

カエルのツボカビ症の疫学のおよび病理学的研究

Epidemiological and pathological study of chytridiomycosis

宇根有美, 松井久実

麻布大学獣医学部

Yumi Une, Kumi Matsui

School of Veterinary Medicine, Azabu University

Abstract: We confirmed the presence of chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*) for the first time in Japan in December, 2006. We underwent this and performed study for risk evaluation to Japanese native amphibians of *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd). As a result,

- 1) We succeeded in the establishment of Bd culture.
- 2) We have begun investigating the cause of mass deaths or unexplained death among wild native frogs. Of 35 episodes (72 individuals) examined so far, not one case of chytrid fungal infection has been identified.
- 3) Fifteen outbreaks have so far been identified involving 94 frogs in 9 species in captive and exotic amphibians.
- 4) Japanese native amphibians do show susceptibility to chytrid fungus. Three species (*Fejervarya limnocharis*, *Rana (Eburana) utsunomiyaorum* and *Rana psaltis*) of native frog are sensitive to the chytrid fungus, and die if infected experimentally with the C type.

Based upon the foregoing, it was made clear that Bd which divided from exotic species amphibian gave bad influence to some native amphibian. Therefore, we have to try for nonproliferation in the outdoors of Bd.

1. 目的

カエルツボカビ *Batrachochytrium dendrobatidis* は、1998年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、絶滅に関わっているとされ、国際自然保護連合のワースト100に入る危険な生物とされている。

2006年12月、我々はアジア初のツボカビ症を発見し、現在、生態系や生物多様性保全のための対策をとっている最中である。

しかし、日本在来種に対するカエルツボカビの感受性や病原性、症状や病変も不明で、野外での対策計画に支障をきたしている。また、現在飼育下両生類間に流行しているカエルツボカビ対策として、よ

り迅速、簡便なツボカビ症診断法の確立、治療法および消毒法についても検討する必要がある。

そこで今回は、1) カエルツボカビの培養条件を検討、培養株を樹立する、2) 国内で不審死、大量死した野生下および飼育下両生類の病性鑑定や、調査購入した飼育下両生類の検査を行い、カエルツボカビの国内流行状況を明らかにする、3) 感染実験を行い日本在来種の感受性を調べることを目的とした。

2. 材料と方法

1) 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事例 (Table. 1: 15事例目) クランウェルツノガエル HK-17の皮膚組織片を用いて分離培養を試みた。

Table. 1 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)	ピパパルバ	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)	クランウェルツノガエル	38	南米(国内繁殖)
	合計	9種類	94	

2) 飼育下両生類におけるツボカビ症の発生状況調査

全国から依頼のあった飼育下両生類の病性鑑定と、国内で販売されている両生類を購入して(計330匹34種以上:アフリカツメガエルとウシガエルを除く)検査を行い、カエルツボカビの感染状況を調査した。

3) 野生下両生類の不審死, 大量死事例の病性鑑定

全国から不審死, 大量死した外来種の病性鑑定依頼(35事例)を受け, 野外でのカエルツボカビ感染状況を調査した。調査した外来種の内訳はTable. 2のとおりである。カエルツボカビ感染の有無はNested-PCR法を用い, ツボカビ症の判定は病理学的に行った。

4) カエルツボカビの外来種への影響の評価

(外来種を用いた感染実験)

感染実験候補種の選定は, 外来種40種を分類学的位置, 地理分布, 生態学的特徴について考慮し, 第1次~第3次までの候補の優先順位付けを行い, 第1次候補を優先に, 採集時期や場所を考慮して選定した。その結果, 沖縄県指定天然記念物3種を含む20種178匹に加えて, 感染対照として外国産のツノガエル, ヤドクガエル, マンテラ6匹を加えた計184個体を用いて, その半数に対し感染実験を行った。

