

外来性両生類における
カエルツボカビ (*Batrachochytrium dendrobatidis*) の
疫学および臨床学的研究

2014年7月

麻布大学獣医学部

病理学研究室

田向健一

目次

諸言	3
第 1 章 日本国内で飼育もしくは国際商取引されている両生類の <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> 保菌率とその ITS haplotype 解析	7
第 1 節 序論	7
第 2 節 材料および方法	10
第 3 節 結果	13
第 4 節 考察	16
図表	20
第 2 章 飼育下両生類の自然発生性ツボカビ症に対するイトラコナゾールを用 いた治療方法の検討	34
第 1 節 序論	34
第 2 節 材料および方法	36
第 3 節 結果	38
第 4 節 考察	39
図表	41

第3章 *B. dendrobatidis* 除菌のための銅イオン (Cu^{2+}) の有効性の検討

Cu^{2+} によるアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) への影響に関する

評価	48
第1節 序論	48
第2節 材料および方法	51
第3節 結果	54
第4節 考察	57
図表	60
総括	74
謝辞	80
参考文献	81
Summary	91

諸言

近年の経済のグローバル化と輸送手段の変革により、物流は広域、大規模、迅速化された。その結果、生きた動物の人為的な移動、商取引により、H5N1 鳥インフルエンザやコイヘルペスウイルスのような新興病原体が、急速かつ広域に拡散され、汎発流行の大きな原因となっている (Pearson 2004, Karesh et al. 2005, Skerratt et al. 2007, Kriger & Hero 2009, Smith et al. 2009)。これらは、ときに野生生物個体群に壊滅的な影響をもたらし、また、甚大な経済的損失を生じる。

両生類は、ペット、食物あるいは実験動物として、多くの個体が国際的規模で商取引されている (Daszak et al. 2000, Mazzoni et al. 2003, Schlaepfer et al. 2005, Fisher & Garner. 2007, Gerner et al. 2009)。昨今、野生下両生類は急激な個体数の減少や絶滅が問題視されており、その要因として生息環境の破壊や気候変動、乱獲などがあげられている。その中で、国際自然保護連合 (International Union for Conservation of Nature; IUCN) は、両生類のグローバルアセスメントにおける両生類の絶滅に関連する重要な要因として「感染症」を指摘しており、具体的にカエルツボカビ (*Batrachochytrium dendrobatidis*) とラナウイルスを挙げた (IUCN 2004)。

B. dendrobatidis は 1999 年 Longcore et al. によってツボカビ門 (Chitridiomycota) ツボカビ科 (Chytridiaceae) に属し、1 属 1 種の新興病原体として記載された (Longcore et al. 1999)。現在 900 種のツボカビが知られるが、その後 2013 年に新種記載された *Batrachochytrium salamandrivorans* とともに両生類にツボカビ症を引き起こす真菌である (Martel et al. 2013)。

B. dendrobatidis によるツボカビ症は、皮膚の角質層の不規則な肥厚 (角化亢進、角質増殖症) を特徴とした皮膚感染症を引き起こす。パナマとオーストラリアの熱帯雨林に生息する無尾目の個体群やいくつかの種の急激な減少、絶滅の原因究明の過程で初めて発見された (Berger et al. 1998)。そして、現在までにアフリカ、南アメリカ、中央アメリカ、北アメリカ、ヨーロッパの野生および飼育下の集団でも確認されており (Berger et al. 1998, 1999, Lips 1999, Mutschmann et al. 2000, Bosch et al. 2001, Weldon 2002, Bradley et al. 2002)、ツボカビ症によって少なくとも 20 科 200 種以上の両生類の生息数が減少または絶滅したとされている (Berger et al. 1998, Stuart et al. 2004, Skerratt et al. 2007)。また、*B. salamandrivorans* によるツボカビ症は、北西部ヨーロッパのファイアーサラマンダー (*Salamandra salamandra*)

の個体群を減少させており、*B. dendrobatidis* のツボカビ症の主症状である皮膚角化亢進に対して、多巣性潰瘍性病変を特徴とする。

B. dendrobatidis の生活環は遊走子 (zoospore) と遊走子嚢 (zoosporangium) の 2 形態で営まれ、遊走子は直径 1~2 μm の球形で後方に鞭毛を有し水中を遊走する。遊走子嚢は、直径 6~15 μm の球形もしくは長球形で、筒状の放出管 (discharge tube) を有している。遊走子嚢は、両生類の角質層に埋没するように形成され、放出管は、体表面に開口している。遊走子嚢内には最大 300 個ほどの遊走子が形成され、放出管により外界 (水中) に放出される。*B. dendrobatidis* の発育の至適温度は 17-25 $^{\circ}\text{C}$ であり、23 $^{\circ}\text{C}$ が最も適している。28 $^{\circ}\text{C}$ で発育が止まり、32 $^{\circ}\text{C}$ では 96 時間、37 $^{\circ}\text{C}$ では 4 時間で死滅する。感染経路は水を介した水平感染であり、水中内を遊走する遊走子が両生類の皮膚に到達することで感染が成立する。皮膚に到達した遊走子は、角質を栄養源として、遊走子嚢を形成する。遊走子嚢は表皮表層の角質層 (ケラチン層) もしくは有棘細胞層、顆粒細胞層に感染し角質層が不規則に肥厚する。(Berger 1998)。

ツボカビ症の発症には、*B. dendrobatidis* の遊走子約 10,000 個相当量の遊走子が必要とされており (Kinney et al. 2011)、発症した両生類には、脱皮頻度の亢進、協調性運動失調や縮腫などがみられ、二次感染が起こると、赤肢症 (Red leg syndrome) 様の四肢や腹側面の充血がみられることがある。しかし、顕著な臨床症状をみせずに突然死する例も報告されている。*B. dendrobatidis* が両生類を死亡させる機序は長い間不明であった。両生類の表皮には水透過性があり、皮膚で水分代謝や電解質の調節を行っている (Deyrup 1964)。Voyles らは、実験的にイエアメガエルに *B. dendrobatidis* を感染させ血中電解質と心電図を測定し、体液の電解質異常が引き起こされることを明らかにし、ツボカビ症による病理発生を解明した (Voyles et al. 2007, Voyles et al. 2009)。

海外では、病原体としての特性に関する研究はもとより、生態系への影響の評価が IUCN を中心に行われ、これを受けて 2008 年に国際獣疫事務局 (World Organisation for Animal Health; OIE) は、水生動物衛生規約 (Aquatic Animal Health Code) で *B. dendrobatidis* を届出病原体とし (OIE 2012)、国際的な監視を必要とする病原体に指定した。

我が国では、ペットとしての両生類の飼育が近年大変盛んになっており、海外からの輸入のみならず、国内には、いくつかのペット用両生類の繁殖施設がある。*B. dendrobatidis*

は、遊走子を含んだ水を介して容易に感染するため (Johnson & Speare 2003)、ひとたび施設が汚染されると生産性は著しく低下するだけでなく、感染個体が流通することによって販売店や愛好家宅での感染拡大を引き起こす。実際、日本初のツボカビ症は、2006 年 10 月から 11 月にかけて、両生類愛好家宅における集団死亡事例から発見された。本事例ではペット用の外来性両生類が健康状態悪化を主訴に筆者の動物病院に来院し、抗生物質などの対症療法を行うも最終的に 18 種 45 個体が死亡した。最終的には共同研究者の宇根有美らにより病理組織学および分子生物学的にツボカビ症と確定診断された (Une et al. 2008)。その後の調査によって、商取引される両生類の流過程で 15 件以上の流行が確認された。

日本には固有種を含む無尾目 39 種と有尾目 27 種の両生類が生息しており、環境省が作成した 2012 年のレッドリストでは、そのうち絶滅危惧種が 42 種 67%にも及ぶ (Ministry of the Environment Government of Japan 2012)。ペットとして飼育される外来性両生類は、ときに野外に放逐されることがあり、これが感染源となり野生の両生類に感染拡大する可能性も指摘されている (Karesh et al. 2005, Holsbeek et al. 2008)。そのため、日本固有の両生類を *B. dendrobatidis* の脅威から守るためには、流通する両生類における *B. dendrobatidis* 感染状況の把握、流通個体を含めた飼育下両生類における適切な *B. dendrobatidis* 管理方法の確立が欠かせない。しかしながら、わが国に輸入される外来性両生類の *B. dendrobatidis* 感染実態を調査した報告はなく、一般家庭で飼育される両生類における保菌状況も把握されていない。さらに、多種多様の両生類に適用可能な除菌法および治療法の確立も不十分である。そこで、本研究では、流通する両生類の *B. dendrobatidis* 感染実態を明らかにし、併せて新たな除菌法・治療法を確立し、飼育下両生類を感染源とする、*B. dendrobatidis* の日本在来種への脅威を軽減することを目的とする。

本研究は、第 1 章では、国際商取引される、もしくは国内で飼育されている外来性両生類を対象として、*B. dendrobatidis* の侵淫状況を明らかにし、また、*B. dendrobatidis* 遺伝子解析から得られた塩基配列を解析し流通両生類の *B. dendrobatidis* の感染経路を考察した。第 2 章では、自然発生性のツボカビ症を対象としてツボカビ症の治療プロトコルの確立を目指した。第 3 章は、*B. dendrobatidis* の拡散予防のための有効な除菌法を確立するため、*B. dendrobatidis* の重要なキャリアとなる実験動物のアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*)

を用いて、抗真菌効果がある銅イオン (Cu^{2+}) がカエルに与える影響を臨床的、臨床病理学および病理学的に評価した。

第 1 章 日本国内で飼育もしくは国際商取引されている両生類の *Batrachochytrium dendrobatidis* 保菌率とその ITS haplotype 解析

第 1 節 序論

世界的規模の両生類減少の一因とされる真菌性感染症である *B. dendrobatidis* の拡散は、両生類の国際商取引によって増長されたとされる。我が国における *B. dendrobatidis* の発見は、共同研究者の宇根有美らが飼育下両生類から見出したもので、これはアジア地域におけるツボカビ症の初の報告となった (Une et al. 2008)。また、同時にアジア諸国における *B. dendrobatidis* の研究の先駆けとなり、この報告後にインドネシア (Kusrini et al. 2008, Swei et al. 2011)、韓国 (Yang et al. 2009)、中国 (Bai et al. 2010)、ラオス (Swei et al. 2011)、マレーシア (Savage et al. 2011, Swei et al. 2011)、カンボジア (Gaertner et al. 2011, Mendoza et al. 2011)、そしてタイ (Vörös et al. 2012) で報告された。

B. dendrobatidis が世界へ拡散した機序としてアフリカツメガエル (*Xenopus leavis*) を起源とする説がある。これは最古の *B. dendrobatidis* が 1936 年の南アフリカの博物館に保存されていたアフリカツメガエルから見つかったこと、1930 年代後半にアフリカツメガエルを用いたヒトの妊娠診断法が確立されたことにより南アフリカから世界各地へ輸出されたこと、さらに本種が妊娠アッセイ系のみならず、様々な実験動物として世界的に広く流通したことによる (Weldon et al. 2004, Weldon et al. 2007)。併せて、現地では本種の生息数に目立った増減がない事実などによって、*B. dendrobatidis* が拡散したとする説である。また、オオヒキガエル (*Bufo marinus*) は、*B. dendrobatidis* に不顕性感染しているが (Berger et al. 1998, Berger et al. 1999)、害虫防除といった生物的防除の役割を担わせるため、世界各地への意図的導入されたことが *B. dendrobatidis* 拡散の要因とされた (Daszak et al. 1999)。さらに、ウシガエル (*Limnodynastes dorsalis*) も高率で *B. dendrobatidis* を保菌しており、食用のカエルとして世界各地で養殖、国際取引され、アフリカツメガエルに匹敵するほどの拡散要因として重要視されている (Mazzoni et al. 2003, Garner et al. 2006, Schloegel et al. 2009, Schloegel et al. 2012)。

近年、流通の発達により、非常に多くの両生類が国際的に多様な用途で商取引されており (Schlaepfer et al. 2005, Andreone et al. 2006, Forzán et al. 2008, Nijman & Shepherd 2011)、

釣りの生餌に使用されるタイガーサラマンダー (*Ambystoma tigrinum*) が *B. dendrobatidis* と ラナウイルスを拡散させる可能性も指摘されている (Picco & Collins 2008, Picco et al. 2010)。

外来性両生類は物珍しさもあって、展示動物やペットとして人気を博しており、世界各地で野生から捕獲された動物が商取引されている。近年、日本においても、エキゾチック ペットの飼育が非常に盛んになり、多くの外来性両生類がペットとして輸入されており、財務省統計 (<http://toukei-ics.com/>) によると、その数は毎年 5,000 個体以上にのぼる。そして、このような両生類は *B. dendrobatidis* のキャリアになる可能性があり、また、*B. dendrobatidis* は、OIE 申告病原体であるにも関わらず、我が国では、過去に無尾目、有尾目、無足目を 含んだ輸入両生類の *B. dendrobatidis* 保菌状況を調査した報告はない。

共同研究者の五箇公一らは、日本に生息する在来両生類の *B. dendrobatidis* の感染実態を 調査したところ、4.1% (87/2103) で不顕性感染していることを報告した。そして、日本固 有の *B. dendrobatidis* 系統を検出した (Goka et al. 2009)。現在まで、日本の野生下両生類で はツボカビ症による死亡例は報告されていない。しかしながら、海外では依然、ツボカビ 症による野生下両生類の大量死が報告されていることから、輸入される外来性両生類を通 じて侵入する可能性のある *B. dendrobatidis* の保菌実態及びその遺伝子型を調査することは、 *B. dendrobatidis* の脅威から日本固有種を守るために必要である。

そこで、筆者は日本における飼育下および流通、輸入されたペット用両生類の *B. dendrobatidis* の感染の実態を明らかにするために、2008–2011 年の期間に、動物病院に来院 した両生類または動物輸入業者が海外より輸入した両生類の皮膚スワブサンプルを採取し、 nested-PCR 検査によって、*B. dendrobatidis* の感染率の疫学的調査を行った。さらに、そこ より得られた *B. dendrobatidis* の遺伝子断片を解析した。

