

D-0801 非意図的な随伴侵入生物の生態リスク評価と対策に関する研究

(4) 輸入動物に随伴する病原体の生態リスク評価

麻布大学

獣医学部 病理学研究室 宇根有美

〈研究協力者〉	国立環境研究所	五箇公一
	麻布大学獣医学部分子生物学研究室	村上賢
	麻布大学獣医学部微生物第二研究室	田原口智士
	麻布大学獣医学部生理学第一研究室	松井久実
	麻布大学環境保健学部病理学研究室	荻原喜久美
	兵庫県立大学自然環境科学研究所	太田英利
	神奈川県衛生研究所	黒木俊郎
	独立行政法人製品評価技術基盤機構	稲葉重樹
	慶応義塾大学経済学部生物学教室	福山欣司

平成 20～22 年度累計予算額 14,500 千円 (うち、平成 22 年度予算額 6,000 千円)

予算額は、間接経費を含む

〔要旨〕 我々は、2006 年 12 月にアジア初のツボカビ症、2008 年 10 月に国内初のラナウイルス感染症を発見した。主としてこれらの感染症の在来種へのリスク評価とその対策の確立を目的とし研究を行なった。カエルツボカビについては、野生下両生類の大量死 40 事例には、カエルツボカビを原因とするものはなかった。臨床例およびオオサンショウウオを用いて効果的で安全なツボカビ症治療法および除菌法を確立した。ウシガエル幼生を対象として、野外でのカエルツボカビ浸淫状況と季節変動を明らかにした。カエルツボカビ培養株を樹立した。ラナウイルスによるウシガエル幼生の大量死が継続、4 都道府県 5 地域で発生していることを確認し、さらに、サンショウウオの大量死も発見し、2 種類のラナウイルスを分離した。これらのウイルスの在来種への影響を在来種 13 種類を用いた感染実験で検証した。その結果、両ウイルスの広宿主性および高致死性(平均死亡率 84.0%)を明らかにした。流行地と非流行地において、ラナウイルス陽性率に季節変動があることを明らかにした。その他、小型サンショウウオの皮膚メタセルカリア症を見出し、分布域の拡大と有病率の上昇を確認した。寄生生物の増幅動物としての外来種の役割を示唆した。

〔キーワード〕 カエルツボカビ、ラナウイルス、皮膚メタセルカリア症、両生類、大量死

1. はじめに

日本には、カエルなどの無尾類 43 種(5 亜種を含む)、イモリ・サンショウウオなどの有尾類 22 種、計

65 種が生息しており、中緯度の国としては稀にみる両生類の多様性がある。さらに、その固有性(在来種)が 84.1%と極めて高い。現在、日本では、これらの両生類の個体数や種数が減少している。このような状況の中、我々は 2006 年 12 月、日本で飼育されている両生類でアジア初となるツボカビ症の発生を確認し、さらに 2008 年 10 月には、ラナウイルス感染症を西日本のウシガエル *Rana catesbeiana* 大量死事例から発見、報告した²⁾。

カエルツボカビ *Batrachochytrium dendrobatidis* は、1998 年に 1 属 1 種、唯一脊椎動物に感染するツボカビとして発見された。アジアを除く世界各地の両生類の減少、絶滅に深く関わっているとされ^{3,4,5,6)}、生態系の崩壊にも繋がりがねない重大な感染症を引き起こすことから、現在、IUCN(国際自然保護連合)による外来生物ワースト 100 にリストアップされている。

ラナウイルスは、イリドウイルス科ラナウイルス属に属するウイルスで、宿主域が広く魚類・両生類・爬虫類に病原性を発揮する病原体として世界中で問題となっている。ラナウイルス感染症は、野生の両生類、特にカエルに大量死を起こす新興感染症とされており、両生類の減少に関わる重要な病原体とされ^{7,8,9)}、2008 年 5 月に世界動物保健機関(OIE)において、監視すべき重要な野生動物の感染症として、カエルツボカビとともにリストアップされた。

海外では、上記感染症以外にも生態系に重大な影響を及ぼす病原体が発見され、流行が起こっている。物流の大規模化や迅速化が進む昨今、国内侵入の可能性も高く、注意深い監視が必須の状況にある。

2. 研究目的

本研究は、在来種への脅威となる感染症/病原体を早期に発見し、その影響を排除あるいは最小限に抑える方法(対策)の確立を最終目標としており、実際には、すでに、国内で発見され、日本の生態系および生物多様性への影響が危惧されるカエルツボカビおよびラナウイルスの在来種へのリスク評価、国内流行実態の把握、効果的かつ効率的な対策を確立することを目的としている。

3. 研究方法

(1) カエルツボカビ

1) 飼育下両生類におけるツボカビ症の発生状況調査

飼育下両生類の病性鑑定のために、国内で販売されている両生類を購入(計 330 匹 34 種: アフリカツメガエルとウシガエルを除く)して検査を行い、カエルツボカビの感染状況を病理学のおよび分子生物学的に調査した。

2) 野生下両生類の不審死、大量死事例の病性鑑定

全国から病性鑑定依頼のあった野生下両生類の不審死、大量死 40 事例を病理学のおよび分子生物学的に調査した。カエルツボカビ感染の有無は Nested-PCR 法を用い、ツボカビ症の診断は病理組織学的に行った。

3) オオサンショウウオにおけるカエルツボカビ保菌率と除菌実験

兵庫県において台風により漂流・死亡したオオサンショウウオ 10 匹を対象として、カエルツボカビ保菌状況を病理学のおよび分子生物学的に検査した。

カエルツボカビ陽性オオサンショウウオ6匹(1群4匹、2群2匹(当初2群))を無処置対照群とする。その後、1群実験後に2群に薬浴回数を減らして処置する。使用薬剤は、0.01%イトラコナゾール溶液(抗真菌剤イトリゾール®内用液1%、ヤンセンファーマ)で、1日1回5分間の浸漬を5日間あるいは10日間実施する。薬浴中5日目と10日目、薬浴終了後1週間目と2週間目にカエルツボカビ検査(PCR検査)を行い、除菌の成果を検定する。有無は体表スワブを用いたPCR法で検査した。

4) 自然発生性ツボカビ症を用いた治療実験

動物病院を受診した臨床例4種(タイガーサラマンダー、ツノガエル、チャコガエル、アフリカウシガエル)12匹を対象として、0.01%イトラコナゾール溶液(抗真菌剤イトリゾール®内用液1%、ヤンセンファーマ)で、1日10分間浸漬を1回として、隔日7回薬浴して、臨床症状の経過観察とPCR検査により治療の成果を判定した。

5) カエルツボカビ培養株の樹立、増殖評価方法および銅イオン影響の検討

a) 培養株の樹立

都内ペットショップで流行したツボカビ症集団発生より得られた個体(15事例目 クランウェルツノガエル *Ceratophrys cranwelli*、幼体)の皮膚組織片から、稲葉重樹博士が可能な限り雑菌、カビなどを除去し、PmTG液体培地(Tryptone 1g/L、Peptonized Milk 1g/L、Glucose 5g/L、agar 10g/L)にて分離培養を試みた。

b) 増殖評価方法の検討

i. 培養方法：(i)均一なカエルツボカビ浮遊培養液にするため、カエルツボカビの遊走子嚢が培養ボトルの壁面に付着しないよう、遠沈管50mlにPmTG液体培地30mlを入れ、目視にてカエルツボカビが増殖極期に達していると思われた培地 $100\mu\text{l}$ を加え、ゆるやかに振盪しながら 22°C で培養した。(ii)細胞接着性の組織培養フラスコにPmTG液体培地10mlを入れ、目視にてカエルツボカビが増殖極期に達していると思われた培地 $100\mu\text{l}$ を加え 22°C で静置培養した。

ii. 増殖評価方法：(i)培養期間中毎日、培養液を $50\mu\text{l}$ 採取し、ルゴール液 $50\mu\text{l}$ と混和、染色し、ビルケルチュルク血球計算盤を用いて、遊走子および遊走子嚢数を3回ずつカウントし、平均遊走子、遊走子嚢数を求めた。(ii)吸光度計を用いて、目視にて増殖極期に達したと思われた培養液をセルにとり、測定し、測定に最適な波長を調べた。

c) 銅イオンの影響

銅標準液(和光純薬：濃度1mg/ml)をコントロール(0ppm)、1ppm、5ppm、10ppm、15ppm、20ppmになるようにPmTG培地で希釈し、細胞接着性の培養フラスコに各濃度の培地40mlとカエルツボカビ培養液を $400\mu\text{l}$ (遊走子濃度 $1.85\times 10^4/\text{ml}$)加え、 22°C で13日間静置培養した。培養期間中毎日、各濃度の培養液を $50\mu\text{l}$ 採取し、ルゴール液 $50\mu\text{l}$ と混和、染色し、ビルケルチュルク計算盤で遊走子数を各濃度3回ずつ測定、平均遊走子濃度を求めた。また13日間培養後、各濃度の培地を3,000rpmで10分遠心し、沈渣を $100\mu\text{l}$ とり、銅イオンの入っていない新しいPmTG液体培地10mlに加えて、 22°C で更に4週間培養、カエルツボカビが増殖するか、1週間ごとにビルケルチュルク血球計算盤で遊走子数をカウントして評価した。なお、