通常, 病原体の感染実験には株化されたものを感染源として用いるが, 実験開始時にカエルツボカビ

の株化がなされていなかったため, 感染源として, 発症クランウェルツノガエル (*Ceratophrys cranwelli*) とマルメタピオカガエル (*Lepidobatrachus laevis*) の飼育水(汚染水)を用いた。実験期間は2007年9月24日から2008年3月24日までの6ヶ月間とし, 実験開始から2週間, 飼育水(汚染水)入手毎に個体に直接滴下, 及び水槽内の水入れへの添加によって継続的に暴露した。暴露後, 週に1回体表swabを採取し, 分子生物学的検査に供した。暴露後6ヶ月で実験終了として, 安楽殺後, ホルマリン固定材料とし, 定法に従い固定, 包埋し, 4µmで薄切後HE染色を施し, 病理学的検索を行った。病理学的検索には, カエルツボカビの好寄生部位とされる後肢指端と大腿部内側の水のみバッチに加えて, 腹側皮膚と背側皮膚の4箇所を用い, 形態学的にカエルツボカビの遊走子嚢および遊走子の有無を判定した。分子生物学的検査法では, AnnisらによるPCR法を用い (Annis, 2004), アガロース電気泳動もしくはポリアクリルアミド電気泳動で目的バンドの有無を判定した。飼育条件として, 飼育容器は, 横180×縦110×高さ120mmのプラスチック製生物飼育ケースを用い, 赤玉土と水入れ(内径50mm)を入れたものを使用した。大型の個体には横300×縦200×高さ180mmのケースを用い, 同様に飼育した (Fig. 1)。実験室内は温度22~23℃, 湿度40~45%に保ち,

Table 2 野生下両生類の不審死、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	狭山・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	湿地脇の水路と歩道	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	トウキョウダルマガエル	1匹	1	水田	JA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	07.06.18	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	ニホンアマガエル		1	自宅の庭	生活環境課
20	07.07.01	千葉県	カジカガエル	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	ト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	トウキョウダルマガエル	26匹	5	水族館飼育	動物園職員
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	県企画振興部景観自然室
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	ナミエガエル	1匹	1	林道	野生生物保護センター
33	07.09.14	沖縄県	サキシマヌマガエル	成体12匹 幼体約100匹	3	工場内用水路	野生生物保護センター
34	07.09.14	沖縄県	リュウキュウカジカガエル	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	溪流	自然観察者



Fig. 1 感染実験の様子。

12時間明暗条件とした。カエルの餌として、国内繁殖業者よりフタホシコオロギおよびヨーロッパイエコオロギを購入して、与えた。

3. 結果と考察

1) 培養株の樹立

皮膚サンプルから可能な限り雑菌、カビなどを除去、PmTG培地で培養し、培養株を樹立した (Fig. 2) (NITE 稲葉重樹博士による)。この培養株樹立により、カエルツボカビの病原性の検討、在来種への影響の評価、消毒法、診断法などの検討が可能となった。

2) 野生下両生類の不審死、大量死事例の病性鑑定

21種類、37事例(1事例で2種を含むものがある)、72匹を検索したが、カエルツボカビで死亡したと判定された事例はなかった。死因として、急激な温度低下による凍死、溺死、食殺(哺乳類、鳥類など)、その他が考えられた (Table 2)。

3) 飼育下両生類におけるツボカビ症の発生状況調査

15箇所9種94匹でツボカビ症を確認した

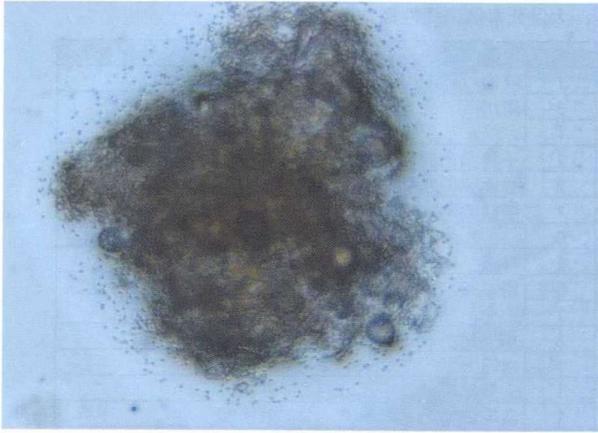


Fig. 2 中心部の黒色部は遊走子嚢、周囲に遊走子が観察される。

(Table. 1)。流通経路が広く汚染され、かつ多種類の外国産両生類が感受性を有しており、死に至ることが確認できた。

4) カエルツボカビの在来種への影響の評価 (在来種を用いた感染実験)