真菌のリボソームRNAをコードする染色体上の領域をリボソームDNAと呼び、この領域 には18S、5.8S、28SリボソームRNAをコードする部分が存在している。これらの3つのコー ド部分の間の2カ所は、RNAに転写後スプライスされInternal Transcribed Spacer (ITS: 領域内 部のスペーサー) と呼ばれており、18Sと5.8Sの間をITS1、5.8Sと28Sの間をITS2と呼ぶ。ITS 領域は機能の少ない部分であるため、2つ以上の生物のこの領域の塩基の違いは、それらの 生物の近縁関係を示すと考えられており、真菌などの系統進化研究によく使用される。本研 究では、*B. dendrobatidis*陽性サンプルのITS領域の塩基配列の解析を行うことで、*B.*

dendrobatidis の haplotype を分類した。そして輸入された両生類に感染した各国別の *B. dendrobatidis* の haplotype を比較し、我が国で飼育される *B. dendrobatidis* および海外より侵入する系統の遺伝学的な考察をおこなった。

第2節 材料および方法

2-1 供試検体

2008-2011年の4年間にペット用として輸入、あるいは飼育、販売されていた両生類 109種 820個体よりサンプルを採取した。

- ・無尾目 (Anura) : 13科 90種 722個体
- ・有尾目 (Caudata) : 7科 17種 96個体
- ・無足目 (Gymnophiona) : 2科 2種 2個体

内訳は(表1)に示す。そのうち、輸入両生類 93種 561個体、飼育下両生類は 47種 259個体であった。それらは、すべて成体であった。

輸入両生類は、動物輸入業者4社(東京2、大阪1、埼玉1)によって20カ国から輸入され、日本到着直後、あるいは最長でも7日以内に *B. dendrobatidis* 検出のために体表スワブを採取した。そして、種類、輸出国、輸入年月日、採材年月日を記録した。

飼育下両生類は、家庭で長期間飼育され動物病院に受診した両生類、もしくはペット用として日本国内で繁殖および販売され、飼育期間が長い両生類を用いた。

2-2 採材

B. dendrobatidis を検出するためのスワブサンプルの採取は、コンタミネーションを防ぐために注意深く行った。すなわち、ゴム製グローブを装着した手で、両生類を1個体ずつ捕まえて、腹部、大腿部の腹側、四肢の指先、総排泄口周辺を滅菌綿棒 (Men-tip 1P1501, Nihon-Menbo Co. Tokyo) でそれぞれの部位の体表を10回拭った(図1)。

2-3 *B. dendrobatidis* の DNA 抽出

すべてのサンプルは同じ手順で扱われ、DNA 検査を行うまで、マイクロチューブに入れられ-28℃で保存した。PCR 検査はスワブサンプルの採材後15日以内に実施した。DNA 抽出は Lysis buffer (1mg/mL proteinaseK, 0.01 M NaCl, 0.1M EDTA, 0.01M Tris-HCl, 0.5% Nonidet P-40) にスワブサンプルを浸漬させ Vortex mixer を使って 15℃1分間攪拌した。スワブサンプルを除去後、抽出物を含むマイクロチューブをアルミバスを使って 50℃120

分、95°C 20 分間に加温した。その後、TE buffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA) にて抽出物を 10%まで希釈し、それを PCR 検査のテンプレートとして用いた。

2-4 PCR 検査

PCR 検査は Goka ら (2009) が報告した nested PCR 法を用いた (図 2)。1 回目の増幅のフォワードのプライマーは DNA Data Bank of Japan (accession number AF164302) に登録された真菌の 18S rRNA の 3'末端領域の位置にある Bd18SF1 (5'-TTT GTA CAC ACC GCC CGT CGC-3') を使って、リバースのプライマーは、(accession number AY546693) に登録される真菌の 28S rRNA 遺伝子の 5'末端領域にある Bd28SR1 (5'-ATA TGC TTA AGT TCA GCG GG-3') を使った。

そして、2 回目の増幅は、Anis ら (2004) が報告した、*B. dendrobatidis* に種特異的な、ITS1 領域からと ITS2 領域までを増幅する Bd1a (5'-CAG TGT GCC ATA TGT CAC G-3') および Bd2a (5'-CAT GGT TCA TAT CTG TCCAG-3') の 2 つのプライマーを使用して、1 回目の PCR 産物を増幅した (図 2)。

PCR 反応液は、0.5mM のプライマーに dNTP 2mM、MgCl₂ 2mM、AmpliTaq Gold[®] DNA Polymerase 1.25unit を混合した (Goka et al. 2001)。全ての PCR 試薬は、Perkin-Elmer Applied Biosystems から購入した。合計 50 μl 反応液中に 2 μl の DNA テンプレートを混合した。

1st PCR は 95°C 9 分間 1 回、94°C 30 秒、50°C 30 秒、72°C 2 分を 30 サイクル、72°C 7 分間 1 回行った。2nd PCR は、95°C 9 分間 1 回、94°C 30 秒、65°C 30 秒、72°C 30 秒を 30 サイクル、72°C 7 分間 1 回行った。

同一サンプルを複数回試験した。それぞれの解析には、陽性コントロールとして、以前に Une ら (2008) が報告したベルツノガエル (*Ceratophrys ornate*) から採取されたサンプルを用いた。また、陰性コントロールとして TE バッファーを用いた。

増幅された PCR 産物は、6%のポリアクリルアミドゲルの上で分離され、DNA 断片のバンドは UV の下で臭化エチジウム染色によって視覚化した。そして、約 300bp のフラグメントのバンドが観察されたときに、*B. dendrobatidis* が検出されたと判定した (図 3)。

2-5 DNA 塩基配列の決定

第 2 回目に増幅された PCR 産物は pT7 Blue Perfectly Blunt Cloning Kit (Novagen;EMD Bioscience) を用いてプラスミドに組み込み大腸菌に取り込ませサブクローニングを行い、3つのコロニーから、プラスミドに含まれている T7 promoter と U19 reverse プライマーを使ってサイクルシーケンス反応を行い、サイクルシーケンス反応産物を ABI3730 Sequencer (Applied Biosystems) を用いて塩基配列を決定した。

第3節 結果

3-1 *B. dendrobatidis* 陽性率および動物分類別 *B. dendrobatidis* 陽性率

両生類 820個体のスワブサンプルのうち76サンプル (9.3%) から*B. dendrobatidis*遺伝子が検出された (図4-1, 4-2, 表1)。*B. dendrobatidis*陽性の分類別 (各目) による割合は以下であった。

- ・無尾目 (Anura) : 8.9% (64/722)
- ・有尾目 (Cadata) : 12.5% (12/96)
- ・無足目 (Gymnophiona) : 0% (0/2)

*B. dendrobatidis*は13科27種の両生類から検出された。内訳は、無尾目はピパ科 (Pipidae)、ヒキガエル科 (Bufonidae)、ユビナガガエル科 (Leptodactylidae)、ヤドクガエル科 (Dendrobatidae)、アマガエル科 (Hylidae)、クサガエル科 (Hyperoliidae)、アオガエル科 (Rhacophoridae)、ヒメガエル科 (Microhylidae) の22種。有尾目はアンビストマ科 (Ambystomatidae)、プレソドン科 (Plethodontidae)、マッドパピー科 (Proteidae)、イモリ科 (Salamandridae)、サイレン科 (Sirenidae) の6種であった。

保菌率はサイレン科 (2/2)、マッドパピー科 (1/1)、プレソドン科 (4/4) がいずれも100%。アンビストマ科 28.6% (4/14)、アオガエル科 26.7% (31/116)、ピパ科20.6% (7/34) の保菌率が高かった (表2)。

3-2 由来別*B. dendrobatidis*陽性率

由来別では、輸入両生類の10.3% (56/561)、日本の飼育下両生類の6.9% (18/259) から*B. dendrobatidis*が検出された。*B. dendrobatidis*陽性個体が確認された国は、21か国中9か国で、保菌率はブリガリア、タイ、ペルー、アメリカ、ベトナム、日本、マダガスカル、タンザニア、ドイツの順に高かった (表2)。しかしながら、種とサンプル数が国の間で異なったため、原産国と種類による保菌率の傾向の統計学的有意差検定は行わなかった。

ドイツ由来の*B. dendrobatidis*陽性サンプルの種類はヤドクガエル (*Dendrobates* spp.) とイベリアトゲイモリ (*Pleurodeles waltl*) で、いずれも人工繁殖個体であった。日本の*B. dendrobatidis*陽性サンプルは、日本国内で繁殖された外来性両生類で、全てツノガエル亜科 (Ceratophryinae) とアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) であった。残りの7か国由来の両生

類は、すべて野生捕獲個体であった(表3)。

3-3 PCR産物の塩基配列およびhaplotype

27種の両生類から得られた76陽性サンプルのPCR産物の塩基配列解析に成功し、それらをGokaら (2009) の方法を使って、haplotypeを分類した。その結果、PCR産物からDNA Data Bank of Japan (DDBJ) のaccession numberに登録されている以下の11haplotypeを検出した (図4-1, 4-2, 表3)。

haplotype A (AB435211)

haplotype C (AB435213)

haplotype E (AB435214)

haplotype L (AB435222)

haplotype Q (AB435226)

haplotype V (AB435231)

haplotype Bd28 (AB723964)

haplotype Bd29 (AB723965)

haplotype Bd38 (AB723974)

haplotype Bd41 (AB723977)

haplotype Bd43 (AB723979)

*B. dendrobatidis*が検出された国のhaplotypeの内訳は、ブルガリア、ドイツ、ペルー、タンザニアはhaplotype A、マダガスカルはBd43、ベトナムはBd41、アメリカ合衆国は2つのhaplotype (A, Bd29)、タイは4つのhaplotype (A, E, L, Bd38) であった (図6)。

輸入両生類陽性サンプルの90% (52/58) をhaplotype Aが占めていた。日本の国内飼育下個体では、5つのhaplotype (A, C, Q, V, Bd28) が検出され、他国では確認されていないhaplotype Cが44% (8/18) を占めており、国内外でhaplotypeの種類と検出割合に大きな違いがあった (図7)。

*B. dendrobatidis*が検出された両生類で、脱皮の亢進、元気消失などツボカビ症の臨床徴候を呈していたものは、日本で飼育されていたツノガエル類 (*Ceratophrys* spp.) とタピオカガエル (*Lepidobatrachus laevis*) であり、それらは、haplotype Aが感染していた。輸入両生類において、

ペルー由来のミズガエル (*Telmatobius* sp.) は脱皮の亢進がみられ、この種においても、他の発症個体と同様にhaplotype Aが感染しており、この輸入ロット約30個体すべてが、検査後にツボカビ症によって死亡した (図9)。その他の種類の両生類は、*B. dendrobatidis*陽性であっても臨床上健康であった。

第4節 考察

本研究では、*B. dendrobatidis* の拡散ルートとしての商取引の位置づけを明らかにするために調査を行った。日本にペット用として輸入された外来両生類に 10.3% (58/561) の割合で *B. dendrobatidis* が感染しており、輸入される両生類を介して日本へ *B. dendrobatidis* が侵入していることが明らかになった。同様の研究が、商取引が盛んな香港で行われているが検出されなかった (Rowley et al. 2007)。また、オランダのペットフェア (Sluijs et al. 2011)、およびイギリスのペット取引を対象とした調査では (Peel et al. 2011)、*B. dendrobatidis* 保菌率は、それぞれ 2.9% (26/897)、3.2% (4/109) で低率であった。これらの報告の保菌率と本研究の結果の違いは、ドイツから輸出された両生類を除いて、ストレスを受けやすい野生捕獲個体が主体であったこと、欧米からの長い移動時間、また東南アジア地域と日本との温度差が要因として考えられた。また、本研究で用いた nested-PCR 法は、single-round PCR 法 や real-time TaqMan PCR 法と比較して、10–100 倍の感度を持ち、真菌の 0.001pg の DNA を増幅することが出来るため (Goka et al. 2009)、検出方法の違いもその要因として考えられた。

B. dendrobatidis は両生類の全ての目 (無尾目、有尾目、無足目) に感染するが、日本の野生下の両生類では、有尾目のオオサンショウウオ (*Andrias japonicus*) と、シリケンイモリ (*Cynops ensicauda*) の保菌率が高い (Goka et al. 2009)。今回の調査においても、無尾目よりも有尾目の保菌率が高く、特にアメリカ合衆国から輸入された個体の *B. dendrobatidis* 陽性 12 サンプルのうち、11 サンプルが有尾目であった。しかし、アメリカ合衆国の野生の有尾目の *B. dendrobatidis* 保菌率は、比較的低いと報告されている (Gaertner et al. 2009, Keitzer et al. 2011, Chatfield et al. 2012)。また、今回の調査でアジア (インドネシア、マレーシア、ベトナム、中国、タイ) から輸入された野生捕獲個体の *B. dendrobatidis* 保菌率は 15.9% (31/189) に達し、以前の同地域の野外調査における低い保菌率 (Kusrini et al. 2008, Savage et al. 2011, Bai et al. 2010, McLeod et al. 2008) と著しく異なっていた。さらに、日本で繁殖されたアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の *B. dendrobatidis* 保菌率は、26.9% (7/26) であり、南アフリカの野生下の *B. dendrobatidis* 保菌率 2.7% (1.7–4.2%, 95% 信頼区間) と差があった (Weldon et al. 2004)。

このように、*B. dendrobatidis* 保菌率が現地の野生下個体とペット流通あるいは飼育下繁殖個体で異なる理由として、流通過程や繁殖施設という閉鎖環境中における高密度な個体間での感染機会の上昇、野生下とは異なる環境のストレスによる免疫能の低下が考えられた。実際、養殖施