株式会社ベータイデアにて培養前後の各培地の銅イオン濃度を測定し、培地中の銅イオン濃度を確認した。なお、銅イオン濃度測定には、試料が 30ml 以上必要なため、40ml の PmTG 液体培地で培養した。

6) 野外でのカエルツボカビ浸淫状況と季節変動の検討

神奈川県相模原市緑区大島の相模川で、2010 年 4～9 月に 7 回、計 205 匹のウシガエルオタマジャクシの口器からスワブを採取し、カエルツボカビ PCR 検査を行った。

(2) ラナウイルス

1) ラナウイルス大量死事例の検索

環境省、地方自治体、生態観察者および一般人などから、両生類の大量死事例の通報を受け、提供された検体について、疫学的、病理学的および分子生物学的検索を行なった。ラナウイルスが検出された事例については、継続調査、他の動物も含めて保有調査を行なった。

2) 遡及的ラナウイルス感染症の調査

2009 年 9 月にウシガエルにラナウイルス感染症を見出し、その検出方法を確立したことから※、2007 年より不審死、大量死事例として提供された症例の病理組織標本を再度、検証し、生材料が保存されている事例について、PCR 検査を実施した。

※ ラナウイルス PCR 検査方法：検体をバイオマッシャー®で破碎し、15,000×g、10～30 秒間遠心して試料を回収後、Get Pure DNA kit-cell, tissue® (Dojindo)にて DNA を抽出し PCR を行った。プライマーは FV3MCP4F、FV3MCP5R を用いた (Mao J, 1999)。

3) RCV-JP、HNV の在来両生類への感染実験

在来種へのラナウイルスの病原性を検証するために感染実験を行った。

供試動物：有尾目 8 種 (カスミサンショウウオ; HNe、トウホクサンショウウオ; HL、クロサンショウウオ; HNi、トウキョウサンショウウオ; HT、エゾサンショウウオ; HR、オオイタサンショウウオ; HD、シリケンイモリ; CE、アカハライモリ; CP、CE と CP は成体のみ、HNe と HNi は幼生と成体、他は幼生のみ) 331 匹、無尾目 5 種 (ヒメアマガエル; MO、トウキョウダルマガエル; RB、ヌマガエル; RL、ミヤコヒキガエル; BG、アズマヒキガエル; BJ、BJ を除いてすべて成体) 155 匹、総計 13 種 486 匹 (うち陰性対照群 178 匹) を用いた。

ウイルス液：ラナウイルス感染症を発症したウシガエルおよびカスミサンショウウオからそれぞれ分離培養された RCV-JP (力価 $10^{4.25}/0.1\text{ml}$) と、HNV (力価 $10^{3.5}/0.1\text{ml}$) を用いた。

実験方法：暴露方法として浸漬と腹腔接種を用いた。幼生はウイルス液中に 6 時間浸漬し、22℃と 15℃の水温で飼育した。成体は 24 時間浸漬あるいはウイルス液 0.1ml を腹腔接種した。対照群には滅菌生理食塩水を腹腔内接種した。死亡個体は直ちに剖検し、成体は肝臓・腎臓・脾臓を、幼生は各群半数を PCR 検査用に、残りの半数を病理組織検査用として全身諸臓器を採材した。実験期間は 2 カ月間とし、実験終了時に生存していた個体は安楽殺後、死亡個体と同様に採材・検索を行った。

4) 国内ラナウイルス浸淫調査と季節変動

2008年と2009年に西日本で発生したウシガエル大量死周辺地域で、2009年10月～2011年2月に死亡または採取した両生類389匹と魚類253匹、甲殻類1匹を対象にラナウイルスPCR検査を行い、感染状況を調査した。あわせて、神奈川県相模川の3点（相模原市、厚木市、海老名市）、千葉県、東京都、埼玉県、広島県でウシガエル幼生を採取して、PCR法でラナウイルスの保有状況を調査した。

（3） 小型サンショウウオの皮膚メタセルカリア症

2009年4月に福島県阿武隈山系において、トウホクサンショウウオの異常個体が相次いで発見されると地元生態学研究者から報告を受け、聞き取り調査した結果、特に2000年以降、有病率が上昇しており、発症エリアが拡大していることが判明した。症状は全身の皮膚に小結節が多発するもので、進行すると全身が腫大する。死亡個体の病理検査の結果、皮下に吸虫の一種 *Euryhelms costaricensis* が感染していることが確認された。同様の症例は、福井県のヒダサンショウウオでも報告されていた。

吸虫類は扁形動物門 Platyhelminthes、吸虫綱 Trematoda、二世吸虫亜綱 Digenea、後睾吸虫目 Opisthorchiida、後睾吸虫上科 Opisthorchioidea、異形吸虫科 Heterophidae に属する動物で、人獣共通感染症になる種も含まれる。カワニナなどの淡水巻貝類を第一中宿主として、それを捕食する魚類や両生類等が第二中宿主となり、さらにそれら第二中宿主を捕食する哺乳類等を終宿主とする生活史をとる。今回発見され *Euryhelms costaricensis* は、サンショウウオが第二中宿主となっていると考えられ、本吸虫は、1998年に在来哺乳類のホンドテンより検出されている¹⁰⁾。

2009年、2010年の2回のトウホクサンショウウオの産卵期に産卵場所に来るサンショウウオを採取して、性別、大きさ、結節の有無を調査した。あわせて、他の小型サンショウウオを採取して、病理学的、寄生虫学的に検索した。加えて、害獣駆除されたミンク、アライグマを対象に本寄生虫の感染の有無を検討した。

4. 結果・考察

（1）カエルツボカビ

1) 飼育下両生類におけるツボカビ症の発生状況調査

飼育下両生類：34種類330匹を検索した結果、15箇所9種94匹でツボカビ症を確認した（表1）。発症したカエルより、ハプロタイプAまたはCのカエルツボカビを検出し、他のハプロタイプは確認されなかった。（※ペーパーミントツノガエルとクラウンエルツノガエルは交雑種として1種とした。）

全国で、両生類の愛好家から繁殖家まで、広く飼育下でツボカビ症が流行していることが明らかになった。さらに、事例4のように輸入直後のカエルからもカエルツボカビが検出され、ツボカビ症の発症も確認された。なお、死亡した両生類は外来種のみであった。飼育下外来種へのカエルツボカビの病原性の強さが確認された。

2) 野生下両生類の不審死、大量死事例の病性鑑定

全国から40事例の不審死、大量死事例の通報、病性鑑定依頼があったが、ツボカビ症と診断される事例は1つもなかった。死因としては、急激な気温の変化、溺死、捕殺、耕運機などによる外傷などであった（表2は2007年分の35事例を記載）。よって、現時点では、野生在来種へのカエルツボカビの影響はないある

いはかなり低いものと判断された。

表1 カエルツボカビ症事例のプロフィール

	地域(由来)	種類	計	原産地
1	東京(個人)	バジェットガエル	1	南米(繁殖)
		アマゾンツノガエル	1	南米
		ベルツノガエル(発症)	1	南米(繁殖)
		ナンベイウシガエル	1	南米
2	埼玉(繁殖家)	ベルツノガエル	7	南米
3	埼玉(量販店)	バジェットガエル	5	南米
		アジアウキガエル	2	アジア
4	埼玉(専門店)	アルビノベルツノガエル	2	南米(USA輸入)
5	北海道(小売店)	イエアメガエル	1	オセアニア
6	東京(個人)	ビバルバ	1	南米
7	静岡(卸業者)	ペパーミントツノガエル	5	南米(国内繁殖)
8	東京(繁殖家)	ベルツノガエル	20	南米(国内繁殖)
9	茨城(繁殖家)	ベルツノガエル	2	南米(国内繁殖)
10	東京(個人)	イエアメガエル	1	オセアニア
11	東京(個人)	セアカアデガエル	1	マダガスカル
12	兵庫(卸業者)	ベルツノガエル	2	南米(USA輸入)
13	沖縄	ベルツノガエル	1	南米
14	神奈川	アジアウキガエル	2	アジア
15	東京(専門店)	クランウエルツノガエル	38	南米(国内繁殖)
	合計	9種類	94	

