルモネラの保有状況」
- 5) 宇根有美、野村靖夫：小動物臨床23：396-398 (2004)
 誌上剖検・外科病理シリーズ「トカゲのデルマトフィルス症 Dermatophilosis」
- 6) 宇根有美：「トカゲ」爬虫類と両生類の病理と臨床のための研究会発行 8 (2004) 「ヒガシ
 ウォータードラゴン (*Physignathus lesueurii*) の心筋症の2例」
- 7) 宇根有美、鈴木哲也：「トカゲ」爬虫類と両生類の病理と臨床のための研究会発行 9 (2004) 「フ
 トアゴヒゲトカゲ *Pogona vitticeps* の胃原発カルチノイドの2例」
- 8) 宇根有美、今井邦典、オカタニ・アレシヤンドレ・トモミツ、村上賢、石橋徹：「トカゲ」爬
 虫類と両生類の病理と臨床のための研究会発行 11(2004) 「ツリーモニターのヘルペスウイ
 ルス感染症」
- 9) 勝山悠子、宇根有美、金子誠一、野村靖夫：「トカゲ」爬虫類と両生類の病理と臨床のための
 研究会発行 12(2004) 「グリーンイグアナの全身性細菌性肉芽腫性炎の1例」
- 10) 松本悠一、宇根有美、野村靖夫：「トカゲ」爬虫類と両生類の病理と臨床のための研究会発行
 13(2004) 「トカゲ類にみられたDermatophilosis」
- 11) 中臺文、黒木俊郎、塩谷亮、森哲、Tran T. Phan¹⁾、Ly T. L. Khai、石橋徹、宇根有美、
 加藤行男、堀坂知子、岩田剛敏、林谷秀樹：「トカゲ」爬虫類と両生類の病理と臨床のための
 研究会発行 14 (2004) 「トカゲ類における *Salmonella* 保有状況」
- 12) 宇根有美、今井邦典、小菅旬子、村上賢、石橋徹：「トカゲ」爬虫類と両生類の病理と臨床の
 ための研究会発行 15(2004) 「マラカイトハリトカゲの真菌症 *Nannizziopsis vriesii*
 (*anamorph:Chrysosporium* sp.)」
- 13) 宇根有美：「トカゲ」爬虫類と両生類の病理と臨床のための研究会発行 第4章1-8(2004) ト
 カゲ類のウイルス
- 14) 中臺文、加藤行男、黒木俊郎、宇根有美、岩田剛敏、堀坂知子、中野康子、名塚岳宏、小原

嘉明、岩田剛敏、：日本獣医師会雑誌58：768-772（2005）「わが国に輸入されたカメおよびトカゲ類におけるSalmonellaの保有状況」

- 15) 吉政甫、宇根有美、鈴木哲也：「ヘビ」爬虫類と両生類の病理と臨床のための研究会発行 10(2005) 「ボア科ヘビの封入体病」
- 16) 松本悠一、宇根有美、石橋徹、鈴木哲也：「ヘビ」爬虫類と両生類の病理と臨床のための研究会発行 11(2005) 「封入体病を疑う神経症状を呈したヘビにみられた非化膿性脳炎」
- 17) 鈴木聡、宇根有美、石橋徹、岡本健太郎：「ヘビ」爬虫類と両生類の病理と臨床のための研究会発行 12(2005) 「水棲ヘビの白点病」
- 18) 中臺 文、黒木俊郎、塩谷亮、森哲、Tran T. Phan、Ly T. L. Khai、加藤行男、堀坂知子、岩田剛敏、岩田剛敏：「ヘビ」爬虫類と両生類の病理と臨床のための研究会発行 13(2005) 「ヘビ類におけるSalmonella保有状況」
- 19) 宇根有美、石橋徹、野村靖夫：「ヘビ」爬虫類と両生類の病理と臨床のための研究会発行 14(2005) 「ヘビのクリプトスポリジウム症」
- 20) 松本悠一、須永絵美、東野晃典、田坂樹、宇根有美：「ヘビ」爬虫類と両生類の病理と臨床のための研究会発行 16(2005) 「ヘビのアメーバ症の3例」
- 21) 碓井真紀、岸夏樹、宇根有美、金子誠一、生井聡：「ヘビ」爬虫類と両生類の病理と臨床のための研究会発行 18(2005) 「ニシキヘビにみられた変形性骨炎（骨Paget病）の1例」
- 22) 勝山悠子、東野晃典、須永絵美、宇根有美：「ヘビ」爬虫類と両生類の病理と臨床のための研究会発行 19(2005) 「全身性に褐色色素沈着症のみられたコロンビアレインボーボアの1例」
- 23) 藤原あずさ、宇根有美、小家山仁：「ヘビ」爬虫類と両生類の病理と臨床のための研究会発行 20(2005) 「ボア科ヘビにみられた口腔と皮膚の非上皮性腫瘍2例」
- 24) 宇根有美：「ヘビ」爬虫類と両生類の病理と臨床のための研究会発行 第5章1-11(2005) 「ヘビのウイルス」