設でのメキシコサンショウウオ (*Ambystoma mexicanum*) やウシガエル (*Linobates catesbeiana*) の *B. dendrobatidis* 保菌率は、野生下の保菌率より高率であることが報告されている (Mazzoni et al. 2003, Hanselmann et al. 2004, Garner et al. 2006, Frías-Alvarez et al. 2008, Schloegel et al. 2009)。重要なことは、人工環境下における繁殖施設や流通過程では、病原体への適切な対応が不可欠で、これを怠ると、病原体の単なる移動に留まらず、増殖を促進する。OIEは、国際的に商取引されている両生類の健康基準の必要性を訴えており (OIE 2006, Schloegel et al. 2010)、この調査結果は、その趣旨を支持するものとなった。

世界的規模で生じるツボカビ症の流行機序に関して、当初2つの仮説が立てられた。新興病原体説 (Laurance et al. 1996, Skerratt et al. 2007) と常在病原体説 (Weldon et al. 2004, Morgan et al. 2007, Skerratt et al. 2007, James et al. 2009) である。そして、近年の報告によると、*B. dendrobatidis* は新興病原体である可能性が多く示唆されている (Skerratt et al. 2007, Lips et al. 2008, Murray et al. 2009, Vredenburg et al. 2010)。その理由の一つに、北アメリカ、アフリカとオーストラリアから得た35系統の *B. dendrobatidis* を対象に、マルチローカス遺伝子解析を使って遺伝的多様性および関連性を調査した研究が Morehouse らによって報告されている。この研究では、合計 5918bp に含まれる10の遺伝子座の中で、わずか5カ所の塩基で多型を検出した。この低頻度の遺伝的変異は、新興感染症の原因菌としての認識と一致する (Morehouse et al. 2003)。

本研究において得られた haplotype は、アジア地域以外の国からの *B. dendrobatidis* 陽性サンプルのうち 93% (25/27) が haplotype A であった。この知見は、アジア地域以外の国々の *B. dendrobatidis* 系統の遺伝的多様性が著しく低いことを示す (図6 8)。一方、タイの両生類からは4つの haplotype (A, E, L, Bd38)、日本は5つの haplotype (A, C, V, Q, Bd44)、ベトナムは haplotype Bd41 が検出された。これらの結果は、アジアの両生類は独特な *B. dendrobatidis* 系統をもつとされる以前の報告 (Goka et al. 2009, Farrer et al. 2011, Savage et al. 2011, Swei et al. 2011, Bai et al. 2012) と一致した。

また、*B. dendrobatidis* は、系統発生解析によって、少なくとも以下の4系統に分けられる。世界各地に流行している高病原性系統である *Bd*-GPL (Global Pandemic Lineage)、南アフリカから分離された *Bd*-CAPE、スイスのサンバガエル (*Alytes obstetricans*) より分離された *Bd*-CH、ブラジル固有系統の *Bd*-Brasil である (Farrer et al. 2011, Schloegel et al. 2012)。Haplotype A は、高病原性系統である *Bd*-GPL (Global Pandemic Lineage) に属する haplotype で

ある。南米を原産とする日本で人工繁殖されたツノガエル類 (*Ceratophrys* spp.)、マルメタピオカガエル (*Lepidobatrachus laevis*) およびペルーで野生捕獲され輸入されたミズガエル (*Telmatobius* sp.) にhaplotype Aが感染していた (図4)。それらの個体は、ツボカビ症の臨床徴候を示し、治療を受けていない群で死亡した。一方、アジア地域から検出された陽性30サンプルのうち27サンプルにhaplotype Aが感染していたにも関わらず、いずれのアジア原産種は何ら臨床症状を呈していなかった。

ツボカビ症発症の機序として、*B. dendrobatidis*の系統、宿主の免疫、外因的影響などの様々な要因が関与している (Rollins-Smith et al. 2002, Berger et al. 2004, Harris et al. 2009, Voyles et al. 2011, Farrer et al. 2011) と考えられているが、今までにアジア地域において、ツボカビ症による大量死は報告されていない (Goka et al. 2009, Savage et al. 2011, Swei et al. 2011, Bai et al. 2012, Vörös et al. 2012, Bataille et al. 2013)。本研究において、アジアを原産とする両生類から得られたhaplotypeには、高い遺伝的多様性があること、また、高病原性系統が感染しても発症が認められなかったことから、Gokaらが提唱する*B. dendrobatidis*アジア起源説 (Goka et al. 2009)を支持する結果となった。

日本で長期飼育された両生類は、haplotype数が5つ含まれ最も多く、かつ、その割合は他国のhaplotypeの状況と異なっていた。また、海外で野生捕獲され輸入された個体より保菌率は低く、haplotypeの多様性が高いことが判明した (表3, 図8)。このように、日本国内で長期飼育された両生類の*B. dendrobatidis*の多様なhaplotype相の理由として、いままでに、日本在来両生類から50 haplotypeが検出されていることから (五箇ら. 未発表データ)、流通過程や飼育施設内で、在来両生類を含めた多種類の両生類との間接的あるいは直接的接触により形成されたものと考えられた。これは、haplotype Aを除いたすべてのhaplotypeが日本在来種両生類からのみ検出されていることから裏付けられる。また、今回の調査では、日本の施設で繁殖したアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) から、この調査で最も多くの4つのhaplotype (A, C, Q, V) が検出されたことから (表3)、本種は*B. dendrobatidis*の主要なキャリアであることが支持された。

ウシガエル (*Lithobates catesbeiana*)、オオヒキガエル (*Bufo marinus*)、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の3種類は、*B. dendrobatidis*の世界的拡散の主要なキャリアとして考えられている (Daszak et al. 1999, Fisher & Garner 2007, Schloegel et al. 2012)。しかし、日本では2005年以降、ウシガエルとオオヒキガエルの輸入、また国内の移動および取引は特定外来生

物による生態系等に係る被害の防止に関する法律（外来生物法）によって制限された (Ministry of the Environment Government of Japan 2004)。そして、国内で流通しているアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) は、国内の繁殖施設で生産された個体である。したがって、これらキャリアとして考えられている3種の両生類の輸入は極めて少ない。その一方で、世界各地からペットとして輸入される外来性両生類は種、量とも急増している。両生類の世界的な移動が*B. dendrobatidis*の遺伝子プールの一助となるとされる (James et al. 2009, Farrer et al. 2011, Schloegel et al. 2012)。結論として、ペットとして輸入される外来性両生類の商取引を介して現在も*B. dendrobatidis*が日本国内に侵入していること、また、すでに日本で飼育されているペット用両生類には、*B. dendrobatidis*の不顕性感染個体が多く含まれていることが明らかとなった。

図表

[A]



[B]



図1 *B. dendrobatidis* 検出のためのサンプリング方法
滅菌綿棒 (Men-tip 1P1501, Nihon-Menbo Co. Tokyo) を用いて腹部, 大腿部の腹側 [A]、四肢の指先 [B]、総排泄口周辺の皮膚をそれぞれ 10 回擦った。

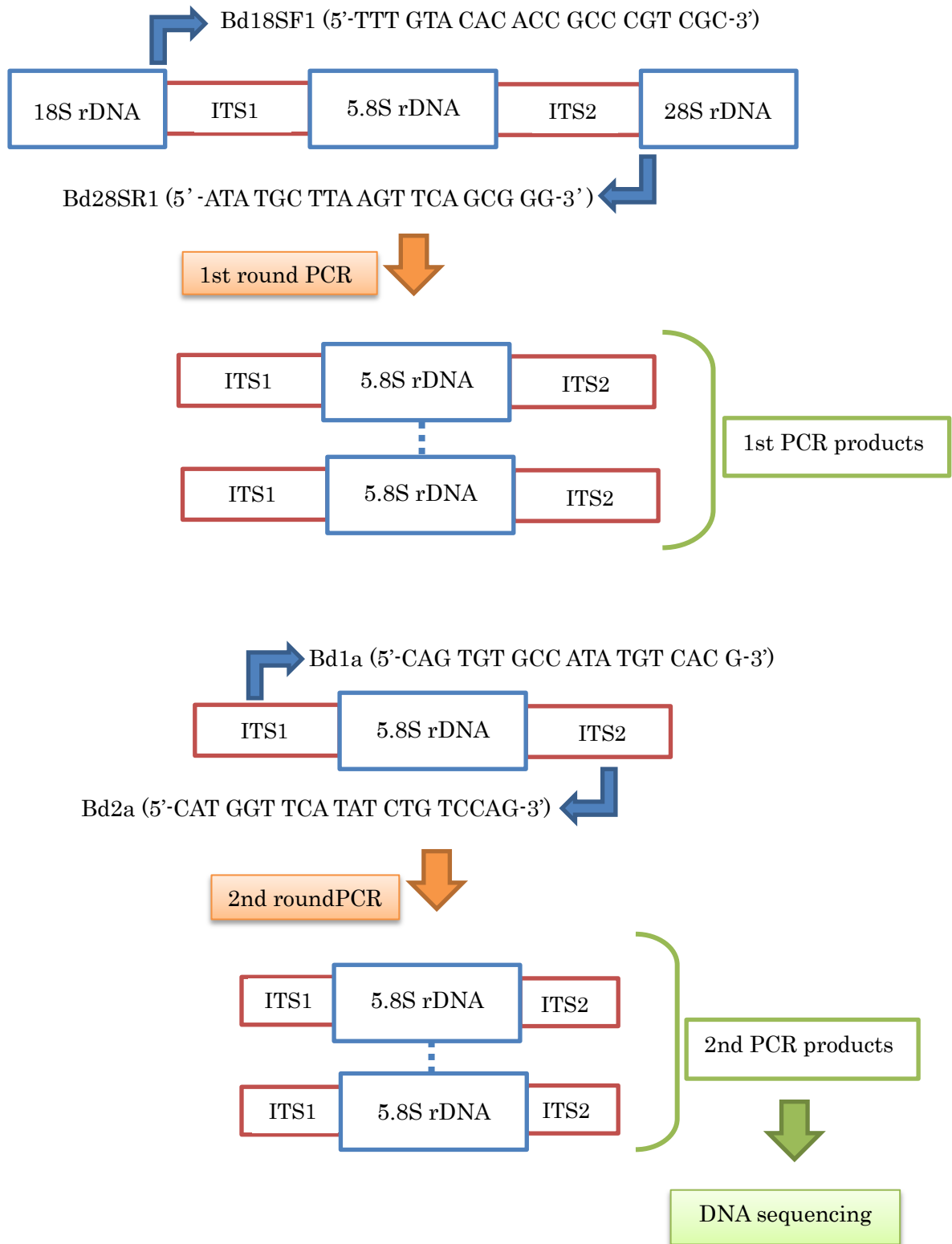


図2 本研究で用いた *B. dendrobatidis* を検出するための nested-PCR 法の原理

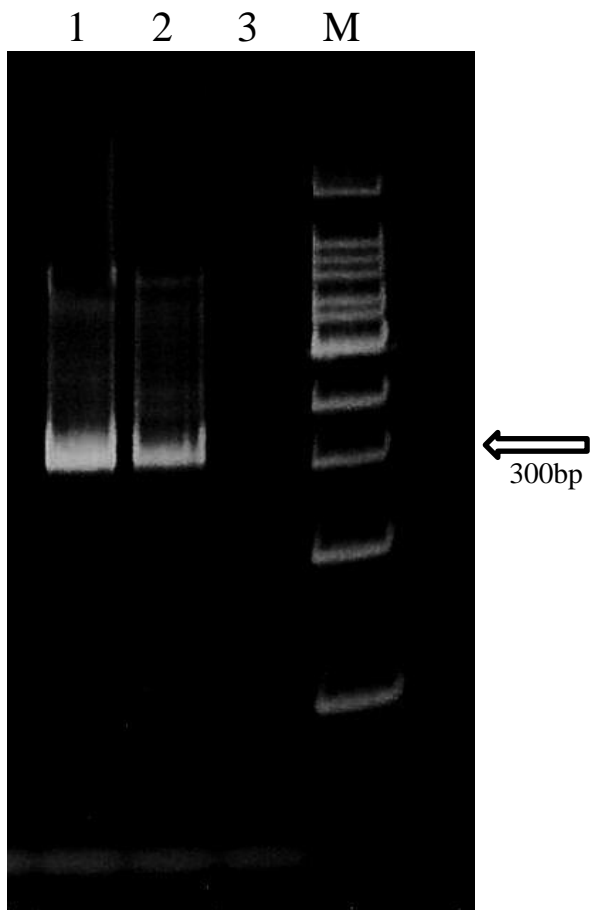


図3 *B. dendrobatidis* ITS 遺伝子の PCR 増幅産物
Lanes 1 : *B. dendrobatidis*
Lanes 2 : 陽性コントロール
Lanes 3 : 陰性コントロール
Lanes M : 100pb DNA Ladder