表2 野生両生類の不審死・大量死事例の病性鑑定

月日	場所	種類	匹数	検査数	場所	通報者(発見者)・仲介者
1 07.02.07	東京都	ヤマアカガエル	3匹	1	狹山・多摩丘陵	自然観察者
2 07.02.21	長崎県	ツシマアカガエル	20匹	3	河川	野生生物センター
		ツシマサンショウウオ	1匹	1		
3 07.03.05	千葉県	ニホンアカガエル	多数	2	千葉県市原市	カエル探偵団会員
4 07.03.26	神奈川県	ニホンヒキガエル	2匹	2	湿地帯の水路と多道	自然環境保全センター
5 07.03.27	横浜市	ニホンヒキガエル	多数	1	学校の池	一般臨床獣医師
6 07.04.04	宮城県	ニホンアカガエル	>100匹	0		自然保護センター
7 07.04.20	沖縄県	オキナワアオガエル		1	林道	自然観察者
8 07.04.25	茨城県	ニホンアカガエル	50-100匹	6	用水路	地方総合事務所環境保全課
		シュレーゲルアオガエル		1		
9 07.04.27	沖縄県	オキナワアオガエル		3	水族館飼育	コア獣医師
10 07.04.28	千葉県	ドウキョウダルマガエル	1匹	1	水田	JJA生きもの係
11 07.05.15	横浜市	ニホンヒキガエル	1匹	1	一般家庭飼育	コア獣医師
12 07.06.06	東京都	アズマヒキガエル	1匹	1	自宅の庭の池	コア獣医師
13 07.06.13	静岡県	トノサマガエル	2匹	1	自宅の庭	一般人
14 07.06.15	奈良県	トノサマガエル	3匹	1	一般家庭飼育	一般人
15 07.06.16	埼玉県	ウシガエル		1	保護	コア獣医師
16 07.06.23	東京都	アカハライモリ	100匹	1	一般家庭飼育	コア獣医師
17 07.06.24	東京都	ヒキガエル	1匹	1	自宅の庭	コア獣医師
18 07.06.26	北海道	ヤマアカガエル	多数	5	一般家庭飼育	カエル探偵団会員
19 07.06.26	福岡県	ニホンアカガエル		1	自宅の庭	生活環境課
20 07.07.01	千葉県	カガガエル	1匹	4	溪谷	一般臨床獣医師
21 07.07.03	東京都	アズマヒキガエル	10数匹以上	4	学校の池	一般人
22 07.07.04	福島県	ヤマアカガエル	幼体20匹以上	5	山間部の水田	一般人
23 07.07.13	北海道	ドウキョウダルマガエル	1匹	1	植物園飼育	コア獣医師
24 07.07.18	滋賀県	モリアオガエル	1匹	1	民家	博物館学芸員
25 07.07.19	静岡県	アマミアオガエル	幼体20匹	3	水族館飼育	水族館職員
26 07.07.20	山形県	アカハライモリ	3匹	3	一般家庭飼育	一般臨床獣医師
27 07.07.23	東京都	ドウキョウダルマガエル	26匹	5	水族館飼育	博物館職員
28 07.07.24	千葉県	アズマヒキガエル		1	博物館飼育	博物館学芸員
29 07.08.01	神奈川県	アズマヒキガエル	1匹	1	路上	カエル探偵団仲介
30 07.08.22	大分県	トノサマガエル	1匹	1	水田の水路	県企画振興部環境自然室
31 07.08.29	東京都	アズマヒキガエル	1匹	1	一般家庭の庭の池	自然公園職員
32 07.09.14	沖縄県	ナミガエル	1匹	1	林道	野生生物保護センター
33 07.09.14	沖縄県	サキシマスズマガエル	成体12匹 幼体約100匹	3	工器内用水路	野生生物保護センター
34 07.09.14	沖縄県	リュウキュウカガガエル	多数	2	路上	コア獣医師
35 07.09.29	香川県	ニホンアカガエル	2匹	1	溪谷	自然観察者

3) オオサンショウウオにおけるカエルツボカビ保有率と除菌実験

オオサンショウウオ 10 匹中 6 匹がカエルツボカビ陽性と判定された。除菌実験では、1 群全頭が 5 回目の除菌後に PCR 検査陰性となり、その後の検査でもカエルツボカビは検出されなかった。この結果を受け、当初、無処置対照としていた 2 群に、回数を減らして 5 回薬浴した。2 群も 5 回ですべて PCR 検査陰性となった(表 3)。

今回の研究により、0.01%イトラコナゾール溶液を 1 日 5 分、5 回の薬浴と、大変簡便な方法で、安全に除菌できることを検証した。今回の薬浴方法は従来行われていた薬浴時間、薬浴日数を大幅に短縮したため、動物のストレスを軽減する他、使用薬剤が少量で済み、1 匹あたりの除菌単価が安価になり、効果的で大変推奨できる方法である。有尾類を用いた除菌研究の報告はなく、本実験が初の試みとなった。特に、本方法は、稀少な有尾類が多く生息する日本における生息域外繁殖事業に貢献するものとする。

表 3 オオサンショウウオ PCR 検査結果

	登録番号	チップID	除菌前	薬浴5日目	薬浴10日目	薬浴後7日目	薬浴後14日目
1群	0411	0006711739 (000669819D)	+	-	-	-	-
	0175	00066C6BC3	+	-	-	-	-
	0211	00066ADB74	+	-	-	-	-
	0190	0006695096	+	-	-	-	-
2群	0479	00066DEC66	+	-	/	/	/
	0344	0006701525	+	-	/	/	/

4) 自然発生性ツボカビ症を用いた治療実験

治療実験に用いた動物のうち、1 匹を除くすべてで、臨床症状が改善し、薬浴 7 回目に PCR 検査で陰性となり、治療後 20-57 日(平均 34.4 日)追跡して、PCR 検査を行なったが陰性のままであった。その後現時点まで発症はない。また、色素消失などの副作用は確認できなかった。なお、死亡した 1 匹は受診時、すでに重篤な症状を示し、供試動物中、最も幼若であった。この実験により、除菌実験での結果が再現され、効果的で、安全な治療法を確立することができた。これにより、希少種の生息域外繁殖事業におけるカエルツボカビのリスクの軽減が可能となった。

5) カエルツボカビ菌培養株の樹立、増殖評価方法および銅イオンの影響の検討

a) 培養株の樹立

日本で発見されたカエルツボカビ症発症例から培養株の樹立に成功した(図 1)。これにより、カエルツボカビの病原性の検討、在来種への影響、消毒法、診断法などの検討が可能となった。

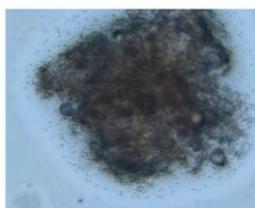


図 1 樹立した培養株

中心部の黒色部は遊走子囊の集合。周囲に遊走子が観察される。

b) 増殖評価方法の検討

- i. 培養方法：振盪培養では、カエルツボカビが管壁に付着することはなかったものの、遊走子、遊走子嚢ともに、互いに接着して塊状となり、カエルツボカビが均一に分布する培養液にはならなかった(図 2)。また、遊走子嚢から遊走子が放出されずに、遊走子嚢内でさらに小さな遊走子嚢を形成したり、遊走子の頭部が通常よりかなり大きい、仮根が一本しかない遊走子嚢など、遊走子と遊走子嚢との鑑別が極めて困難になるといった通常の培養とは異なるカエルツボカビの形態がみられた。一方の静置培養では、遊走子嚢が底面に付着するため、遊走子嚢の増殖評価は出来ないが、順調に発育し、放出された遊走子によって、経時的に培地の濁度が増していった。
- ii. 増殖評価方法：(i)振盪培養では上述のように遊走子と遊走子嚢が絡まりあってしまったため、血球計算盤で正確な数を数えることは不可能であった。静置培養では、遊走子数を数えることができ、6日目から遊走子濃度の急激な上昇がみられ、8日目のピークを境に濃度は徐々に下がり始め、培養 14 日目にはほとんどみられなくなった。遊走子嚢濃度は8日目から上昇し始めたが、その速度は緩やかで、培養 14 日目でも上昇傾向であった(図 3)。(ii)吸光度計による測定では、振盪培養、静置培養いずれの培養方法とも、増殖極期にあると思われる培地を測定したが、ピーク、バレーともに検出することは出来ず、測定できなかった。

当初は、遊走子、遊走子嚢濃度をともに増殖評価対象としていたため、カエルツボカビが均一に浮遊している培養液を作成する必要があった。このため、培養ボトル壁面に遊走子嚢が付着すると、遊走子嚢の正確な増殖評価ができないので、緩やかに振盪しながら培養した。しかし、緩やかであっても、振盪によって遊走子、遊走子嚢が互いに絡み合っ塊状となったり、通常と異なる発育をして遊走子と遊走子嚢を明確に区別することが困難となったため、血球計算盤で遊走子、遊走子嚢の正確な数を数えることは出来なかった。一方、細胞接着性の培養フラスコを用いた静置培養では、遊走子嚢が底面に付着できるため、良好に発育し、血球計算盤を用いた方法で遊走子の経時的増殖を知ることが出来た。このことから、カエルツボカビの増殖を評価するには静置培養を行い、血球計算盤で遊走子濃度を求めることが最適であると考えた。また、付着しているはずの遊走子嚢の数が培養日数がたつにつれ増加したのは、増殖が進み、底面に付着できなかった遊走子嚢が培地中に浮遊してきたためと思われた。

吸光度測定は、振盪培養では、塊状になると重量が増すためか沈みやすくなり、セルに検体をいれるとすぐ底に沈んでしまい、測定が出来なかった。静置培養では、増殖極期と思われるかなり濁りのある時期の培地を検体として測定を試みたが、ピークもバレーも検出されず、吸光度を測定することは出来なかった。海外では、吸光度計を用いてカエルツボカビの増殖を評価した論文があるが、この論文では、細胞培養プレートでカエルツボカビを培養し、遊走子嚢が付着するプレート底面の不透過度が増すことによる吸光度の変化を測定することで増殖を評価していた。カエルツボカビ遊走子の頭部径は6~15 μm とかなり大きく、なぜ吸光度が測定できなかったかは不明であり、我々が検討していた遊走子を対象とした吸光度の測定は難しいと思われた。