（2）口頭発表（学会）

- 1) 宇根有美、深野百合子、鈴木哲也、野村靖夫：第5回爬虫類両生類の臨床と病理に関するワークショップ(2006)「リクガメ (*Geochelone sp.*)における核内コクシジウム症」
- 2) 吉政 甫、工藤朝雄、宇根有美、野田義積：第5回爬虫類両生類の臨床と病理に関するワークショップ(2006)「パンケーキリクガメ (*Malacochersus tornieri*) のヘルペスウイルス感染症」
- 3) 鈴木 聡、田中美穂、宇根有美、鈴木哲也、印牧信行：第5回爬虫類両生類の臨床と病理に関するワークショップ(2006)「トッケイヤモリ (*Gekko gekko*) にみられた偽牛眼症の2例」
- 4) 黒木俊郎、泉山信司、八木田健司、遠藤卓郎、宇根有美、林谷秀樹、中臺 文、石橋徹、森哲、黒尾正樹、片山亮、鳥羽道久、森ロー：第5回爬虫類両生類の臨床と病理に関するワークショップ(2006)「ヤマカガシのクリプトスポリジウム感染」
- 5) 宇根有美、鈴木聡、吉政 甫、相原尚之、野村靖夫：第5回爬虫類両生類の臨床と病理に関するワークショップ(2006)「グレーターサイレン (*Siren lacertina*) の甲状腺腫の1例」
- 6) 嘉手苺将、深野百合子、宇根有美、田向健一：第5回爬虫類両生類の臨床と病理に関するワー

クシヨップ(2006)「ベルツノガエル (*Ceratophrys ornata*) の口腔粘液乳頭腫の1例」

- 7) 嘉手苺将、深野百合子、宇根有美、田向健一：第5回爬虫類両生類の臨床と病理に関するワークショップ(2006)「ロココヒキガエル (*Bufo paracnemis*) の右前腕部に発生した黒色真菌性肉芽腫症の1例」
- 8) 宇根有美：第139回日本獣医学会公衆衛生学シンポジウムII「輸入動物を介する感染症の現状と対策」(2005)「エキゾチックアニマルの現状」
- 9) 宇根有美：第139回日本獣医学会野生動物医学会・爬虫類の臨床と病理のための研究会企画ワークショップ(2005)「爬虫類のクリプトスポリジウム症について」
- 10) 宇根有美：第4回東京大学大学院合同特別講義(2004)「エキゾチックアニマルに由来する感染症」
- 11) 松本悠一・今井邦典・大川美奈子・宇根有美・黒木俊郎・石橋徹・鈴木哲也・野村靖夫：第137回日本獣医学会病理分科会(2004)「ヒョウモントカゲモドキ由来のクリプトスポリジウムのヘビへの感染性と病原性」
- 12) 黒木俊郎・泉山信司・八木田健司・宇根有美・鳥羽道久・遠藤卓郎：第137回日本獣医学会寄生虫分科会(2004)「爬虫類における*Cryptosporidium*の保有状況」
- 13) 宇根有美：第3回国立感染症研究所学友会公開シンポジウム(2004)「エキゾチックペット由来感染症」
- 14) 五箇公一・岡部貴美子・小島啓史：日本ダニ学会大会(2004)「クワガタムシとクワガタナカセの分子共種分化」
- 15) 五箇公一：日本生物地理学会第59回年次大会シンポジウム(2004)「外来昆虫の導入に伴う寄生性ダニの侵入：分子共種分化解析」
- 16) 五箇公一：昆虫病理研究会シンポジウム(2004)「昆虫輸入がもたらす随伴侵入生物のリスクーセイヨウオオマルハナバチと外国産クワガタムシを例としてー」
- 17) 五箇公一・岡部貴美子・小島啓史：日本応用動物昆虫学会大会(2005)「ダニに歴史あり(パート1)ー分子で見たクワガタムシと寄生ダニの共種分化ー」
- 18) 岡部貴美子・五箇公一・小島啓史：日本応用動物昆虫学会大会(2005)「ダニに歴史あり(パート2)ー形態で見たクワガタムシ寄生ダニの種分化ー」
- 19) 五箇公一：日本生態学会大会公募式シンポジウム「フィールドの寄生虫生態学2. 寄生虫の外来種問題」(2005)「輸入昆虫における随伴侵入種問題」
- 20) 五箇公一・岡部貴美子・米田昌浩：第53回日本生態学会(2006)「ダニの来た道ー昆虫輸入がもたらす寄生性ダニの侵入」
- 21) 五箇公一・岡部貴美子・米田昌浩・小島啓史：第50回日本応用動物昆虫学会(2006)「導入昆虫とともに日本に侵入する寄生ダニ」
- 22) 岡部貴美子・五箇公一：第50回日本応用動物昆虫学会(2006)「外来クワガタナカセは日本産種を駆逐するか」
- 23) 五箇公一・岡部貴美子・後藤哲雄・川端寛樹・高野愛・角田隆：第51回日本応用動物昆虫学会大会(2007)「侵入昆虫リスク評価シリーズ6-ダニ輸入大国日本」
- 24) 五箇公一・岡部貴美子：日本ダニ学会大会(2006)「クワガタムシ商品化がもたらすダニ類侵

入の危機」

- 25) 五箇公一：第54回日本生態学会大会自由集会（2007） 「ダニ輸入大国日本へ植物寄生・昆虫寄生ダニを例として」

(3) 出願特許

なし

(4) シンポジウム、セミナーの開催（主催のもの）

- 1) 爬虫類と両生類の臨床と病理の研究会主催、ワークショップ 第3回トカゲ(2004年10月)
- 2) 爬虫類と両生類の臨床と病理の研究会主催、ワークショップ第4回ヘビ(2005年10月)
- 3) 爬虫類と両生類の臨床と病理の研究会主催、ワークショップ第5回両生類とカメ(2006年11月)

(5) マスコミ等への公表・報道等

- 1) NHK「サイエンスZERO」（2004年8月7日放映、急増する外来動物の生態系への影響に関する研究成果について44分ほど紹介）
- 2) 毎日新聞「輸入クワガタ危機」 2005年7月7日
- 3) NHK サイエンスZERO NHK科学・環境番組部発行(2005年6月6日)
- 4) NHK「サイエンスZERO」（2004年8月7日放映、急増する外来動物の生態系への影響に関する研究成果について44分ほど紹介）