		10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
A (Bd01)	AB435211	AGTCGAACAAAA	TTTATTTATTTTT	TCGACAAA	TTAATTGGAAA	TTGAA	T-----	AATTTAATTGAAAAAA	TTGAAAA	TAAATATTTAAAA	CAACT
C (Bd03)	AB435213	AGTCGAACAAAA	TTTATTTATTTTT	TCGACAAA	TTAATTGGAAA	TTGAA	T-----	AATTTAATTGAAAAAA	-----	ATTGAAAA	TAAAACAACT
E (Bd05)	AB435214	AGTCGAACAAAA	TTTATTTATTTTT	TCGACAAA	TTAATTGGAAA	TTGAA	T-----	AATTTAATTGAAAA	-----	TAAATATTTAAAA	CAACT
L (Bd12)	AB435222	AGTCGAACAAA	TTTATTTGTTTT	TCGACAAA	TTAATTGGAAA	TGATTT	T-----	AATTTAATCCAAAAA	-----	TATAT	TAAAACAACT
Q (Bd17)	AB435226	AGTCGAACAAAA	TTTATTTATTTTT	TCGACAAA	TTAATTGGAAA	TTGAA	TGATTTT	AATTTAATTGAAAAAA	-----	AATGAA	AAATAAAAACAACT
V (Bd22)	AB435231	AGTCGAACAAAA	TTTATTTATTTTT	TCGACAAA	TTAATTGGAAA	TTGAA	T-----	GATTTAATTGAAAAAA	-----	TTGAAAA	TAAAACAACT
Bd28	AB723964	AGTCGAACAAAA	TTTATTTATTTTT	TCGACAAA	TTAATTGGAAA	TTGAA	TGATTTT	AATTTAATTGAAAAAA	TTGAAAA	TAAATATTTAAAA	CAACT
Bd29	AB723965	AGTCGAACAAAA	TTTATTTATTTTT	TCGACAAA	TTAATTGGAAA	TTGAA	TGATTTT	AATTTAATTGAAAAAA	TTGAAAA	TAAATATTTAAAA	CAACT
Bd38	AB723974	AGTGGACAAAA	TTTATTTATTTTT	TGGACAAA	TTAATTGGAAA	TTGAA	T-----	AATTTAATTGAAAAAA	TTGAAAA	TAAATATTTAAAA	CAACT
Bd41	AB723977	AGTCGAACAAAA	TTTATTTATTTTT	TCGACAAA	TTAATTGGAAA	TGATTT	T-----	TATTTAATTGAAAAAA	TTGAAAA	TAAATATTTAAAA	CAACT
Bd43	AB723979	AGTCGAACAAAA	TTTATTTATTTTT	TCGACAAA	TTAATTGGAAA	TTGAA	T-----	AATTTAATTGAAAAAA	TTGAAAA	TAAATATTTAAAA	CAACT

		110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
A (Bd01)	AB435211	TTTGACAACGGAT	CTCTTGGCTCT	CGCAACGAT	GGAAGAACGCAG	CGAAATGCGAT	ACGTAATGTGAA	TTGCAAACCT	TTTGTGAATCA	TTAAATCTTT	GAA
C (Bd03)	AB435213	TTTGACAACGGAT	CTCTTGGCTCT	CGCAACGAT	GGAAGAACGCAG	CGAAATGCGAT	ACGTAATGTGAA	TTGCAAACCT	TTTGTGAATCA	TTAAATCTTT	GAA
E (Bd05)	AB435214	TTTGACAACGGAT	CTCTTGGCTCT	CGCAACGAT	GGAAGAACGCAG	CGAAATGCGAT	ACGTAATGTGAA	TTGCAAACCT	TTTGTGAATCA	TTAAATCTTT	GAA
L (Bd12)	AB435222	TTTGACAACGGAT	CTCTTGGCTCT	CGCAACGAT	GGAAGAACGCAG	CGAAATGCGAT	ACGTAATGTGAA	TTGCAAACCT	TTTGTGAATCA	TTAAATCTTT	GAA
Q (Bd17)	AB435226	TTTGACAACGGAT	CTCTTGGCTCT	CGCAACGAT	GGAAGAACGCAG	CGAAATGCGAT	ACGTAATGTGAA	TTGCAAACCT	TTTGTGAATCA	TTAAATCTTT	GAA
V (Bd22)	AB435231	TTTGACAACGGAT	CTCTTGGCTCT	CGCAACGAT	GGAAGAACGCAG	CGAAATGCGAT	ACGTAATGTGAA	TTGCAAACCT	TTTGTGAATCA	TTAAATCTTT	GAA
Bd28	AB723964	TTTGACAACGGAT	CTCTTGGCTCT	CGCAACGAT	GGAAGAACGCAG	CGAAATGCGAT	ACGTAATGTGAA	TTGCAAACCT	TTTGTGAATCA	TTAAATCTTT	GAA
Bd29	AB723965	TTTGACAACGGAT	CTCTTGGCTCT	CGCAACGAT	GGAAGAACGCAG	CGAAATGCGAT	ACGTAATGTGAA	TTGCAAACCT	TTTGTGAATCA	TTAAATCTTT	GAA
Bd38	AB723974	TTTGACAACGGAT	CTCTTGGCTCT	CGCAACGAT	GGAAGAACGCAG	CGAAATGCGAT	ACGTAATGTGAA	TTGCAAACCT	TTTGTGAATCA	TTAAATCTTT	GAA
Bd41	AB723977	TTTGACAACGGAT	CTCTTGGCTCT	CGCAACGAT	GGAAGAACGCAG	CGAAATGCGAT	ACGTAATGTGAA	TTGCAAACCT	TTTGTGAATCA	TTAAATCTTT	GAA
Bd43	AB723979	TTTGACAACGGAT	CTCTTGGCTCT	CGCAACGAT	GGAAGAACGCAG	CGAAATGCGAT	ACGTAATGTGAA	TTGCAAACCT	TTTGTGAATCA	TTAAATCTTT	GAA

図 4-1 本研究で9か国から検出された 11 の *B. dendrobatidis* haplotype の ITS1 5.8s ITS2 rDNA 遺伝子配列

	210	220	230	240	250	260
A (Bd01) AB435211	CGCACATTGCACTCGTAAAAGAGTATACATGTTTGAGAA	TTATAAAAA	TACATTGTCCGAATTGA			
C (Bd03) AB435213	CGCACATTGCACTCGTAAAAGAGTATACATGTTTGAGAA	TTATAAAAA	TACATTGTCCGAATTGA			
E (Bd05) AB435214	CGCACATTGCACTCGTAAAAGAGTATACATGTTTGAGAA	TTATAAAAA	TACATTGTCCGAATTGA			
L (Bd12) AB435222	CGCACATTGCACTCGTAAAAGAGTATACATGTTTGAGAA	TTATAAAAA	TACATTGTCCGAATTGA			
Q (Bd17) AB435226	CGCACATTGCACTCGTAAAAGAGTATACATGTTTGAGAA	TTATAAAAA	TACATTGTCCGAATTGA			
V (Bd22) AB435231	CGCACATTGCACTCGTAAAAGAGTATACATGTTTGAGAA	TTATAAAAA	TACATTGTCCGAATTGA			
Bd28 AB723964	CGCACATTGCACTCGTAAAAGAGTATACATGTTTGAGAA	TTATAAAAA	TACATTGTCCGAATTGA			
Bd29 AB723965	CGCACATTGCACTCGTAAAAGAGTATACATGTTTGAGAA	TTATAAAAA	TACATTGTCCGAATTGA			
Bd38 AB723974	CGCACATTGCACTCGTAAAAGAGTATACATGTTTGAGAA	TTATAAAAA	TACATTGTCCGAATTGA			
Bd41 AB723977	CGCACATTGCACTCGTAAAAGAGTATACATGTTTGAGAA	TTATAAAAA	TACATTGTCCGAATTGA			
Bd43 AB723979	CGCACATTGCACTCGTAAAAGAGTATACATGTTTGAGAA	TTATAAAAA	TACATTGTCCGAATTGA			

図 4-2 本研究で 9 か国から検出された *B. dendrobatidis* ITS1 5.8s ITS2 リボゾーマル DNA 遺伝子配列

表1 本研究において2008年から2011年にかけて*B. dendrobatidis*の感染状況を調べるために検査を行った飼育下および輸入された両生類

目	科	種	サンプル数	<i>Bd</i> ¹⁾ 陽性数	原産国 (<i>Bd</i> 陽性数/サンプル数)
無尾目	Discoglossidae	<i>Bombina orientalis</i>	2	0	China (2)
Anura	Pipidae	<i>Xenopus laevis</i>	26	7	Japan (7/26)
		<i>Pipa pipa</i>	6	0	Suriname (6)
		<i>Hymenochirus boettgeri</i>	2	0	Indonesia (2)
	Pelobatidae	<i>Scaphiopus couchii</i>	2	0	USA (2)
		<i>Brachytarsophrys calinensis</i>	1	0	China (1)
		<i>Megophrys nasuta</i>	1	0	Malaysia (1)
	Bufonidae	<i>Bufo japonicus formosus</i>	11	0	Japan (11)
		<i>Bufo debilis</i>	2	0	USA (2)
		<i>Bufo viridis</i>	5	0	Ukraine (5)
		<i>Bufo alvarius</i>	1	1	USA (1/1)
		<i>Bufo torrenticola</i>	1	0	Japan (1)
		<i>Bufo terrestris</i>	1	0	USA (1)
	Myobatrachidae	<i>Limnodynastes salmini</i>	1	0	Germany (1)
	Leptodactylidae	<i>Ceratophrys cornuta</i>	8	1	Japan (1/1) , Suriname (7)
		<i>Ceratophrys cranwelli</i>	48	3	Germany (3), Japan (3/44) , USA (1)
		<i>Ceratophrys ornata</i>	70	3	Japan (3/69) , USA (1)
		<i>Ceratophrys sp.</i>	11	1	Japan (1/11)
		<i>Chacophrys pierotti</i>	7	1	Japan (1/7)
		<i>Lepidobatrachus laevis</i>	10	2	Canada (2), Japan (2/8)
		<i>Odontophrynus sp.</i>	3	0	Paraguay (3)
		<i>Telmatobius sp.</i>	1	1	Peru (1/1)
	Dendrobatidae	<i>Dendrobates auratus</i>	33	0	Germany (16), Canada (15), Japan (2)
		<i>Dendrobates azureus</i>	21	0	Denmark (1), Germany (20)
		<i>Dendrobates benedicta</i>	1	1	Germany (1/1)
		<i>Dendrobates favovittatus</i>	1	0	Germany (1)
		<i>Dendrobates fantasticus</i>	7	0	Germany (7)
		<i>Dendrobates imitator</i>	6	1	Germany (1/6)
		<i>Dendrobates lamasi</i>	5	0	Germany (5)
		<i>Dendrobates leucomelas</i>	9	0	Germany (9)
		<i>Dendrobates lugubris</i>	2	0	Germany (2)
		<i>Dendrobates mysteriosus</i>	1	0	Germany (1)
		<i>Dendrobates pumilio</i>	5	0	Germany (5)
		<i>Dendrobates terribilis</i>	6	0	Germany (6)
		<i>Dendrobates reticulatus</i>	3	1	Germany (1/3)
		<i>Dendrobates tinctorius</i>	14	0	Germany (14)
		<i>Dendrobates truncatus</i>	1	0	Germany (1)
		<i>Dendrobates uacari</i>	1	0	Germany (1)
		<i>Dendrobates vanzolini</i>	6	1	Germany (1/6)
		<i>Dendrobates variabilis</i>	4	0	Germany (4)
		<i>Dendrobates ventrimaculatus</i>	5	0	Germany (5)
		<i>Epipedobates tricolor</i>	3	0	Germany (3)
		<i>Hyloxalus azureiventris</i>	4	0	Germany (4)

前項からの続き

	<i>Phyllobates bicolor</i>	2	0	Germany (2)
	<i>Phyllobates lugublis</i>	1	0	Germany (1)
Ranidae	<i>Occidozyga lima</i>	10	0	Indonesia (10)
	<i>Pyxicephalus adspersus</i>	1	0	Tanzania (1)
	<i>Pyxicephalus edulis</i>	2	0	Tanzania (2)
Hyperoliidae	<i>Hyperolius argus</i>	2	0	Tanzania (2)
	<i>Leptopelis uluguruensis</i>	41	3	Tanzania (3/41)
	<i>Leptopelis vermiculatus</i>	14	0	Tanzania (14)
	<i>Afrixalus fornasinii</i>	1	0	Tanzania (1)
Hylidae	<i>Hyla leucophyllata</i>	1	0	Japan (1)
	<i>Agalychnis callidryas</i>	15	0	Germany (3), Nicaragua (8), USA (4)
	<i>Hyla cinerea</i>	4	0	USA (4)
	<i>Litoria caerulea</i>	52	0	Indonesia (52)
	<i>Litoria infrafrenata</i>	15	0	Indonesia (15)
	<i>Hyla crepitans</i>	4	0	Suriname (4)
	<i>Phyllomedusa bicolor</i>	4	0	Suriname (4)
	<i>Phyllomedusa sauvagii</i>	18	0	Paraguay (11), USA (7)
	<i>Phrynohyas resinifictrix</i>	9	1	Germany (1/7), Japan (2)
	<i>Hyla japonica</i>	6	0	Japan (6)
	<i>Hyla vasta</i>	6	0	Haiti (6)
	<i>Hyla gratiosa</i>	2	0	USA (2)
	<i>Pachymedusa dacnicolor</i>	4	0	USA (4)
	<i>Hyla arborea</i>	5	4	Bulgaria (4/5)
Mantellidae	<i>Mantella aurantiaca</i>	1	0	Japan (1)
	<i>Mantidactylus pulcher</i>	1	0	Madagascar (1)
Rhacophoridae	<i>Rhacophorus viridis amamiensis</i>	1	0	Japan (1)
	<i>Theلودerma asperum</i>	14	10	Thailand (10/14)
	<i>Theلودerma bicolor</i>	14	13	Thailand (13/14)
	<i>Polypedates otitophus</i>	30	0	Malaysia (30)
	<i>Theلودerma corticale</i>	8	0	Thailand (8)
	<i>Rhacophorus schlegelii</i>	2	0	Japan (2)
	<i>Nyctixalus pictus</i>	12	7	Thailand (7/12)
	<i>Rhacophorus reinwardti</i>	3	0	Thailand (3)
	<i>Rhacophorus maximus</i>	3	0	Vietnam (3)
	<i>Kurixalus verrucosus</i>	3	1	Vietnam (1/3)
	<i>Theلودerma horridum</i>	2	0	Thailand (2)
	<i>Rhacophorus arboreus</i>	24	0	Japan (24)
Microhylidae	<i>Kaloula pulchra</i>	1	0	Thailand (1)
	<i>Calluella guttulata</i>	2	0	Thailand (2)
	<i>Breviceps adspersus</i>	4	0	South Africa (1), Tanzania (3)
	<i>Scaphiophryne gottlebei</i>	2	0	Madagascar (2)
	<i>Dyscophus guineti</i>	7	0	Germany (1), Madagascar (6)
	<i>Dyscophus insularis</i>	2	0	Madagascar (2)
	<i>Scaphiophryne boribory</i>	3	1	Madagascar (1/3)
	<i>Plethodontohyla tuberata</i>	2	0	Madagascar (2)
	<i>Phrynomantis bifasciatus</i>	2	0	South Africa (2)