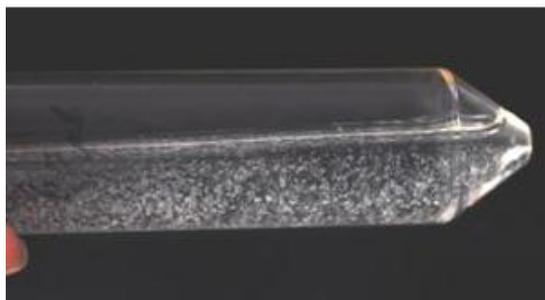


図2 振盪培養したカエルツボカビ培養液。
遊走子、遊走子嚢ともに、互いに接着して塊状となっている。

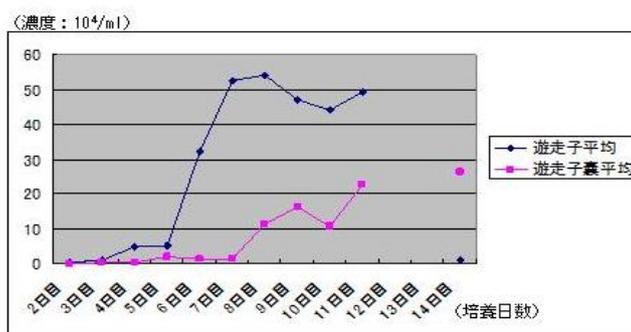


図3. 遊走子および遊走子嚢濃度の推移

c) 銅イオンの影響

培養3日目にコントロールで遊走子が確認され始め、培養4日目で1 ppmでも遊走子が見られた。その後、培養7日目まではコントロール、1 ppmのみ遊走子がわずかに観察された。しかし、培養8日目からコントロール、1 ppmで顕著な遊走子の増加が認められ、5 ppmにも遊走子嚢が観察された。培養10日目で10 ppmに遊走子嚢がわずかに観察された。その後、培養12日目までコントロール、1 ppmでは遊走子が増殖していたが、5 ppm以上では遊走子が確認できなかった(表4、図4)。

銅イオン添加 PmTG 液体培地で13日間培養後、各濃度の培地を3,000rpm 10分遠心、沈渣を100 μ lとり、銅イオンを添加していない新しい PmTG 液体培地 10ml に各々加え、22°Cで更に培養したところ、1週間後にコントロールと1 ppmから継代した培地で明らかな遊走子の増殖が確認された。5 ppm以上の濃度の培地からの継代では遊走子は確認できなかった。その後1週間ごとに5 ppm以上の培地中の遊走子数をカウントしたが、4週間経過しても5 ppm以上の培地では遊走子は確認できなかった。

養魚場では、水カビの発生を抑えるには、銅イオンは5~10ppb程度で有効なことがわかっており、これ以上高い濃度では、尾が曲がるなどの奇形を起こす可能性があるといわれている。今回の実験では、1 ppmでカエルツボカビの顕著な増殖がみられた。また、5 ppm、10 ppmでも遊走子嚢が観察されたが、その後、銅イオンの添加されていない培地で継代培養しても遊走子がみられなかったことから、カエルツボカビは5 ppm以上の銅イオン濃度で増殖を抑えることが出来るといえる(追加実験として、2 ppm、3 ppm、4 ppmで同様の実験を行ったが、全ての濃度でカエルツボカビの明らかな増殖がみられた)。上水道における銅イ

オン基準濃度の上限が 1 ppm、排水基準の銅イオン濃度が 3 ppm であることを考えると、5 ppm という濃度はかなり高濃度である。このため、残念ながら、銅イオン水はカエルツボカビ除菌液としては不適當であるといわざるをえない。しかし、1 ppm の銅イオン濃度でほとんどの細菌、カビの繁殖を抑えることができるため、カエルツボカビの選択培地として利用できる可能性がある。

表 4 遊走子濃度(銅イオン感受性試験)

培養日数	(濃度: 10 ⁴ /ml)					
	コントロール	1ppm	5ppm	10ppm	15ppm	20ppm
2日目	0	0	0	0	0	0
3日目	0.074074	0	0	0	0	0
4日目	0.074074	0.148148	0	0	0	0
5日目	0.148148	0.074074	0	0	0	0
6日目	0.592593	0.37037	0	0	0	0
7日目	3.185185	0.740741	0	0	0	0
8日目	9.259259	4.666667	0	0	0	0
9日目	24.44444	8.222222	0	0	0	0
10日目	28.51852	14.22222	0	0	0	0
11日目	29.77778	18.14815	0	0	0	0
12日目	30.22222	17.40741	0	0	0	0
13日目	27.92593	12.96296	0	0	0	0

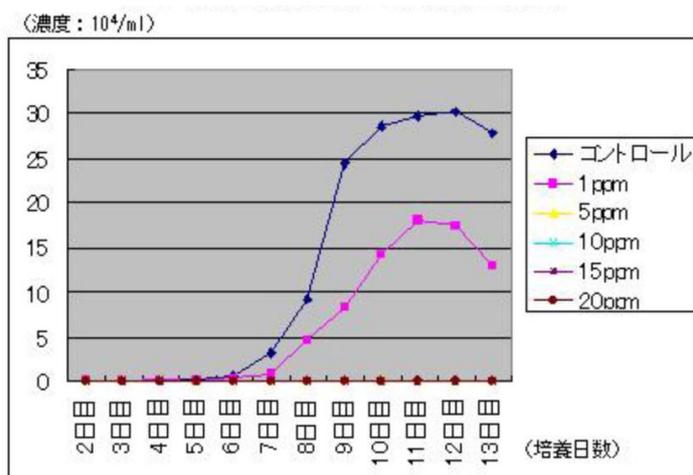


図 4. 銅イオン濃度別の遊走子濃度の推移

6) 野外でのカエルツボカビ浸淫状況と季節変動の検討

各月のカエルツボカビ陽性個体数は、4月 51.4% (18/35 匹)、5月 41.9% (13/31 匹)、6月 20.8% (10/48 匹)、7月 18.2% (4/22 匹)、8月 0% (0/30 匹)、9月 0% (0/39 匹)であり、4~5月の陽性率が高く、その後徐々に低下し、8月以降は全て陰性になった。

ウシガエルの幼生は、日本各地に生息していて、成体より採取が容易であること、富永らの結果(五箇らの成果参照)と我々の結果を考慮すると 3、4月に採取することによって、国内カエルツボカビ浸淫状況の把握ができるものと考えられる。併せて、ウシガエルは多くのハプロタイプを保有していることが五箇らによって確認されていることから、ハプロタイプ分布の地域差なども検討することができるものと思われ、ウシガエルの幼生はカエルツボカビのモニター動物として有用であることを明らかにした。

(2) ラナウイルス

1) ラナウイルス大量死事例の検索

2008年9月、関西地方のある地域で、ウシガエルの変態途中あるいは変態直後の幼体（カエルジャクシ）の大量死が発見された。大量死は9月中旬から10月まで続き、ピーク時には毎日数千匹の死体が回収、廃棄された。なお、カエル成体や同じ池に生息する魚には異常が認められなかった。臨床症状および肉眼所見は、一般的な両生類のラナウイルス感染症と同様で、病理学的には、腎臓糸球体を主とする壊死、肝細胞のび慢性壊死が認められ、電子顕微鏡学的検索で、約130nmの六角形（立体的には正二十面体）のウイルス粒子様構造物が糸球体内皮細胞と思われる細胞に観察された。分子生物学的には、MCPをコードする遺伝子の塩基配列が、2008年9月に台湾の研究者によりデータベースに登録されたものと非常に類似していることから、我々は本ウイルスを日本初のラナウイルス確認事例とし、発見されたウイルスをRCV-JPと命名した。その翌年の2009年9月、再度、西日本各地からウシガエル大量死の通報があり、病性鑑定を依頼されたため、体表スワブを用いたカエルツボカビPCR検査、腎臓組織を用いたラナウイルスPCR検査、病理検査を行った。通報月日、発生時期と発生場所は表5のとおりである。

No. 09-1は池で、大量の変態途中、あるいは変態直後のウシガエルの死体が観察された。当初、農薬散布、酸欠、有毒プランクトン発生などが疑われ、地元の関係者により精査されたがすべて否定された。

No. 09-2は川で、大量の幼生あるいは幼体のウシガエルの死体が腐敗して悪臭がするとのことで、地方自治体に市民より苦情が寄せられた。

No. 09-3は川で、地元住民より麻布大学に直接異変の連絡があった。9月になって、雨が降るたび、川にカエルの死体が流れてくるという情報で、同様の現象が3回あったことを確認した。この事例は、写真のみの情報で検査はできなかったが、写真に写っていたカエルはウシガエルの幼生であった。

No. 09-4は池で、関係者がNo. 09-2に関係する水系を調査している時、訪ねた私有地内の池の中と護岸に多くのカエルの死体を発見した。これらもウシガエルの幼生および幼体であった。

なお、2009年の4箇所と2008年の1箇所は、半径35km以内に入っていた(図5)。腐敗の激しいものを除いて、ほぼ同様の肉眼所見と組織所見が得られた。

皮膚潰瘍は陳旧なものが多く、潰瘍を有する割合も低かった。尾の変形が目立ったが、指端の欠損は少なかった。眼病変(前眼部炎症)が特徴的であった。組織学的には、肝臓細胞変性と壊死、腎尿細管の硝子滴変性と様々な程度の糸球体壊死を示した。また、しばしば各臓器に細菌塊が観察された。PCR検査にて、ラナウイルスに特有の584bpの産物が増幅され、この産物のシーケンス解析の結果、RCV-JPの塩基配列と一致した。なお、体表スワブを用いたカエルツボカビPCR検査では、カエルツボカビDNAは検出できなかった。