感染群では、96匹中31匹死亡、陰性コントロール群では88匹中20匹が死亡した。死亡率は、感染群が16.8%、コントロール群が10.9%であった。暴露後41, 42, 47日目にヌマガエル (*Rana limnocharis limnocharis*) 4個体, 45日目にコガタハナサキガエル (*Rana utsunomiyaorum*) 1個体, 54, 58日目にヤエヤマハラブチガエル (*Rana psaltis*) 2個体が死亡し、上記の7検体(全体の3.8%)で分子生物学的・病理組織学的検査によってカエルツボカビの存在が確認された。特にヌマガエルで感染が高度であり、材料に供した皮膚のほぼ全てにおいてび慢性にツボカビが観察され、ケラチン層の肥厚、表皮の過形成なども認められた (Fig. 4)。臨床経過として、ヌマガエルは死亡数日前に大腿部内側面が発赤している例もあったが、前日まで特に異常がなく翌日突然死亡している例がほとんどであった (Fig. 3)。コガタハナサキガエルでは死亡前日に脱皮がみられた。ヤエヤマハラブチガエルの1個体は、斜頸や眼球の白濁がみられ、病理組織学的検査で脳内に原虫が確認された。いずれの種類においても、突然死あるいは発症後極めて短期間に死んでいること、また、感染群陽性対照としたクランウェルツノガエルの死亡より早期に死亡していることから、これらの種類のカエルは感受性が高く、急性かつ致死性カエルツボカ

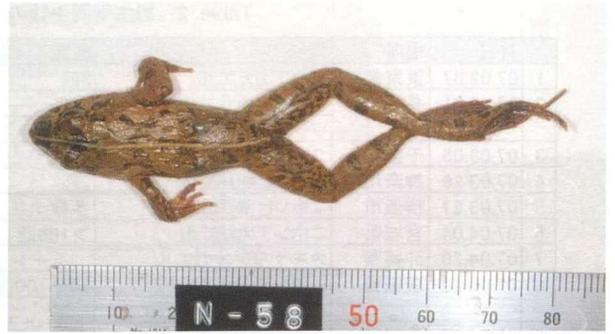


Fig. 3 感染群ヌマガエルの死亡時の所見。

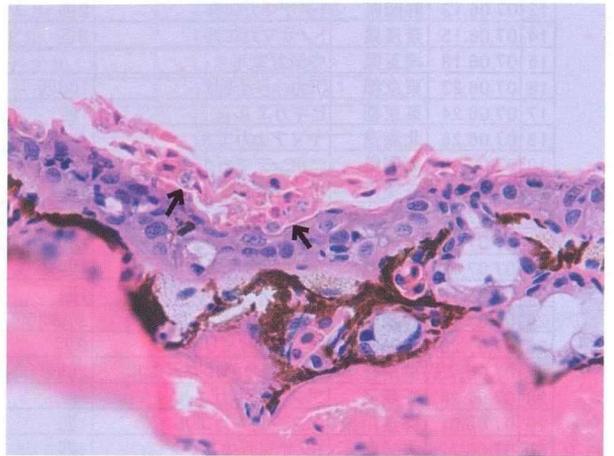


Fig. 4 ヌマガエルの皮膚組織像
角化層にカエルツボカビの遊走子嚢が観察される。

ビ感染症を生じることがわかった。

なお、クランウェルツノガエルは生存中脱皮があり、脱皮の程度は週によって亢進する期間と、全く脱皮のみられない期間があった。死亡4日前から食欲不振と後肢伸張が観察された。