前項からの続き		<i>Phrynomantis microps</i>	2	0	South Africa (2)
有尾目	Sirenidae	<i>Siren lacertina</i>	2	2	USA (2/2)
Caudata	Hynobiidae	<i>Hynobius tokyoensis</i>	1	0	Japan (1)
		<i>Hynobius kimurae</i>	4	0	Japan (4)
	Proteidae	<i>Necturus maculosus</i>	1	1	USA (1/1)
	Amphiumidae	<i>Amphiuma tridactylum</i>	3	0	USA (3)
	Ambystomatidae	<i>Ambystoma mexicanum</i>	10	0	Japan (10)
		<i>Ambystoma tigrinum</i>	4	1	USA (1/4)
		<i>Ambystoma opacum</i>	6	3	USA (3/6)
		<i>Desmognathus fuscus</i>	4	4	USA (4/4)
	Plethodontidae	<i>Desmognathus fuscus</i>	4	4	USA (4/4)
Salamandridae		<i>Cynops pyrrhogaster</i>	14	0	Japan (14)
		<i>Pleurodeles waltl</i>	1	1	Germany (1/1)
		<i>Cynops orientalis</i>	5	0	China (5)
		<i>Paramesotriton chinensis</i>	5	0	China (5)
		<i>Tylotriton kweichowensis</i>	2	0	China (2)
		<i>Cynops ensicauda popei</i>	15	0	Japan (15)
		<i>Salamandra salamandra</i>	18	0	Ukraine (18)
		<i>Tylotriton shanjing</i>	1	0	China (1)
		無足目	Typhlonectidae	<i>Typhlonectes sp</i>	1
Gymnophiona	Caeciliidae	<i>Potomotyphlus kaupii</i>	1	0	Peru (1)
Total			820	76	

1) *Batrachochytrium dendrobatidis*

太文字は*B. dendrobatidis*陽性が検出された種類を示す。

表2 本研究において *B. dendrobatidis* が検出された両生類の目、科、および原産国別の保菌率

		サンプル数	<i>Bd</i> ¹⁾ 陽性数	<i>Bd</i> 保菌率 % (95%信頼区間)
無尾目	Discoglossidae	2	0	0 (0-84)
Anura	Pipidae	34	7	20.6 (0.9-38)
	Pelobatidae	4	0	0 (0-60)
	Bufoidea	21	1	4.8 (1.2-24)
	Myobatrachidae	1	0	0 (0-98)
	Leptodactylidae	158	12	7.6 (3-10)
	Dendrobatidae	141	4	2.8 (0.8-7)
	Ranidae	13	0	0 (0-25)
	Hyperoliidae	58	3	5.2 (1.1-14)
	Hylidae	145	5	3.4 (0.1-8)
	Mantellidae	2	0	0 (0-84)
	Rhacophoridae	116	31	26.7 (19-36)
	Microhylidae	27	1	3.7 (0.1-19)
有尾目	Sirenidae	2	2	100 (16-100)
Caudata	Hynobiidae	5	0	0 (0-52)
	Proteidae	1	1	100 (2.5-100)
	Amphiumidae	3	0	0 (0-70)
	Ambystomatidae	20	4	20 (5.7-44)
	Plethodontidae	4	4	100 (10-100)
	Salamandridae	61	1	1.6 (0.4-11)
無足目	Typhlonectidae	1	0	0 (0-98)
Gymnophiona	Caeciliidae	1	0	0 (0-98)
原産国	Bulgaria	5	4	80 (28-99)
	Canada	17	0	0 (0-20)
	China	16	0	0 (0-21)
	Colombia	1	0	0 (0-98)
	Denmark	1	0	0 (0-98)
	Germany	139	6	4.3 (1.6-9.2)
	Haiti	6	0	0 (0-46)
	Indonesia	79	0	0 (0-5)
	Japan	261	18	6.9 (4.6-11)
	Madagascar	16	1	6.3 (1.6-30)
	Malaysia	31	0	0 (0-11)
	Nicaragua	8	0	0 (0-37)
	Paraguay	14	0	0 (0-23)
	Peru	2	1	50 (1.3-99)
	South Africa	5	0	0 (0-52)
	Suriname	21	0	0 (0-16)
	Tanzania	64	3	4.7 (1-13)
	Thailand	56	30	53.6 (40-67)
	Ukraine	23	0	0 (0-15)
	USA	49	12	24.5 (13-39)
	Vietnam	6	1	16.7 (0.4-64)

1) *Batrachochytrium dendrobatidis*

表3 本研究において2008年から2011年にかけて*B. dendrobatidis*陽性であったサンプルの原産国、種、飼育繁殖および野生捕獲個体の区別、haplotypeとその陽性数

原産国	種類	CB/WC ¹⁾	Haplotype (<i>Bd</i> ²⁾ 陽性数)
Bulgaria	<i>Hyla arborea</i>	WC	A (4)
Germany	<i>Dendrobates benedicta</i>	CB	A (1)
	<i>Dendrobates reticulatus</i>	CB	A (1)
	<i>Dendrobates vanzolini</i>	CB	A (1)
	<i>Dendrobates imitator</i>	CB	A (1)
	<i>Phrynohyas resinificatrix</i>	CB	A (1)
	<i>Pleurodeles waltl</i>	CB	A (1)
Japan	<i>Chacophrys pierotti</i>	CB	C (1)
	<i>Ceratophrys cornuta</i>	CB	C (1)
	<i>Ceratophrys cranwelli</i>	CB	A (1), C (1), Bd28 (1)
	<i>Ceratophrys ornata</i>	CB	A (1), C (2)
	<i>Ceratophrys sp.</i>	CB	C (1)
	<i>Lepidobatrachus laevis</i>	CB	A (1), C (1)
	<i>Xenopus laevis</i>	CB	A (2), C (1), Q (1), V (3)
Madagascar	<i>Scaphiophryne boribory</i>	WC	Bd43 (1)
Peru	<i>Telmatobius sp.</i>	WC	A (1)
Tanzania	<i>Leptopelis uluguruensis</i>	WC	A (3)
Thailand	<i>Theloderma asperum</i>	WC	A (9), E (1)
	<i>Theloderma bicolor</i>	WC	A (11), L (1), Bd38 (1)
	<i>Nyctixalus pictus</i>	WC	A (7)
USA	<i>Bufo alvarius</i>	WC	A (1)
	<i>Necturus maculosus</i>	WC	A (1)
	<i>Ambystoma tigrinum</i>	WC	A (1)
	<i>Siren lacertina</i>	WC	A (2)
	<i>Ambystoma opacum</i>	WC	A (2), Bd29 (1)
	<i>Desmognathus fuscus</i>	WC	A (4)
Vietnam	<i>Kurixalus verrucosus</i>	WC	Bd41 (1)