表5 2009年ウシガエル大量死事例のプロフィール

事例 No.	通報	発生	場所	検出ウイルス
No. 09-1	10月1日	9月26日～	池	RCV-JP
No. 09-2	10月5日	10月1日～	川	RCV-JP
No. 09-3	9月	9月13日～	川	NA
No. 09-4	10月15日	以前より(毎年)	池	RCV-JP

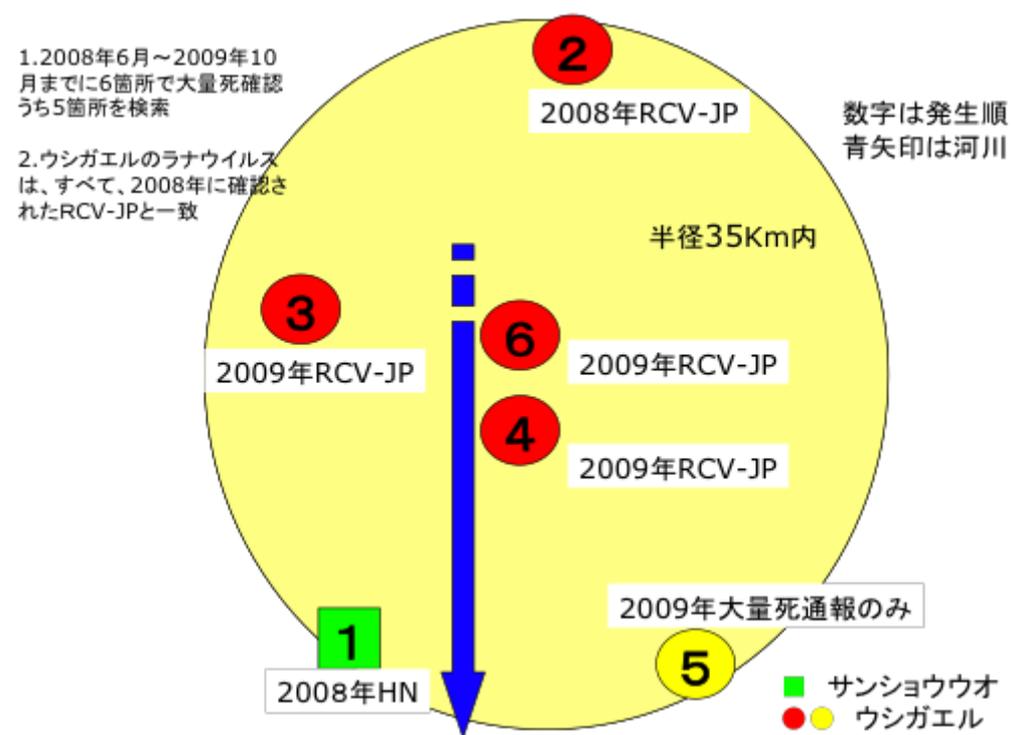


図5. 国内におけるラナウイルス感染症発生状況

2008年1箇所では確認されなかったウシガエルのラナウイルス感染症が、少なくとも2009年に3箇所を確認され、これらが半径35km以内で発生しており、一部は同じ水系であることから、拡散している可能性が示唆された。

2) 遡及的ラナウイルス感染症の調査

野外におけるツボカビ症の流行をモニタリングするために、提供された不審死、大量死事例を遡及的にラナウイルスを対象として検索した。その結果、西日本から提供されたカスミサンショウウオ大量死事例からラナウイルスを検出した。この事例は、公共事業による生息環境の変化を考慮して、カスミサンショウウオを保護・飼育している施設での発生である。1年以上前から飼育しているカスミサンショウウオの水槽2つに、2008年5月中旬から6月1日頃野外で採取した上陸前のカスミサンショウウオ幼生十数匹を加えたところ、成体、亜成体、幼体に関わらず次々に死亡し、最初の1匹が死亡してから2週間で80匹すべ

てが死亡した。死亡個体には、皮膚潰瘍、腹部の内出血がみられるものもあった。この間、飼育水の交換、薬浴、抗生物質塗布などを行ったが効果はなく、以前より、同所で、飼育していた魚類ドンコ、カワムツも死亡した。病理学的には、皮膚潰瘍や皮膚の限局性黒変、肝臓細胞変性と壊死、腎尿管の硝子滴変性と様々な程度の糸球体壊死が観察された。また、しばしば各臓器に細菌塊が観察された。電子顕微鏡学的検索で、腎臓の間質細胞の細胞質内にラナウイルス様の粒子を確認した。これらの粒子の直径は約 120nm で、六角形を呈した。主要カプシド・タンパク質 (MCP) をコード化している遺伝子を増幅する一対のプライマー (M153 と M154) を用いた PCR 検査にて、ラナウイルスに特有の 584bp 遺伝子が増幅された。さらに、PCR 産物の遺伝子配列を解析したところ、Frog ウイルス 3、RCV-JP の塩基配列とは異なっており、HNV と命名された。この事例は、本邦初のサンショウウオのラナウイルス感染症となる。ラナウイルスは幼生、幼体に対して病原性が高いとされるが、今回、すべての年齢層が感染し、全滅したことから、サンショウウオに対して非常に病原性の高いウイルスであると推察された。なお、この流行の機序やウイルスの起源については、さらなるウイルス学的、分子生物学的研究が必要である。

3) RCV-JP、HNV の在来両生類への感染実験

a) ラナウイルス感染症の臨床症状および病理学的所見

感染、発症した動物の症状と病理学的所見は、無尾目と有尾目で違いがあったが、同一目の動物では、種類と生存期間に関わらず同様の所見を示したので、一括して記述する。

有尾目：幼生では、食欲減退、沈鬱、遊泳異常、逃避行動の消失などがあり、皮膚潰瘍や出血斑などが観察された。成体では、腹囲膨満が目立った。腎臓では近位尿管上皮細胞の硝子滴変性、壊死と近位尿管上皮細胞の好塩基性細胞質内封入体形成、糸球体壊死がみられた。肝臓ではメラノファージの高度集簇および肝細胞の萎縮・変性・壊死が認められた。脾臓ではリンパ球系細胞が減少し、脾臓被膜下の結合組織の高度な増生があった。また、敗血症化している個体もみられた。

無尾目：突然死するものが多く、皮膚潰瘍や出血などの症状は認められず、軽度の体腔水腫があり、RB には皮膚の発赤と皮下水腫がみられた。肝臓ではび漫性の肝細胞変性と少数の巣状壊死、稀に肝細胞細胞質内封入体を観察した。腎臓では尿管、糸球体の壊死と変性がみられた。脾臓と皮膚に壊死などの変化は認められなかった。

b) 有尾目(成体)へのラナウイルス RCV-JP の病原性の検討

各死亡個体数は、HNe 5/5、HNi 2/2、CE 6/6、CP 1/1 で、実験に供したすべての動物で死亡率が 100% に達した。暴露後 9 日から死亡し始め、55 日までにしてすべて死亡した。生存期間はそれぞれ NHe 23~36 日、HNi 9 日、CE 9~55 日、CP 44 日で、動物種によって差があった。

c) 無尾目(成体)へのラナウイルス RCV-JP の病原性の検討

各死亡個体数は RB3/3、RL 3/4、MO 2/3、BG 1/3 で、死亡率は 33.3~100%、暴露後 3 日目から死亡し始め、43 日以降は死亡する個体はいなかった。100%の死亡率を示した RB の生存期間は 3~15 日であった。

d) 有尾目(成体)へのラナウイルス HNV の病原性の検討

それぞれの種類の死亡個体数は HNe 4/5、HNi 0/3、CE 8/10 で、死亡率 0～80%、種類により差があり、暴露後 15～45 日で死亡した。平均生存期間は HNe 32.3 日、CE 22.8 日で若干の差があった。また、生き残った個体は、目立った臨床症状を示さず、食欲も変わらなかったが、病理組織学的には、封入体を含めて病変が確認され、かつ PCR 検査で陽性となった。

e) ラナウイルス RCV-JP と HNV の成体における病原性の比較

有尾類における RCV-JP 接種群の平均死亡率は 100%で、HNV 接種群の平均死亡率 53.3%とは大差があり、RCV-JP は、種類に関係なく病原性が強いと評価された。一方、HNV への感受性は、種類によって大きな差があった。また、2 種のウイルスに関連する病変に質的差はないものの軽重があり、CE を除いて、RCV-JP は、一般に皮膚潰瘍を形成しやすかった。

f) ラナウイルス RCV-JP、HNV の病原性に関わる水温と年齢の検討

有尾目の幼生を用いて、水温が死亡率および病変に与える影響を検討した結果、RCV-JP 接種群では、NHe とトウホクサンショウウオは水温に関わりなくすべて死亡したが、HT では 22℃条件で 100%、15℃条件で 80%であった。HNV 接種群では、水温に関係なく NHe と HD はすべて死亡し、HL と HR では温度差があり、特に後者では、22℃条件下 100%、15℃条件 10%の死亡率であった。生存期間も、両ウイルスを合わせた死亡のピークは 22℃条件 6～8 日、15℃条件で 11～13 日であった。この傾向は、無尾目 BJ でも同様に、22℃条件 14～17 日、15℃条件で 41～43 日であった。22℃条件では死亡率が上昇し、経過も短かった。このことから、水温に関わりなく 2 種類のウイルスともに強い病原性を示し、その病原性は、水温の上昇により増強された。なお、水温による病変の違いとして、22℃下で、皮膚潰瘍の頻度が顕著に高かった。