分子生物学的検索では、死亡したヌマガエルでは、経時的に、カエルツボカビのコピー数が増加した (Fig. 5)。また、死亡したヌマガエル4個体、コガタハナサキガエル1個体の死亡時スワブPCR産物の塩基配列を調べたところ、国立環境研究所・五箇公一博士の分類によるCタイプの塩基配列に100%一致した。また、感染源となったクランウェルツノガエルのカエルツボカビ配列はCタイプ、マルメタピオカガエルのカエルツボカビ配列はAタイプであった。

6ヶ月の観察期間終了時に生存していた個体および前述の種類以外で観察期間内に死亡した個体で、タゴガエル1匹を除いて、病理学的にカエルツボカ

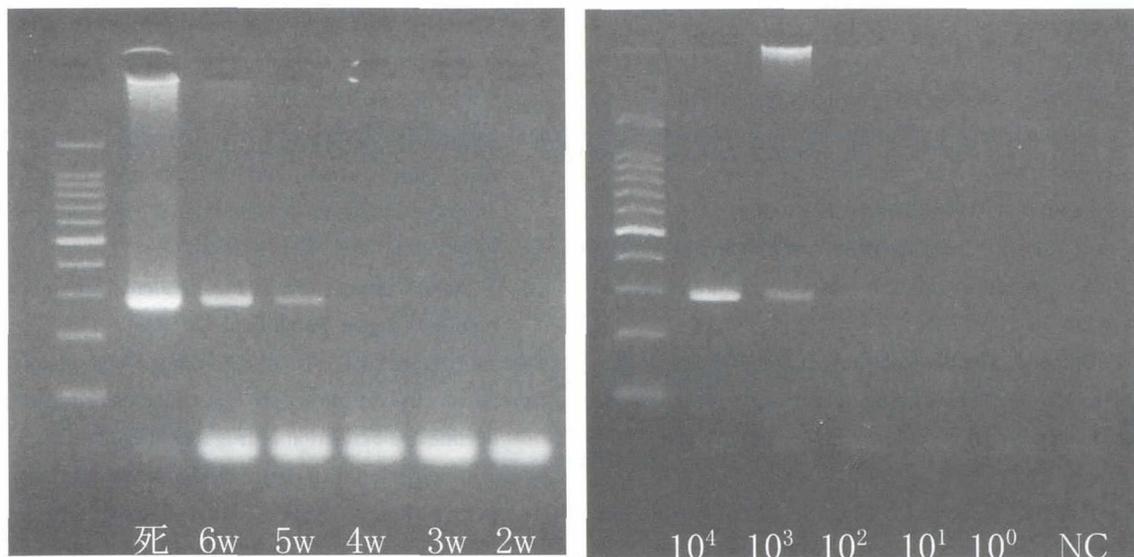


Fig. 5 死亡したヌマガエルの皮膚スワブ PCR によるカエルツボカビ DNA 量の経時的変化。カエルツボカビが経時的に皮膚表面で増殖していることが判る。右図は、基準 DNA 数

ビは観察されなかったが、一部に PCR 陽性の個体が認められた。タゴガエルでは、指端にわずかであったが、カエルツボカビが病理学的に確認された。

カエルツボカビの感染様式は、①カエルツボカビによって死に至るもの（急性または慢性）。②健康保菌者（持続感染）。③感染はするが、経過とともにカエルツボカビが消失するもの（耐過）。④感受性がなく感染しないもの。この4パターンが考えられる。このうち、①に該当するものは、ヌマガエル、コガタハナサキガエル、ヤエヤマハラブチガエルで、少なくともこれらの3種は、急性ツボカビ症で死亡しており、これによりカエルツボカビの日本在来種への病原性が明らかになった。飼育下と野外では大きな差があるが、野外において、何らかの環境の変化によってカエルツボカビがアウトブレイクする可能性が捨てきれない限りは、今後もカエルツボカビに対して注意を払う必要があると言えるだろう。

死亡個体の中には PCR 陽性・病理陰性個体、生存個体では PCR 陽性個体があり、②・③のパターンが予測されたが、②～④の3パターンを確認するには、現在検索中の PCR 検査の経時的変化を考慮する必要があり、今後検討していく予定である。今回の研究で、改めて、カエルの種類によりカエルツボカビへの感受性（抵抗性）にかなりの違いがあることがわかった。致死例もさることながら、健康保菌動物の存在は、野外におけるカエルツボカビ対策に重要な