1) CB : 飼育繁殖個体、WC : 野生捕獲個体

2) *Batrachochytrium dendrobatidis*

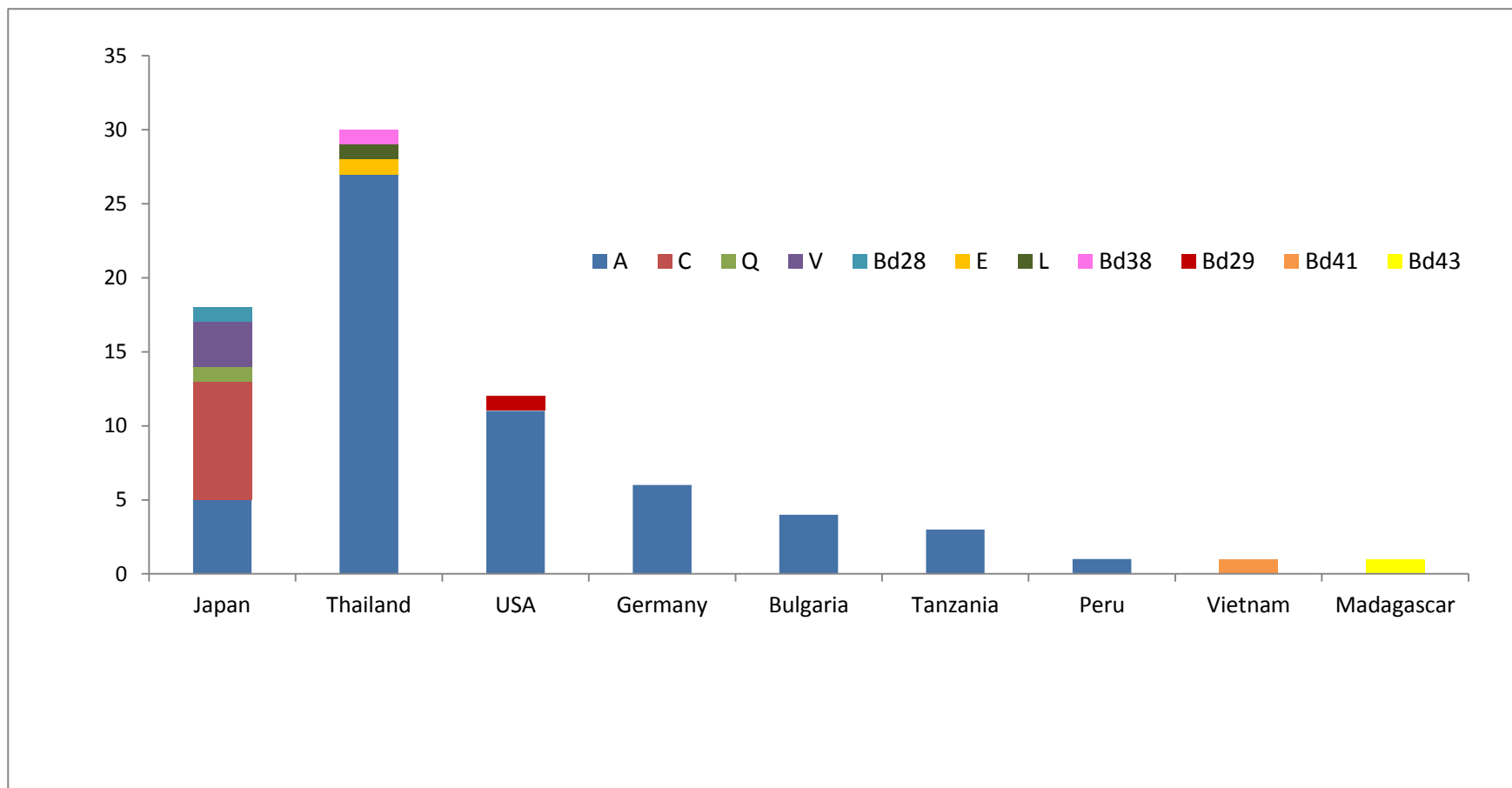


図6 本研究から得られた国別の *B. dendrobatidis* haplotype

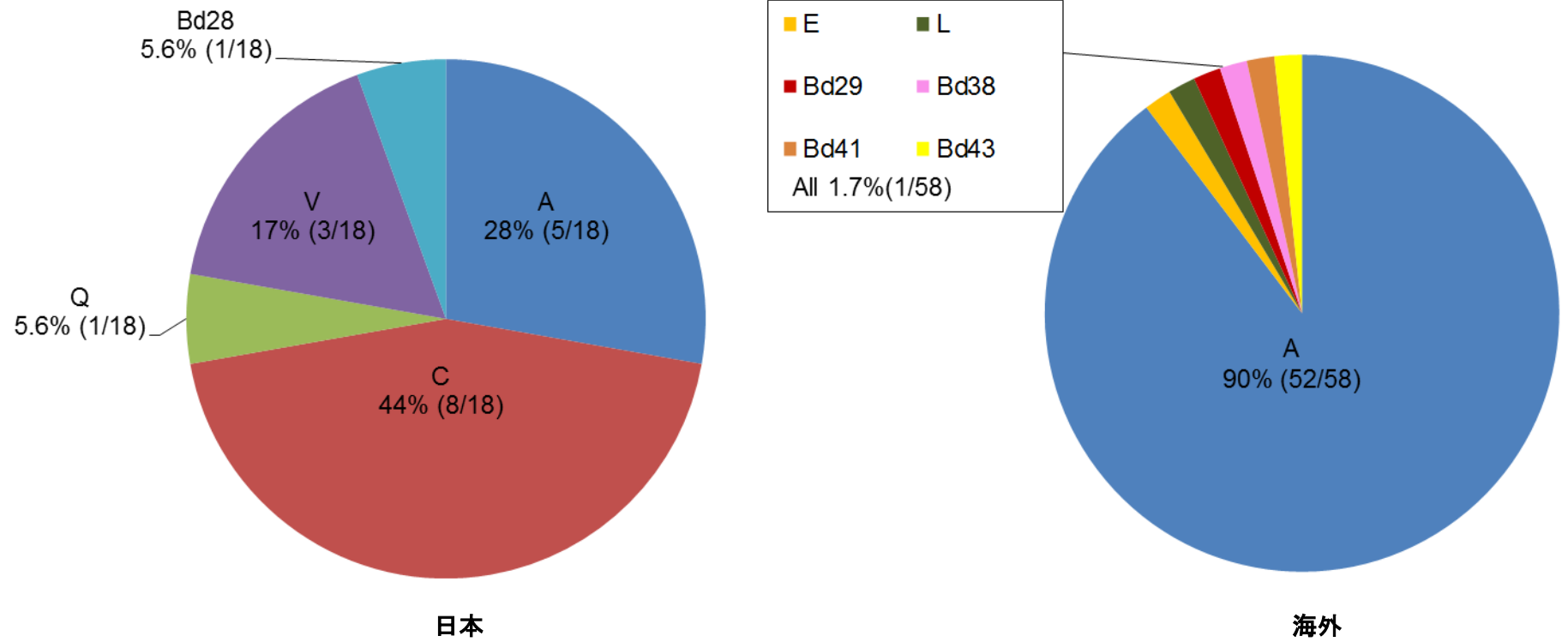
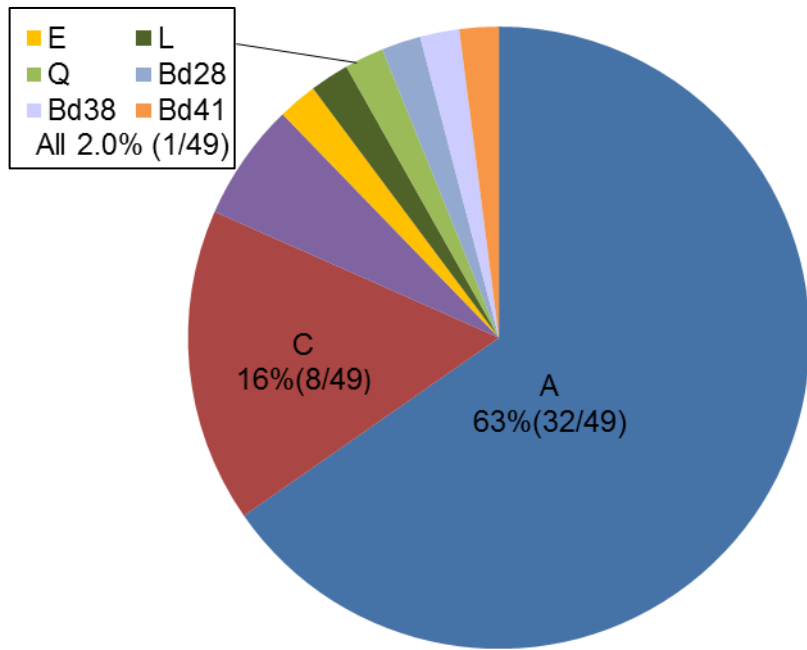
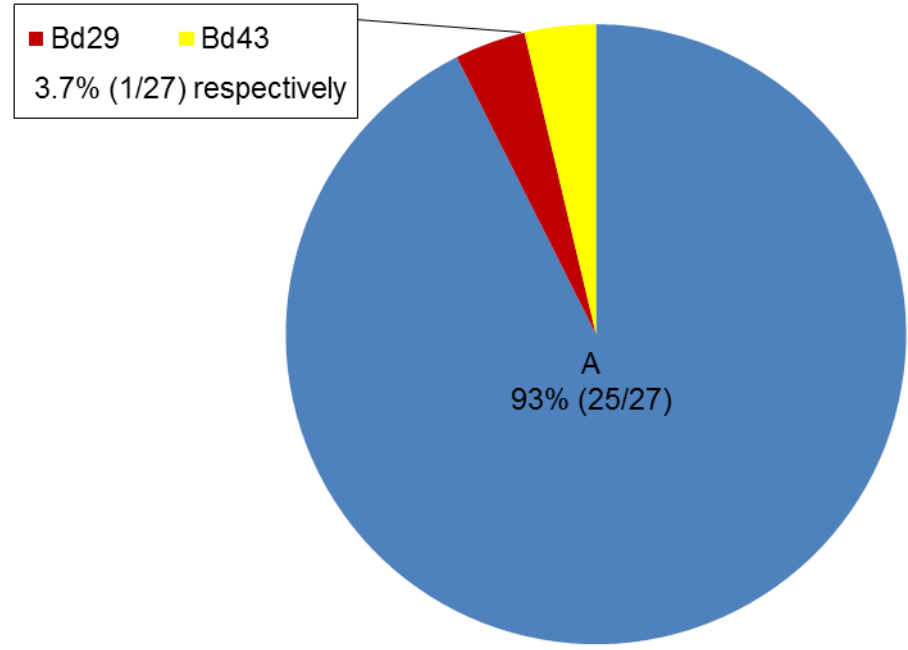


図7 本研究で得られた *B. dendrobatidis* haplotype の日本と海外 (アメリカ合衆国、ドイツ、ブルガリア、ペルー、タイ、ベトナム、マダガスカル、タンザニア) との比較



アジア諸国



その他の国

図8 本研究で得られた *B. dendrobatidis* の haplotype のアジア諸国 (日本、タイ、ベトナム) と他の国 (アメリカ、ブルガリア、マダガスカル、タンザニア) との比較

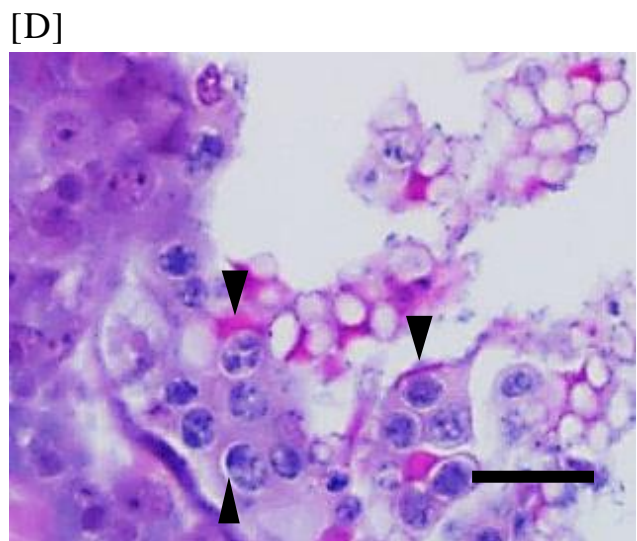
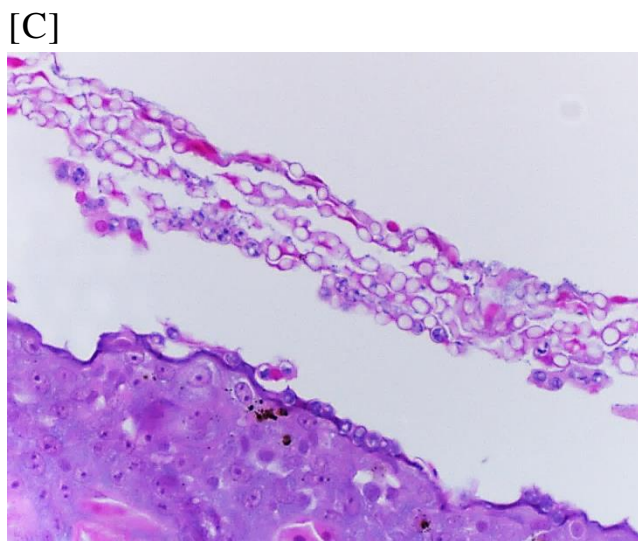


図9 ツボカビ症によって死亡したペルーから輸入されたミズガエル (*Telmatobius* sp.) とその皮膚組織

[A] 背側面。ツボカビ症の特徴的臨床症状である体表の脱皮皮が多量に付着。(Bar=10mm)

[B] 腹側面。

[C] 脱落した角質層に*B. dendrobatidis*遊走子嚢が確認された。(H.E.)

[D] 遊走子を含む遊走子嚢(矢頭)が多数観察された。(H.E.・Bar=20 μ m)

第2章 飼育下両生類の自然発生性ツボカビ症に対するイトラコナゾールを用いた治療方法の検討

第1節 序論

B. dendrobatidis は、野生下両生類に与える生態学的研究や病原体としての研究が精力的に行われているが、飼育下両生類の感染症としてのツボカビ症の研究は少なく、特に臨床症状や治療に関する報告は限られている。

2005年 IUCN は、絶滅に瀕する野生下両生類について採集、保護して飼育下で繁殖させる Amphibian Conservation Action Plan を提唱した (IUCN 2004)。また、外来性両生類はエキゾチックペットとして人気が高く、ペット産業の一部として国内のいくつかの施設において人工繁殖されている。

第1章で、ペットとして流通する外来性両生類が、一定の割合 (10.3%) で *B. dendrobatidis* を保菌し、さらに、ツボカビ症を発症している個体や大量死も確認された。*B. dendrobatidis* は、直接接触のみならず、飼育水を介して、容易に水平伝播するとともに、広く拡散し、感染源となるため、有効な除菌法や治療法の確立が欠かせない。特にツボカビ症を発症した両生類では、莫大な数の遊走子が生産、放出されることから、感染拡大を防ぐために治療法の確立は最優先で取り組む課題である。

そこで、第2章では自然発生性ツボカビ症の両生類を対象として、効果的、簡便かつ安全な治療法の確立を目的とした。まず、過去に治療報告の無い有尾目を含んだ様々な外来性両生類のツボカビ症の臨床症状の観察と容易に実施できる脱皮皮の顕微鏡による検査、PCR 検査による確定診断を行った。その後、抗真菌薬による治療実験を行った。

B. dendrobatidis の除菌法として、不顕性感染を起こしているムカシガエル的一种 (*Leiopelma archeyi*) に対し *Streptomyces venezuelae* 由来抗生物質であるクロラムフェニコールを使用した報告がある (Bishop et al. 2009)。しかし、真菌である *B. dendrobatidis* に対し抗生物質であるクロラムフェニコールの作用機序が明確にされておらず、臨床症状を示した両生類に対して、治療効果があるかどうかは定かでない。また、クロラムフェニコールは、人において、副作用として骨髄抑制による顆粒球減少、血小板減少等の重篤で致命的な血液障害の発生が報告されており、Bishop らが使用した液剤は、日本を含むいくつ

かの国外では発売停止されている (Bishop et al. 2009)。

Nichols らは *B. dendrobatidis* を実験感染させたヤドクカエル (*Dendrobates* spp.) を用いて 0.6%NaCl 溶液で 0.01%に希釈したイトラコナゾール溶液中に、1日1回5分11日間連日薬浴することで除菌に成功している (Nichols et al. 2000)。そこで、本研究では、Nichols ら (2000) の方法を変法した NaCl を使用しないイトラコナゾール 0.01%溶液を用い、治療によるストレスと薬剤影響を軽減するため薬浴回数を減じて、より簡便なプロトコルを考案し (表 5)、臨床経過および PCR 検査によりその有効性を検討した。

第2節 材料および方法

2-1 供試検体

動物病院に来院した両生類のうち脱皮の亢進、縮腫、食欲不振、神経学的異常を示すなどのツボカビ症を疑う臨床症状を呈し (図 9, 表 6)、かつ PCR 検査によって *B. dendrobatidis* 特異的遺伝子が検出された両生類をツボカビ症と確定診断した。その内訳はマルメタピオカガエル (*Lepidobatrachus laevis*) 4 個体、ツノガエル (*Ceratophrys spp.*) 3 個体、チャコガエル (*Chacophrys pierotti*) 3 個体、ナンベイウシガエル (*Leptodactylus pentadactylus*) 1 個体、タイガーサラマンダー (*Ambystoma tigrinum*) 1 個体の無尾目 5 種、有尾目 1 種の計 12 個体を研究対象とした。これらの動物の年齢は不明であったが、体重は表 6 に示す通りで、飼育開始より 3 カ月から 3 年経過していた。すべての動物は個別飼育されていた。

2-2 PCR 検査

第 1 章・第 2 節 2-2 から 2-5 と同じ方法を用いた。

2-3 顕微鏡による脱皮皮の直接鏡検法

直接鏡検法は、飼育ケージ内脱落した脱皮皮もしくは、ピンセットを用いて両生類の体表に付着する脱皮皮を採取した (図 10-1)。これを生理食塩水を 1 滴滴下したスライドガラスに伸展し、カバーガラスを載せ無染色下で脱皮皮上に観察される *B. dendrobatidis* 遊走子嚢 (図 10-2) の確認を行った (Hyatt et al. 2007, Young et al. 2007)。

2-4 イトラコナゾールによる治療プロトコル

ツボカビ症の治療薬として、イトラコナゾール (Itrazole Oral Solution 1%, Janssen Pharmaceutical K.K., Tokyo, Japan) を精製水で希釈して濃度 0.01% のイトラコナゾール溶液を作成した。本液を 230×155×150mm プラスチック製の薬浴槽に体高の約 1/3 の水深となるよう注ぎ込んだ。動物を飼育槽から薬浴槽へグローブ装着した手で移動、浸漬し薬浴を行った (図 11)。浸漬治療プロトコルは、1 回 10 分間、1 日おきに計 7 回とした (表 5)。

2-5 治療効果の判定

治療中および治療後の全観察期間中、臨床症状の変化を確認した。治療効果の判定は、脱皮亢進を主とする臨床症状の改善と直接鏡検法と nested-PCR 法の 3 つで、PCR 法は治療直後および治療終了後 20 日以上間隔を置いた後の再検査によって *B. dendrobatidis* 遺伝子が検出されないことによって判定した。

第3節 結果

浸漬治療する前、全ての動物で、PCR 検査陽性であった。治療を行う前の PCR 産物から得られた *B. dendrobatidis* ITS1-5.8S-ITS2 領域の塩基配列は DDBJ に登録されている accession number, AY997031 (haplotype A) と一致した。

臨床症状の観察

本研究に用いた両生類 12 個体のうち無尾目 11 個体全てに正常ではない脱皮の亢進があり、治療実験開始時に、飼育水中に大量の脱皮皮が浮遊していた (図 9A)。また、12 症例中、8 症例で縮腫 (図 9B)、2 症例で後躯麻痺、協調性運動失調の神経学的異常 (図 9D) が認められた (表 6)。脱皮皮を直接鏡検したところ、葡萄の房状に集合する遊走子嚢が観察された (図 10)。タイガーサラマンダー (*Ambystoma tigrinum*) では、脱皮亢進はなかったが、体色の黒化が認められた (図 12-2 左)。

治療試験中及び試験後の臨床症状

治療開始 5 日目 (薬浴 3 回目) 以降から、無尾目 10 症例 (症例 7 を除く) の飼育水中の脱皮皮が減少し、縮腫などの臨床徴候が改善された。さらに、直接鏡検法によっても、薬浴回数増加に伴って遊走子嚢の感染密度が低下し、治療終了直後には、全く遊走子嚢を観察できなくなっていた (図 12-1)。タイガーサラマンダーでは、治療前黒化していた体色は治療終了後には正常な体色へ戻った (図 12-2)。なお、供試動物中、最も体重が少なく、臨床症状が重篤であった症例 7 は治療開始 2 日後に死亡したが、体色の変化はなかった。