年齢による各ウイルスへの感受性の違いを HNe と HNi で検証した結果、HNV 接種群の HNi では、成体 0%、幼体 40%の致死率であったものの、他は年齢に関係なくすべて死亡し、本ウイルスの在来両生類への病原性の強さが示された。

今回、対象とした 2 種のラナウイルスは、ともに国内の罹患動物から分離された新規のウイルスで、今まで在来種への病原性が評価されたことはなかった。そこで、感染実験によってその病原性を評価した。その結果、RCV-JP および HNV の広宿主性および高致死性(平均死亡率 84.0%)が明らかになった。特に、国内に生息する両生類 58 種のうち今回実験に用いた 13 種(22.4%)に致死性の病原性を示したことは重要である。

病態にかかわる動物種、発生ステージおよび水温などの因子を検討したところ、幼生での死亡率が高く、国内外の大量死の状況と一致した。水温の上昇は、感染後短時間での発症、経過時間の短縮、死亡率を上げる重要な因子であることがわかった。特に、HNV 感染群の HR においては、15℃と 22℃条件での死亡率がそれぞれ 10%と 100%で、90%も死亡率が増加した。なお、2 種類のウイルスを比較すると HNV より RCV-JP の方が病原性が高く、HNV の病原性では動物種差が明瞭で、HNi がキャリアーとなる可能性があることが示唆された。

臨床徴候と肉眼的所見は、発生ステージや動物種により差があることから、肉眼的に診断するのは難しいが、有尾目成体の腹囲膨満(体腔内および皮下水腫)、頭部挙上困難、幼生では沈鬱状態、逃避行動の消

失、皮下出血と皮膚潰瘍などは有用な所見と考えられ、病理組織学的には、肝臓、腎臓、脾臓における壊死性変化(成体では腎臓、幼生では肝臓)と、必発ではないが、これら臓器における好塩基性細胞質内封入体の存在が特徴的で、加えてPCR検査を行なうことで、診断はさらに確実になると思われる。最後に、国内において、すでに野生のウシガエルでラナウイルス感染症が流行しており、在来両生類に対して高致死性の危険な病原体であることから、今後、野外におけるラナウイルス保有調査などの疫学的な研究を進め、国内におけるラナウイルスの情報を蓄積、現状把握し感染拡大防止などのラナウイルス対策に寄与し、パンデミックを防止するよう早急に対策を立てる必要がある。

4) 国内ラナウイルス浸淫調査と季節変動

流行地におけるラナウイルス保有率は、両生類 26.7% (104/389 匹)で、魚類(253 匹)、甲殻類(1 匹)は陰性であった。また、過去、ラナウイルス感染症が流行した 3 箇所を観察を行なったところ、うち 1 箇所では 2010 年 9~10 月に再度ウシガエルの大量死が発生し、この時期の陽性率は、両生類 56.0% (102/182 匹)で、死亡した幼生のほとんどがラナウイルス陽性となった。これらはすべて RCV-JP と同定された。また、流行地に隣接した田んぼで採取したヌマガエル 10 匹幼体のうち 4 匹から Tiger frog virus:TFV が検出された。

ウシガエル幼生を対象としたラナウイルス検査結果は、神奈川県相模川の 3 点のうち、相模原市 405 匹中 4 匹、1% (6 月 1/36、9 月 2/39、12 月 1/36)、厚木市 105 匹中 10 匹陽性 (4 月 18 日 4/13、4 月 25 日 3/27、5 月 5 日 3/33、5 月 16 日 0/17、7 月 12 日 0/14、10 月 22 日 0/1)、海老名市 0/33、千葉県ウシガエル 66 匹中 14 匹陽性 (10 月 20 日 0/1、10 月 25 日 12/14、7 月 31 日 0/21、10 月 2 日 2/30)、東京都 0/73、埼玉県 0/8、広島県 0/9、群馬県 0/3 であった。その他の両生類としては、千葉県モリアオガエル幼生 5 匹中 2 匹陽性となった。

(3) 小型サンショウウオの皮膚メタセルカリア症

福島県の真野川の北岸、真野川と新田川の間、新田川の南岸の 3 箇所について、過去のデータと今回のデータをまとめたところ、表 6 のような結果が得られた。すなわち、寄生虫症に罹患している個体が観察されるエリアが増加し、有病率が上がった。さらに、茨城県のトウキョウサンショウウオ(雄、成体、軽度)1 匹、高知県のハコネサンショウウオ(幼生、中程度)1 匹、アベサンショウウオ(雌、成体、軽度)1 匹に本寄生虫の感染を確認した。また、島根県で採取されたアライグマに本寄生虫の成体の寄生を確認した。

吸虫種自体が外来種か在来種か不明であるが、自然界で爆発的に増加するには、終宿主となる動物の異常繁殖が関与していると考えられる。今回、サンショウウオ類に吸虫感染症が異常発生している地域では、ここ 10 年間で、ミンクやアライグマ等の外来哺乳類の個体数が急激に増加していることが報告されており、これらの外来哺乳類が終宿主として吸虫の異常繁殖をもたらしている可能性が考えられる(図 6)。今後、これら外来哺乳類の感染状況を調査する必要がある。

また、海外においても、近年両生類における吸虫感染症の異常発生が報告されており、除草剤アトラジンの多用が両生類の免疫機能をかく乱し、吸虫感染率を引き上げているという調査結果も出ている。サブテーマ 1「非意図的な随伴侵入生物の侵入ルートの解明および防除対策」のカエルツボカビ調査においても議論しているが、外来種の侵入や生息環境の人為的改変によって、野生生物と寄生生物の共生関係がかく

乱され、感染症 pandemic を招いていることが本研究の結果からも示唆される。

表 6 阿武隈山系におけるトウホクサンショウウオの皮膚メタセルカリア症確認状況

調査地	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
真野川北岸 (伊達の北東部)			○	○	○	○				●
真野川南岸から 新田川北岸 有病率(個体数)	○	● 66.7 (2/3)	● 80.0 (12/15)	● 100.0 (8/8)				● 100.0 (13/13)	● 92.8 (13/14)	●
新田川南岸 有病率(個体数)	○	○	○				○	●	● 60.0 (9/15)	●

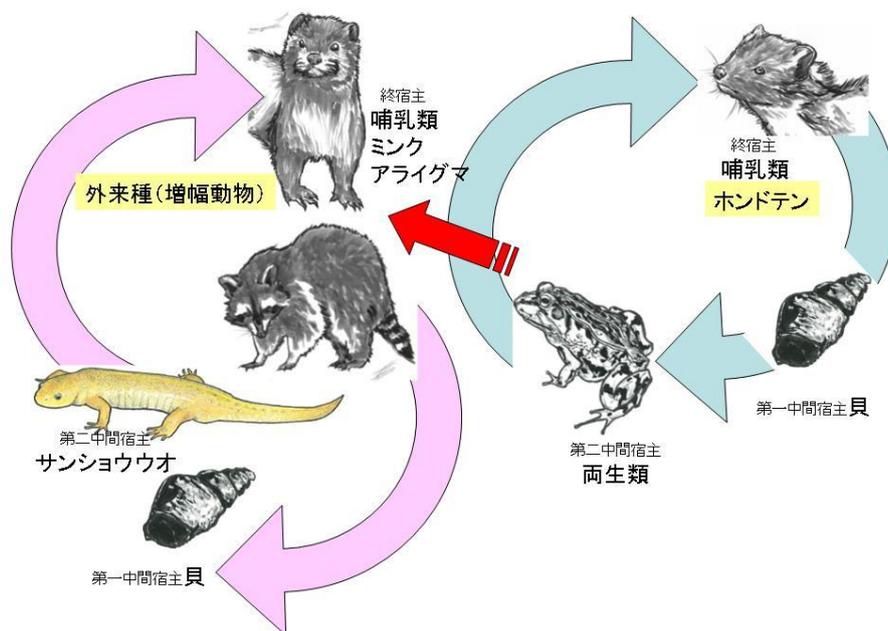


図 6 吸虫の生活史と宿主

外来種ミンクが終宿主として増加することで、吸虫が自然環境で異常発生し、同所的に両生類の感染率が急上昇しているという仮説が立てられる。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

世界的規模での両生類の減少に関わっているとされ、国際獣疫事務局のリストにも監視すべき重要な疾患としてリストアップされているカエルツボカビとラナウイルスを日本で初めて発見するとともに、その病原性について明らかにした。新たなる両生類の感染症「皮膚メタセルカリア症」を見出し、本疾患が外来哺乳類の分布拡大に関連する可能性が示した。

いずれの成果も、科学的見地から新規性のあるもので（今回確認されたカエルツボカビおよびラナウイルスともに、日本独自のハプロタイプや株である）、世界各地で生じているパンデミックの解析に重要な情報を提供するものとする。