問題となる。その一方で、カエルツボカビ抵抗性の機序の研究は、今後のカエルツボカビ対策に有用な情報となるであろう。

4. 要約

我々は、2006年12月にアジア初のツボカビ症を発見した。これを受けて、カエルツボカビの日本在来種へのリスク評価のための研究を行った。その結果、1) カエルツボカビ培養株の樹立に成功した。2) 野生下両生類の不審死、大量死事例35事例72匹を検索し、野生下では、まだ、ツボカビ症が発生していないことを確認した。3) 飼育下両生類で15箇所9種94匹にツボカビ症の流行を確認した。4) 在来種20種にカエルツボカビを感染させたところ、ヌマガエル、コガタハナサキガエル、ヤエヤマハラブチガエルがツボカビ症を発症し死亡した。以上のことから、外来種両生類由来カエルツボカビは、一部の在来種に悪影響を及ぼすことが明らかにされた。よって、野外での拡散防止に努める必要がある。

文献

- Annis SL, Dastoor FP, Ziel H, Daszak P, Longcore JE (2004) A DNA-based assay identifies *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians. *J Wildl Dis* 40: 420-428.
- Berger L, Speare R, Daszak P, Green DE and others (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
- Berger L, Speare R, Kent A (1999) Diagnosis of chytridiomycosis in amphibians by histologic examination. James Cook University, Townsville. Available at: www.jcu.edu.au/school/phtm/PHTM/frogs/histo/chhisto.htm
- Bradley GA, Rosen PC, Sredl MJ, Jones TR, Longcore JE (2002) Chytridiomycosis in native Arizona frogs. J Wildl Dis 38: 206-212.
- 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
- Goka K, Okabe K, Yoneda M, Niwa S (2001) Bumblebee commercialization will cause worldwide migration of parasitic mites. Mol Ecol 10: 2095-2099
- Green DE, Muths E (2005) Health evaluation of amphibians in and near Rocky Mountain National Park (Colorado, USA). Alytes 22: 109-129
- Hyatt AD, Boyle DG, Olsen V, Boyle DB and others (2007) Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. Dis Aquat Org 73: 175-192
- Johnson ML, Speare R (2003) Survival of *Batrachochytrium dendrobatidis* in water: quarantine and control implications. Emerg Infect Dis 9: 922-925
- Johnson ML, Speare R (2005) Possible modes of dissemination of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* in the environment. Dis Aquat Org 65: 181-186
- Lips KR, Brem F, Brenes R, Reeve JD and others (2006) Emerging infectious disease and the loss of biodiversity in a Neotropical amphibian community. Proc Natl Acad Sci USA 103: 3165-3170
- Longcore JE, Pessier AP, Nichols DK (1999) *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov. A chytrid pathogenic to amphibians. Mycologia 91: 219-227
- Ota H (2000) Current status of the threatened amphibians and reptiles of Japan. Popul Ecol 42: 5-9
- Skerratt LF, Berger L, Speare R, Cashins S and others (2007) Spread of chytridiomycosis has caused the rapid global decline and extinction of frogs. EcoHealth 4: 125-134
- Speare R, Berger L (2000) Global distribution of chytridiomycosis in amphibians. James Cook University, Townsville. Available at: www.jcu.edu.au/school/phtm/PHTM/frogs/chyglob.htm
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res 22: 4673-4680
- Voyles J, Berger L, Young S, Speare R and others (2007) Electrolyte depletion and osmotic imbalance in amphibians with chytridiomycosis. Dis Aquat Org 77: 113-118
- Weldon C, du Preez LH, Hyatt AD, Muller R, Speare R (2004) Origin of the amphibian chytrid fungus. Emerg Infect Dis 10: 2100-2105
- Young S, Berger L, Speare R (2007) Amphibian chytridiomycosis: strategies for captive management and conservation. Int Zoo Yearb 41: 85-95