治療試験終了直後および試験後

11 個体の両生類について、治療終了直後および治療後 (治療後 20-57 日、平均 34.4 日) に再度 PCR 検査を実施したが、いずれの個体からも *B. dendrobatidis* 遺伝子は検出されなかった (表 6)。また、試験終了 12 カ月後では、いずれの個体もツボカビ症の発症は認められず、試験前に認められた臨床症状は改善していた (図 13)。

第4節 考察

今回の実験では、自然発生性のツボカビ症の無尾目すべてにおいて臨床症状として脱皮亢進がみられ、過去のツボカビ症の臨床症状を示す報告 (Berger et al. 1998) と一致した。そのうち、脱皮皮の直接鏡検法で *B. dendrobatidis* 遊走子嚢 (図 10) が確認できたのは 57% (4/7) であり、検出感度は PCR 法と比較して劣っていた。したがって、ツボカビ症の診断には、臨床症状と PCR 法を合わせて診断することが重要であると思われた。

本研究では、2 症例で後躯不全麻痺、協調性運動失調、縮瞳の神経学的異常が観察された (図 9B, D)。これら神経学的異常の原因は明らかではないが、ツボカビ症発症個体では、表皮を介す電解質輸送の >50% が阻害され、血漿ナトリウム、カリウム濃度はそれぞれ >20%、>50% 減少することが報告されている (Voyles et al. 2007, Voyles et al. 2009)。したがって、本研究で認められた神経学的異常はこれら血中電解質の異常が関与しているものと推察された。

Nichols らは実験的に *B. dendrobatidis* を感染させたヤドクカエルを用いて、Forzán らは、水族館の両生類にツボカビ症が流行した後の検疫として、ともに 0.6% NaCl 溶液でイトラコナゾールを 0.01% に希釈した溶液を使って 1 日 1 回 5 分 11 日間連日薬浴させ、その後、組織学的検査を用いて有用性を検討した (Nichols & Lamirande 2000, Forzán et al. 2008)。その結果、イトラコナゾールの有用性が認められた。

本実験は、自然発症個体を用いて、治療法は、Nichols らのプロトコルを基本として薬浴回数を減らし、組織学的検査より検出感度の高い nested-PCR 法を採用し、厳密な除菌効果の判定を行った。その結果、12 個体中 11 個体の治療と除菌に成功した。効果は、治療後平均 34.4 日目の再検査によって確認した。さらに、治療終了後 12 ヶ月以上が経過したが、いずれの両生類も健康状態は良好で、ツボカビ症を発症した両生類は 1 個体もない (図 13)。本法では治療開始からわずか 5 日後、すなわち、わずか 3 回の薬浴で、脱皮皮の明らかな減少傾向と臨床症状の改善が認められたことから、治療効果が高い方法と判断された。

イトラコナゾールは脂溶性のトリアゾール系化合物であり、獣医学領域では、ブラストマイセス症、ヒストプラズマ症、アスペルギルス症、カンジダ症、クリプトコッカス症および真菌性角膜炎などの真菌感染に対して使用される (Martin 1999)。イトラコナゾールは真菌細胞膜の主成分であるエルゴステロールの生合成経路においてチトクロム P450 を阻

害する (Sheehan et al. 1999)。*B. dendrobatidis* が属するツボカビ類が持つ主要なステロールもエルゴステロールであるため (Deacon 2006)、他の真菌と同様の作用機序で抗真菌作用を示すものと考えられた。

両生類に対するイトラコナゾールの副作用として、サンバガエルの一種 (*Alytes muletensis*) の幼生において皮膚の色素消失が認められ、その原因として肝毒性が示唆されている (Garner et al. 2009)。今回、7回の薬浴を行ったいずれの症例にも色素消失などの体色の変化は認められず、身体検査上、明らかな副作用は認められなかった。

なお、症例 7 は実験中に死亡した。病理学的検査が実施できず、正確な死因は明らかにできなかった。しかし、1回の薬浴後、すなわち試験開始後わずか2日目に死亡したこと、皮膚色素消失は認められなかったことを鑑みるとイトラコナゾールの副作用とは考えにくい。本症例は体重 15g と供試動物中、最も軽く幼若個体であった。加えて実験開始時すでに虚脱状態であった。*B. dendrobatidis* による皮膚の電解質調節機能の異常は、最終的に心筋の収縮不全を引き起こす (Voyles et al. 2009)。本症例は虚脱を呈していたことから、ツボカビ症末期に相当していたものと推察された。したがって虚脱状態を認める症例は、治療を行ったとしても予後は悪いと考えられた。

本研究より実施されたツボカビ症に対する治療プロトコルでは、過去報告例のない有尾目のツボカビ症でも効果が得られたことから、共同研究者の宇根有美はこの治療プロトコルを用いて、我が国の特別天然記念物であるオオサンショウウオ (*Andrias japonicus*) の *B. dendrobatidis* の除菌に成功した (Une et al. 2012)。以上より本研究によって確立した治療法は、有尾目にも適応でき、ツボカビ症に対して安全かつ効果的であると判断した。

図表

表 5 本実験で実施したツボカビ症治療プロトコル

治療前 臨床症状、PCR検査および脱皮片の直接鏡検査にてツボカビ症と診断	
1日目	0.01%イトラコナゾール溶液10分間浸漬①
2日目	無処置
3日目	0.01%イトラコナゾール溶液10分間浸漬②
4日目	無処置
5日目	0.01%イトラコナゾール溶液10分間浸漬③
6日目	無処置
7日目	0.01%イトラコナゾール溶液10分間浸漬④
8日目	無処置
9日目	0.01%イトラコナゾール溶液10分間浸漬⑤
10日目	無処置
11日目	0.01%イトラコナゾール溶液10分間浸漬⑥
12日目	無処置
13日目	0.01%イトラコナゾール溶液10分間浸漬⑦/PCR検査実施

↑

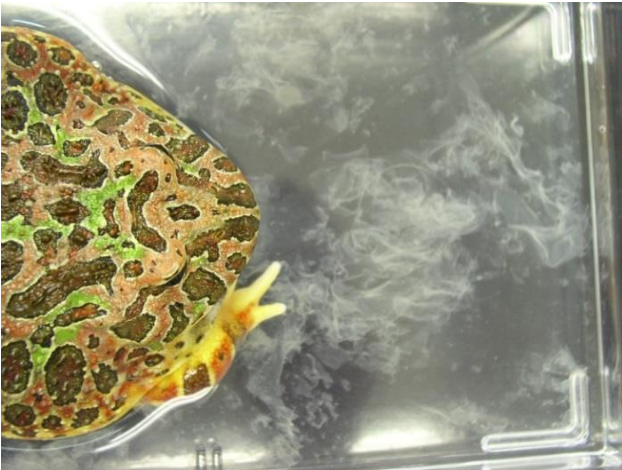
治療期間中、臨床症状
の観察及び脱皮片の直
接鏡検

↓

治療後、20日以上間隔（平均34.4日）を置いた後、再度PCR検査実施

イトラコナゾール (Itrazole Oral Solution 1%, Janssen Pharmaceutical K.K., Tokyo, Japan) を精製水で希釈して濃度 0.01%のイトラコナゾール溶液を作成。薬浴は、1回 10分間、1日おきに計7回とした。

[A]



[B]



[C]



[D]



図9 ツボカビ症を発症した外来性両生類の臨床症状

[A] 症例5 ベルツノガエル (*Ceratophrys ornata*)

飼育水中に多数の脱皮の脱落が認められる。

[B] 症例8 チャコガエル (*Chacophrys pierotti*)

全身性浮腫と縮腫が認められる。

[C] 症例11 ナンベイウシガエル (*Leptodactylus pentadactylus*)

閉瞼し、沈鬱状態である。

[D] 症例11 ナンベイウシガエル (*Leptodactylus pentadactylus*)

ひっくり返しても元に戻れない神経学的異常が認められた。

表 6 自然発生性ツボカビ症と診断された 6 種 12 個体の両生類の臨床症状と検査結果

症例	種類	体重 (g)	臨床徴候			治療前検査		治療終了時	再検査	
			脱皮亢進	縮瞳	食欲低下	その他	PCR 検査	直接法	PCR 検査	PCR 検査 (日) ^{b)}
1	<i>Lepidobatrachus laevis</i>	142	+			後肢不全麻痺	P	ND	N	N (29)
2	<i>Lepidobatrachus laevis</i>	129	+				P	P	N	N (30)
3	<i>Lepidobatrachus laevis</i>	120	+				P	ND	N	N (29)
4	<i>Lepidobatrachus laevis</i>	86	+				P	P	N	N (30)
5	<i>Ceratophrys ornata</i>	68	+	+			P	N	N	N (30)
6	<i>Ceratophrys</i> sp.	55	+	+			P	ND	N	N (29)
7	<i>Ceratophrys ornata</i> ^{a)}	15	+	+	+	虚脱	P	P		
8	<i>Chacophrys pierotti</i>	80	+	+		全身性浮腫	P	P	N	N (31)
9	<i>Chacophrys pierotti</i>	78	+	+	+		P	ND	N	N (29)
10	<i>Chacophrys pierotti</i>	68	+	+			P	N	N	N (30)
11	<i>Leptodactylus pentadactylus</i>	31	+	+	+	体表の光沢化 協調性運動失調	P	ND	N	N (20)
12	<i>Ambystoma tigrinum</i>	111		+	+	体色の黒化	P	N	N	N (57)

+ : あり, P: 陽性, N : 陰性, ND : 検査なし a) : 実験 2 日目に死亡, b) : 治療終了後から再検査までの日数



図 10-1 ツボカビ症の体表に付着する脱皮皮のサンプリング
肥厚した脱皮片が確認できる。

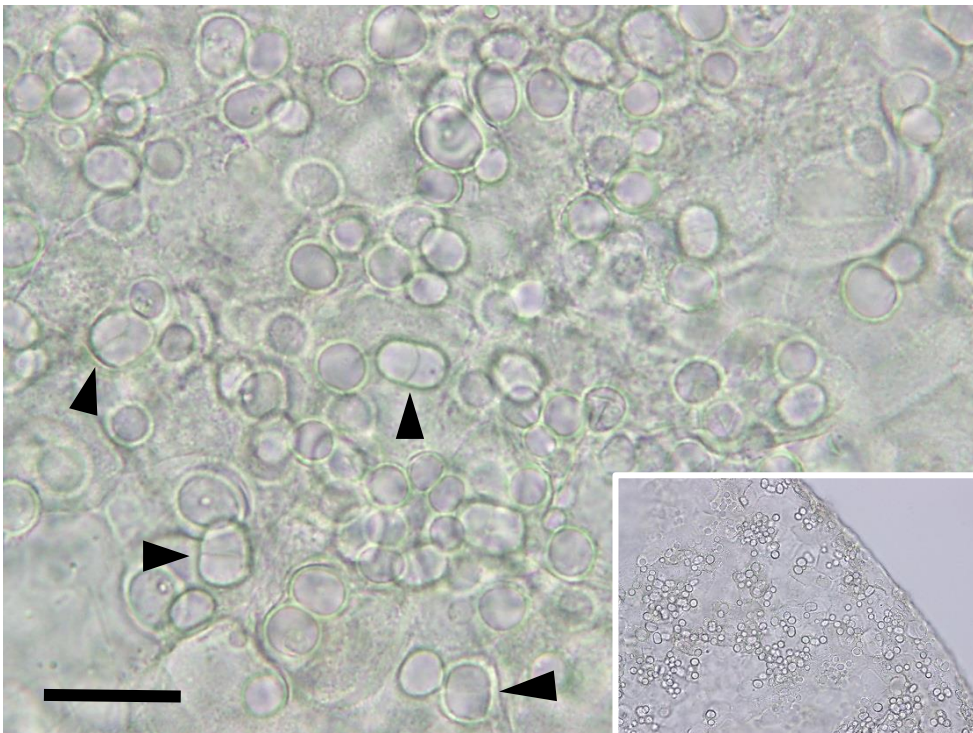


図 10-2 *B. dendrobatidis* 遊走子嚢 (ウエットマウント・無染色・Bar=20 μ m)
矢頭はツボカビ類に特徴である有隔葉状体。挿入図は弱拡大 ($\times 10$)。脱皮皮上に葡萄房状の円形構造が確認できる。