(2) 地球環境政策への貢献

両生類の野生個体群の急激な減少は世界的にも大きな問題とされている。特にカエルツボカビやラナウイルスは IUCN（国際自然保護連合）および国際獣疫事務局においても重要な野生生物感染症と認定されており、世界的な検疫と防除対策の推進が唱われている。本研究課題において得られた成果は、国際的な両生類感染症対策に対して、特にアジア地域の両生類保護という観点から重要な科学的知見を提供するものである。また、サブテーマ 1 でも主張されているように、生物多様性のかく乱と感染症 pandemic という新しい概念にひとつの布石を提供するものである。

6. 引用文献

- 1) Une Y, Kadekaru S, Tamukai K, Goka K & Kuroki T (2008). First report of spontaneous chytridiomycosis in frogs in Asia. *Dis. Aquat. Org.* 82, 157-160.
- 2) Une Y, Sakuma A, Matsueda H, Nakai K & Murakami M (2009). Ranavirus Outbreak in North American bullfrogs (*Rana catesbeiana*), Japan, 2008. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 1146-1147.
- 3) Berger L, Speare R, Daszak P, Green DE et al (1998). Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 9031-9036.
- 4) Lips KR, Brem F, Brenes R, Reeve JD et al (2006). Emerging infectious disease and the loss of biodiversity in a Neotropical amphibian community. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103, 3165-3170.
- 5) Speare R & Berger L (2000). Global distribution of chytridiomycosis in amphibians. James Cook University, Townsville. www.jcu.edu.au/school/phtm/PHTM/frogs/chyglob.htm
- 6) Weldon C, du Preez LH, Hyatt AD, Muller R & Speare R (2004). Origin of the amphibian chytrid fungus. *Emerg. Infect. Dis.* 10, 2100-2105.
- 7) Cunningham AA, Hyatt AD, Russell P & Bennett PM (2007). Emerging epidemic diseases of frogs in Britain are dependent on the source of ranavirus agent and the route of exposure. *Epidemiol. Infect.* 135, 1200-1212.
- 8) Miller DL, Rajeev S, Gray MJ & Baldwin CA (2007). Frog virus 3 infection, cultured American

- bullfrogs. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 342-343.
- 9) Daszak P, Berger L, Cunningham AA, Hyatt AD, Green DE & Speare R (1999). Emerging infectious diseases and amphibian population declines. *Emerg. Infect. Dis.* 5, 735-748.
- 10) 佐藤 宏、稲葉孝志、井濱 康、神谷晴夫 (2000) 寄生虫病学：本邦東北地方北西部に生息する野生肉食類の寄生虫調査. *J. Vet. Med. Sci.* 61:1023-1026.
- 11) 伊原貞雄、宇根有美、佐藤 宏、稲葉 修 (2010) 阿武隈山地北部のトウホクサンショウウオにおける皮膚メタセルカリア結節の発生とその増加 *爬虫両生類学会報* 2: 97-102.
- 12) Sato H, Ihara S, Inaba O & Une Y (2010). Identification of *Euryhelmsis costaricensis* metacercariae in the skin of Tohoku hynobiid salamander (*Hynobius lichenatus*), northeastern, Honshu, Japan. *J. Wildl. Dis.* 46, 832-842.
- 13) 宇根有美 (2009) カエルの大量死-両生類の新興感染症- *獣医疫学雑誌* 13: 138-140.

7. 国際共同研究等の状況

パナマ大学とパナマスミソニアン熱帯研究所の研究者と共同研究の打ち合わせをした。フィリピン大学獣医学部病理学研究室教授マサガイ博士を共同研究の打ち合わせをし、協力を得て、フィリピンでの採材を実施した。タイ、チュラロンコン大学獣医学部病理学研究室准教授アチャリア博士と共同研究をおこなうことになった。

8. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文 (査読あり)>

- 1) Une Y, Kadekaru S, Tamukai K, Goka K & Kuroki T (2008). First report of spontaneous chytridiomycosis in frogs in Asia. *Dis. Aquat. Organ.* 82, 157-160.
- 2) Une Y, Sakuma A, Matsueda H, Nakai K & Murakami M (2008). Ranavirus outbreak in North american bullfrogs (*Rana catesbeiana*), Japan, 2008. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 1146-1147.
- 3) 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. *Mol. Ecol.* 18, 4757-4774.
- 4) Takano A, Goka K, Une Y, Shimada Y, Fujita H, Shiino T, Watanabe H & Kawabata H (2010). Isolation and characterization of a novel *Borrelia* group of tick-borne borreliae from imported reptiles and their associated ticks. *Environ. Microbiol.* 12, 134-146.
- 5) Tamukai K, Une Y, Tominaga A, Suzuki K & Goka K (2010). Treatment of spontaneous chytridiomycosis in captive amphibians using itraconazole. *J. Vet. Med. Sci.* 73, 155-159.

<その他誌上発表 (査読なし)>

- 1) 宇根有美 (2008) 実験動物のカビ問題 特集カエルのツボカビ症 *アニテックス* 20: 28-35.
- 2) 宇根有美 (2008) カエルツボカビのその後 *エキゾチックペット研究会誌* 10: 10-14.

- 3) 宇根有美 (2009) カエルにせまるさまざまな危機 *Newton* 29: 124.
- 4) 宇根有美 (2009) 両生類のラナウイルス感染症 *モダンメディア* 55: 11-19.
- 5) Masangkay S. J, Une Y & Yoshikawa Y(2009). The Silence of the Frog-due to a fungus. *Animal Scene*. 9, 26-31.

(2) 学会発表

- 1) 宇根有美: 第 29 回日本家屋害虫学会年次大会. (2008) 講演
「カエルの新興感染症「ツボカビ症」」
- 2) 宇根有美: 第 55 回日本生態学会. (2008) 講演
「カエルツボカビの発見と病理学的特性」
- 3) 宇根有美: 第 145 回日本獣医学会. (2008)
「カエルツボカビの病原性-飼育下および野生下両生類におけるツボカビ症-」
- 4) 嘉手苺 将、中島康太、黒木俊郎、五箇公一、宇根有美: 第 145 回日本獣医学会. (2008)
「飼育下外国産カエルの自然発生性ツボカビ症の病理学的研究」
- 5) Une Y, Kadekaru S, Tamukai K, Goka K, Kuroki T : 26th Annual Meeting European Society of Veterinary Pathology. (2008)
「First Asian report of spontaneous Chytridiomycosis in captive frog.」
- 6) 宇根有美: 第 47 回日本爬虫両棲類学会. (2008) 講演
「カエルツボカビとラナウイルス」
- 7) 田中-上野寛子、松井久実、宇根有美、福山欣司: 第 47 回日本爬虫両棲類学会. (2008)
「カエルツボカビゲノムの微量検出法」
- 8) 松井久実、田中-上野寛子、宇根有美、福山欣司: 第 47 回日本爬虫両棲類学会. (2008)
「日本産カエル類に対するカエルツボカビ感染実験の進捗報告」
- 9) 宇根有美: 第 7 回爬虫類両生類の臨床と病理に関するワークショップ. (2008) 講演
「カエルツボカビその後とラナウイルス」
- 10) 佐久間晶子、佐藤 宏、伊原禎雄、宇根有美: 第 7 回爬虫類両生類の臨床と病理に関するワークショップ. (2008)
「トウホクサンショウウオ (*Hynobius lichenatus*) の流行性浮腫病に関する検討」
- 11) 中島康太、松井久実、宇根有美: 第 7 回爬虫類両生類の臨床と病理に関するワークショップ. (2008)
「カエルツボカビ (*Batrachochytrium dendrobatidis*) の日本在来両生類 へのリスク評価のための感染実験」
- 12) 宇根有美: 第 7 回爬虫類両生類の臨床と病理に関するワークショップ. (2008) 講演
「パナマのカエルツボカビ事情」
- 13) 宇根有美: 第 46 回レプトスピラ・シンポジウム. (2008) 講演
「カエルへの脅威は尽きない -カエルツボカビのその後と新たな脅威-」
- 14) 五箇公一、宇根有美、鈴木一隆、中原美理、小林亜玲、横山 潤、D Hyatt Alex: 第 53 回日本応用動物昆

- 虫学会. (2009)
「カエルツボカビはカエルを滅ぼすのか？」
- 15) 宇根有美、佐久間晶子、中井克樹、村上 賢: 第 147 回日本獣医学会学術集会. (2009)
「日本におけるウシガエル (*Rana catesbiana*) のラナウイルス感染症」
- 16) 中島康太、松井久美、上野寛子、宇根有美: 第 147 回日本獣医学会学術集会. (2009)
「カエルツボカビ (*Batrachochytrium dendrobatidis*) の日本在来両生類へのリスク評価のための感染実験」
- 17) 川澄大河、宇根有美: 第 147 回日本獣医学会学術集会. (2009)
「オオサンショウウオ (*Andrias japonicus*) の腎芽腫の 1 例」
- 18) 宇根有美: 第 49 回獣医病理学研修会. (2009)
「カエルの腎臓」
- 19) Une Y, Nakajima K, Taharaguchi S, Ogihara K, Murakami M: 27th Annual Meeting European Society of Veterinary Pathology. (2009)
「Ranavirus infection outbreak in the salamander (*Hynobius nebulosus*) in Japan.」
- 20) 宇根有美、伊原禎雄、中島康太、佐久間晶子、稲葉 修、佐藤 宏: 第 148 回日本獣医学会学術集会. (2009)
「阿武隈山系トウホクサンショウウオ *Hynobius lichenatus* における皮下メタセルカリア症の集団発生」
- 21) 佐藤 宏、伊原禎雄、稲葉 修、中島康太、宇根有美: 第 148 回日本獣医学会学術集会. (2009)
「阿武隈山系トウホクサンショウウオで多発する皮膚結節の原因としての *Euryhelminis costaricensis*」
- 22) 伊原禎雄、稲葉 修、佐藤 宏、宇根有美: 第 15 回野生生物保護学会. (2009)
「阿武隈山地北部のトウホクサンショウウオにおける結節の発生」
- 23) 亀田ももこ、辰巳智香、松井久美、中島康太、宇根有美、田中 - 上野寛子、稲葉重樹: 第 48 回日本爬虫両棲類学会. (2009)
「純培養カエルツボカビを用いたヌマガエルに対する感染実験」
- 24) 五箇公一、横山潤、鈴木一隆、富永篤、宇根有美、水谷知生、Jean-Marc Hero、Alex Hyatt: 第 48 回日本爬虫両棲類学会. (2009)
「カエルツボカビ・アジア起源説の検証 (その 1) 日本におけるカエルツボカビ多様性」
- 25) 宇根有美: 第 8 回爬虫類両生類の臨床と病理に関するワークショップ. (2009)
「両生類のラナウイルス」
- 26) 松井久美、亀田ももこ、辰巳智香、中島康太、宇根有美、田中-上野寛子、稲葉重樹、福山欣司: 第 8 回爬虫類両生類の臨床と病理に関するワークショップ. (2009)
「カエルツボカビは結局ヌマガエルを致死させるのだろうか？」
- 27) 宇根有美、中島康太、田原口智士、荻原喜久美、村上 賢: 第 8 回爬虫類両生類の臨床と病理に関するワークショップ. (2009)
「国内初の有尾類におけるラナウイルス感染症の流行」
- 28) 中島康太、田原口智士、荻原喜久美、松井久美、村上 賢、宇根有美: 第 8 回爬虫類両生類の臨床と病

理に関するワークショップ. (2009)

「国内で発見されたウシガエルラナウイルスの在来両生類への病原性」

29) 佐藤 宏、伊原禎雄、稲葉 修、宇根有美: 第 8 回爬虫類両生類の臨床と病理に関するワークショップ. (2009)

「阿武隈山系北部トウホクサンショウウオで目撃の増える *Euryhalmis costaricensis* による皮膚結節」

30) 富永 篤、五箇公一、鈴木一隆、田向健一、宇根有美: 第 57 回日本生態学会. (2010)

「琉球列島におけるカエルツボカビの分布実態とその感染力」

31) 中島康太、田原口智士、荻原喜久美、松井久美、村上 賢、宇根有美: 第 149 回日本獣医学会学術集会. (2010)

「在来両生類における実験的ウシガエルラナウイルス (RCV-JP) 感染症の病理学的検索 (最優秀ポスター受賞)」

32) 高野 愛、藤田博己、角坂照貴、五箇公一、宇根有美、川端寛樹、渡邊治雄: 第 149 回日本獣医学会学術集会. (2010)

「爬虫類および爬虫類寄生マダニより発見された新群のボレリアとその性状解析 (プレリナリーセッション)」

33) Une Y, Goka K & Ohta H : 28th Meeting of the European Society of Veterinary Pathology and European College of Veterinary Pathologists. (2010)

「Origin of the world frog pandemic: Evidence from East Asia supports the novel pathogen theory.」

34) 宇根有美、五箇公一、太田英利: 第 150 回日本獣医学会学術集会. (2010)

「オオサンショウウオのカエルツボカビが意味すること」

35) 佐藤暢浩、服部文乃、田原口智士、宇根有美、村上 賢、原元 宣: 第 150 回日本獣医学会学術集会. (2010)

「国内野生下両生類より分離されたラナウイルスの一般性状」

36) 富永 篤、五箇公一、鈴木一隆、田向健一、宇根有美: 第 9 回爬虫類両生類の臨床と病理に関するワークショップ. (2010)

「中琉球におけるカエルツボカビの分布とその感染力」

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない。

(4) シンポジウム、セミナーの開催 (主催のもの)

1) 第 145 回日本獣医学会 日本野生動物医学会 シンポジウム I

「カエルツボカビ、発見から」

(2008 年 3 月 29 日、麻布大学第 7 会場、参加者 70 名)

2) 第 7 回爬虫類両生類の臨床と病理に関するワークショップ.

(2008 年 11 月 8 日、麻布大学 8 号館百周年記念ホール、参加者 149 名)

3) 第 8 回爬虫類両生類の臨床と病理に関するワークショップ.

(2009年11月14日、麻布大学8号館百周年記念ホール、参加者123名)

4) 第9回爬虫類両生類の臨床と病理に関するワークショップ.

(2010年11月13日、麻布大学8号館百周年記念ホール、参加者161名)

(5) マスコミ等への公表・報道等

- 1) ABNステーション「両生類絶滅の危機から」(2008年6月10日、長野朝日放送)
- 2) 毎日新聞くらしナビPets「自然を模した空間で」(2008年6月25日、全国版)
- 3) 朝日新聞「カエルの大量死招く ラナウイルスを警戒」(2008年11月14日、全国版)
- 4) 共同通信社excite ニュース「ラナウイルス感染、カエル大量死 国内初確認」
(2009年2月27日)
- 5) 西日本新聞、山陽新聞、中日新聞、東京新聞、北海道新聞、北日本新聞、岩手日報、京都新聞、静岡新聞、山梨日日新聞、山陰中央新報、河北新報、下野新聞、長崎新聞、神戸新聞、四国新聞、日本海新聞、徳島新聞、東奥日報、佐賀新聞、山形新聞、福島民報、岐阜新聞、高知新聞、大分合同新聞、宮崎日日新聞、共同通信47NEWS、秋田さきがけ新報さきがけ On The Web、共同通信社Infoseek ニュース「ウシガエルにラナウイルス感染 国内初確認、池で大量死」(2009年2月27日)
- 6) The Japan Times「Frogs at risk after ranavirus found in pond」(2009年2月28日)
- 7) 朝日新聞「カエルに新たな脅威「ラナウイルス」国内の池で初確認」
(2009年3月1日)
- 8) 朝日新聞「海外で猛威 ラナウイルス カエル大量死 国内確認」(2009年3月1日)
- 9) 朝日新聞「ラナウイルス感染 カエル大量死確認」(2009年3月2日)
- 10) 朝日小学生新聞「ラナウイルス」(2009年3月3日)
- 11) 毎日新聞「カエル大量死「ラナウイルス」」(2009年3月6日)
- 12) 読売新聞「国内のカエルにラナウイルス」(2009年3月8日)
- 13) CBC ラジオ多田しげおの気分爽快「カエル大量死！ラナウイルスとは？」
(2009年3月17日)
- 14) ABN長野放送「ラナウイルスについて」(2009年4月2日)
- 15) JR トレインチャンネル「知ってる？サイエンス 動物の病気を捉えるハンター、獣医病理学者」(2009年4月30日)
- 16) JR トレインチャンネル「知ってる？サイエンス カエルの危機」(2009年4月30日)
- 17) 文化放送 大村正樹のサイエンスキッズ「ヒトの体の中で繰り広げられている闘い」
(2009年5月23日,30日)
- 18) フジテレビ 熱血！平成教育学院 「ツボカビ」(2009年6月7日)
- 19) 読売新聞「生態系脅かす大量死」(2009年6月11日)
- 20) 月刊ポプラディア「ラナウイルス」(2009年8月,ラナウイルス顕微鏡写真提供)
- 21) 朝日新聞「電解質の流れが阻害され心不全」(2009年11月3日)
- 22) 朝日新聞「ラナウイルス サンショウウオも感染」(2009年11月24日)
- 23) 河北新報「「山椒魚は悲しんだ」 感染症 福島で確認」(2010年4月17日)

- 24) 読売新聞「菌に罪はない」(2010年5月6日)
- 25) しんぶん赤旗「怖〜い カエルツボカビ」(2010年5月10日)
- 26) 朝日小学生新聞「ラナウイルスでカエルなど大量死」(2010年6月19日)

(6) その他

- 1) 宇根有美: 第7回爬虫類両生類の臨床と病理に関するワークショップ教本『AMPHIBIANS』(全188ページ) 2008年11月8日発行
発行先 爬虫類・両生類の臨床と病理のための研究会
- 2) 宇根有美: 第8回爬虫類両生類の臨床と病理に関するワークショップ教本『SNAKES』(全193ページ) 2009年11月14日発行
発行先 爬虫類・両生類の臨床と病理のための研究会
- 3) 宇根有美: 平成22年 麻布大学同窓会愛知県支部総会. (2010)講演
「ツボカビ症」
- 4) 宇根有美: 第9回爬虫類両生類の臨床と病理に関するワークショップ教本『LIZARDS』 (全190ページ) 2010年11月13日発行
発行先 爬虫類・両生類の臨床と病理のための研究会