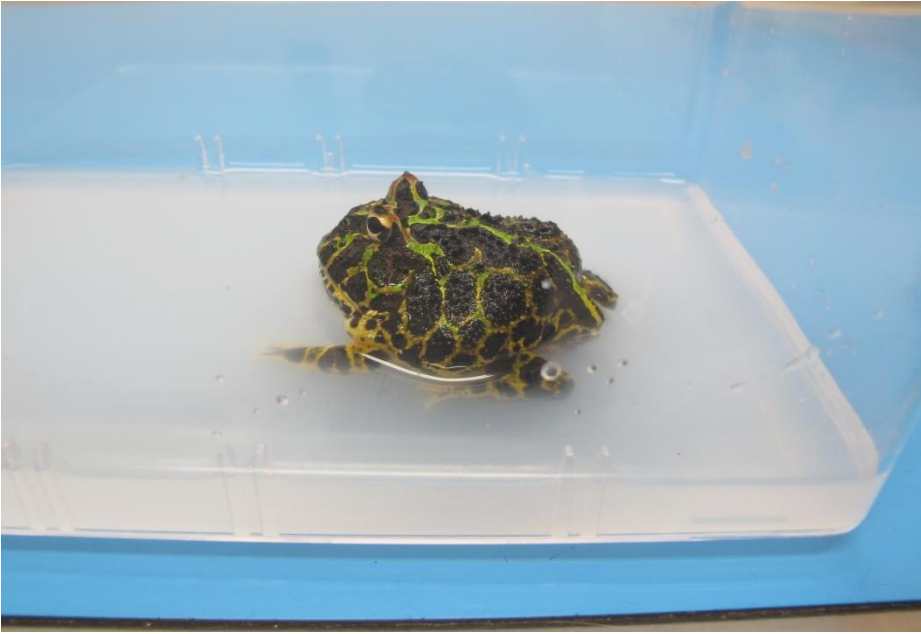


図 11 0.01%イトラコナゾール溶液によるツボカビ症の薬浴治療方法

両生類の体高の 1/3 程度の深さとなるように 0.01%イトラコナゾール溶液に浸漬させる。

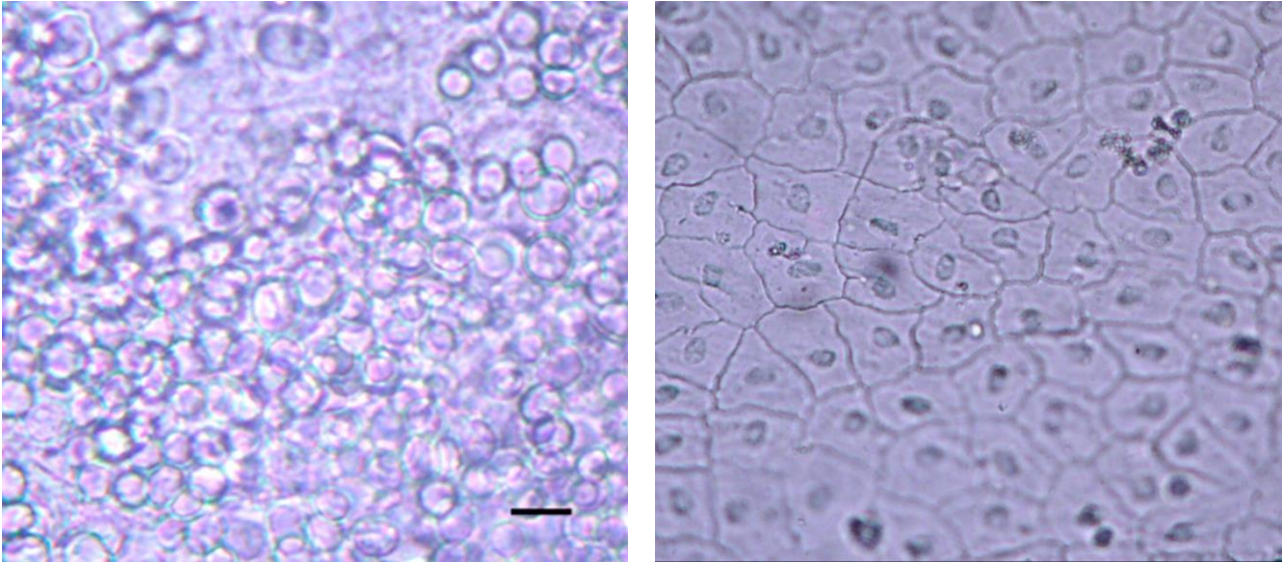


図 12-1 症例 5 ツボカビ症脱皮皮の薬浴治療前 (左) および治療後 (右) (Bar=10 μ m)

治療前には多数の *B. dendrobatidis* 遊走子嚢 (右)が確認されるが、7回の薬浴後には、遊走子嚢は確認されなかった。



図 12-2 ツボカビ症のタイガーサラマンダー (*Ambystoma tigrinum*) の治療前 (左) および治療後 (右)

治療前は黄紋部が黒ずんでいるのに対し、治療後は健康時と同じ鮮やかな黄色に変化した。

[A]



[B]



図 13 ツボカビ症の治療 12 カ月後の症例 8 および 11

[A] 症例 8 チャコガエル (*Chacophrys pierotti*)

図 9B で認められた縮腫および全身性浮腫は改善している。

[B] 症例 11 ナンベイウシガエル (*Leptodactylus pentadactylus*)

図 9C, D で認められた沈鬱および協調性運動失調は認められない。

第3章 *B. dendrobatidis* 除菌のための銅イオン (Cu^{2+}) の有効性の検討

Cu^{2+} によるアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) への影響に関する評価

第1節 序論

第2章では、自然発生性のツボカビ症の症例に対し、抗真菌薬であるイトラコナゾール0.01%溶液を用いて、臨床症状を示した両生類5種12個体を用いて治療効果の有効性を検討し、無尾目および有尾目のツボカビ症の治療法の確立に成功した。この研究では、高価ではあるが、高い除菌効果が期待できる人体用の薬剤を、動物を小型の個別容器に入れ、確実に薬浴するとともに、薬剤量を最小量にすることで、低コスト化を図った。これは、地上性の両生類を供試動物とすることで実現した。

本章では、*B. dendrobatidis* のキャリアとして重要視されている (Weldon et al. 2007) アフリカツメガエル (*Xenopus laevis* ; 以下ツメガエル) に不顕性感染する *B. dendrobatidis* の除菌を目的として実験を計画した。ツメガエルは現在、発生学、遺伝学などの研究分野においては欠かせない重要な実験動物となっており、日本国内でも研究施設等、様々な施設で非常に多くの個体が飼育されている。

我が国で飼育されるツメガエルにおいて、共同研究者の宇根有美らは、PCR検査および病理学的検査によって高率に *B. dendrobatidis* を保菌していることを報告した (宇根 2007)。また、第1章の研究においても、日本で繁殖されたツメガエルの *B. dendrobatidis* 保菌率は、26.9% (7/26) であり、国内飼育下両生類でもっとも高い保菌率を示した。しかしながら、ツメガエルの *B. dendrobatidis* に対する除菌法の報告は無く、わが国においても保菌動物としての対応はなされていない。

B. dendrobatidis 除菌について、他種において新規導入個体の検疫方法として、いくつかの方法が報告されている。アカメアメガエル (*Litoria chloris*) を用いた実験では、*B. dendrobatidis* は 28°C以上で増殖を停止し、37°Cで不活化されることから、37°Cの環境下に置くことで除菌する方法 (Woodhans et al. 2003) がある。しかし、この方法は高温飼育に適さないツメガエルへの適応は難しい。また、ツメガエルの近縁種であるネッタイツメガエル (*Silurana tropicalis*) に対し、ホルマリン、マラカイトグリーンを用いた除菌の報告がある (Parker et al. 2002)。しかし、それらの薬物は毒性が強く催奇形性を有する問題が指摘さ

れている (Sundarrajan et al. 2001)。第 2 章で用いた抗真菌薬イトラコナゾールは、除菌効果は高いが高価であるため、完全水棲かつ多頭飼育されるツメガエルなどの両生類には、作業の煩雑さはもとより、費用の面で適用できない。そのため、ツメガエルが保菌する *B. dendrobatidis* に対して、安全かつ容易で安価な除菌方法の開発が望まれる。

水産分野において、細菌・真菌性疾患に対して銅イオン (Cu^{2+}) を用いた対策が試みられている (玉城ら. 2007, 藤本ら. 2007)。魚卵に発生する *Saprolegnia* は、 $\text{Cu}^{2+}0.006$ ppm で遊走子の発芽を抑制される結果が得られている (三浦ら. 2005)。また、硫酸銅によって魚類に感染する真菌、*Achlya flagellate*、*A. racemosa*、*Saprolegnia hypogyna*、*S. megasperma* の発育が抑制された (Bailey 1984)。そして、共同研究者の宇根有美らは、*B. dendrobatidis* の培養株を使って、in vitro において Cu^{2+} が *B. dendrobatidis* に与える影響を評価し、 $\text{Cu}^{2+}1$ ppm で増殖抑制がおき、5 ppm 以上で増殖を阻止できることを明らかにした。

Cu^{2+} は、微量作用とよばれる殺菌効果を有することが知られており、微生物に作用するメカニズムとして、付着することで細胞壁 (細胞膜) を破壊し、①酵素やタンパク質と結合し活性を低下させ代謝機能を阻害する。②銅イオンの触媒作用により付近の酸素の一部を活性酸素化して微生物中の有機物を分解する。その結果として微生物を死滅させる作用があると考えられている (Yasuyuki et al. 2010, Codiță et al. 2010, 岸田ら. 2013)。しかし、一定濃度以上含まれる Cu^{2+} 溶液は、魚類に対して毒性を示し、また、過剰な Cu^{2+} 摂取は、哺乳類である牛、水牛に対して肝障害を引き起こす (Gardner & LaRoche 1973, Minervino et al. 2009)。しかし、両生類に対する Cu^{2+} の影響を調査した報告ない。

そこで、第 3 章では、 Cu^{2+} を用いたツメガエルの *B. dendrobatidis* の除菌方法の確立を目的として、 Cu^{2+} がツメガエルに与える影響を身体的変化の観察 (飼育水の変化を含む)、半数致死時間 (LT_{50}) の計測、血液化学検査、および Cu^{2+} がツメガエルの皮膚に与える影響を病理組織学的に評価した。実験 I では、ツメガエルの Cu^{2+} に対する耐久可能な濃度の見当を立てるため、 Cu^{2+} 濃度を調節した実験水槽にツメガエルを浸漬し LT_{50} を調べた。実験 II では、実験 I の成績をもとに濃度域を推察し、濃度域をより詳細に設定し、試験期間を延長することで長期期間生存可能な濃度の設定を目的として実施した。

第2節 材料および方法

銅溶液（銅標準液：和光）を用いて異なる Cu^{2+} 濃度の浸漬用水槽を作成した。 Cu^{2+} 濃度測定には ICP-MS 質量分析装置 SPQ9000（セイコー・ナノテクノロジー株式会社）を用いた。飼育水の水素イオン濃度（pH）は、以下に示す。使用した銅溶液（銅標準液：和光）は、 0.1mmol/L の HNO_3 を含む溶液である。よって、飼育水の pH は電離度 1 として以下の計算式で算出した。



$$[\text{H}^+] = 2 \times \frac{x \times 10^{-3}}{63.5}$$

$$\text{PH} = -\log[\text{H}^+] \text{ より}$$

$$= -\log \times \frac{2 \times x \times 10^{-3}}{63.5} \quad \text{※ } x \text{ は、飼育水の } \text{Cu}^{2+} \text{濃度 (ppm)}$$

よって、

$$\text{飼育水の pH : } 0.2 \text{ ppm} = \text{pH } 5.2$$

$$0.5 \text{ ppm} = \text{pH } 4.8$$

$$20 \text{ ppm} = \text{pH } 3.2$$

ツメガエルを各 Cu^{2+} 濃度の水槽に放流し身体的変化を記録した。また、 LT_{50} の計測し、各群生存個体から採血を行い、血液生化学検査を行い血漿成分に与える影響を検討した。採血には、1% MS-222 (Ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate 98%, Sigma Aldrich) 溶液に浸漬し全身麻酔を施した後、開腹し心臓採血を行った。半数が死亡しなかった群では、浸漬終了時に全身麻酔後、同様に採血を行った。採血には、ヘパリン（ヘパリンナトリウム注射液 10,000 単位、田辺製薬）処理を行った 1ml 注射器と 25G 注射針を用いた。

血漿生化学検査にはドライケミストリー法血液化学分析装置（富士ドライケム 3500V・フジフィルムメディカル）を用い、各群の個体から得た検査結果値の平均および標準誤差 (SE) を算出した。

実験 I および II の対照群から得られた健康なツメガエルの血漿生化学数値の平均値、標準偏差 (SD)、基準値（第 1 四分位数－第 3 四分位数）を算出した。また、各項目は、対照群の血漿生化学検査数値と各濃度群から得られた値を Student-t 検定を行い統計解析を行った。有意水準は 5% とした。

死亡した個体及び実験終了後に安楽殺したツメガエルを中性緩衝ホルマリンで24時間以上浸漬固定し、定法に従ってパラフィン包埋を行い3-4 μ の皮膚組織切片を作成、その後、ヘマトキシリンエオジン染色(H.E.)を行い、Cu²⁺が皮膚組織に与える影響を評価した。

各試験を行ったCu²⁺濃度および条件は以下の通りである。

実験 I

2-1-1 供試動物およびCu²⁺濃度

- ・ ツメガエル (体重, 雄: 40-52 g, 雌: 90-121 g)
- ・ 対照群 1: 7 個体 (雄 4, 雌 3)
- ・ 0.02 ppm 群: 4 個体 (雄 2, 雌 2)
- ・ 3.44 ppm 群: 4 個体 (雄 2, 雌 2)
- ・ 19.68 ppm 群: 4 個体 (雄 2, 雌 2)

2-1-2 Cu²⁺がツメガエルに与える評価項目

- ・ ツメガエルの身体的変化及び飼育水の変化
- ・ LT₅₀の計測
- ・ 血液生化学検査:
赤血球容積比率 (PCV)、血糖値 (Glu)、血中尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (Cre)、
グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ (GPT)、グルタミン酸オキサロ酢酸
トランスアミナーゼ (GOT)、アルカリフォスファターゼ (ALP)、アルブミン
(Alb)、総蛋白 (TP)、カルシウム (Ca)、リン (P)、ナトリウム (Na)、カリウム (K)、
塩素 (Cl) 計 14 項目
- ・ 皮膚の病理組織学的変化

実験 II

2-2-1 供試動物およびCu²⁺濃度

- ・ ツメガエル (体重, 雄: 50-63 g, 雌: 101-127 g)
- ・ 対照群 2: 2 個体 (雄 1, 雌 1)
- ・ 0.21 ppm 群: 6 個体 (雄 3, 雌 3)
- ・ 0.31 ppm 群: 6 個体 (雄 3, 雌 3)

- ・ 0.51 ppm 群：6 個体 (雄 3, 雌 3)

2-2-2 Cu²⁺がツメガエルに与える評価項目

- ・ 2-1-2 と同様。

※本章実験は、田園調布動物病院にて、動物愛護法及び飼養保管基準に則し、動物実験等の原則である代替法の利用、使用数の削減及び苦痛の軽減に基づいて適正に実施した。

第3節 結果

3-1 ツメガエルの身体的変化及び飼育水の変化

実験 I

対照群 1 では 7 個体全ての個体で外部刺激に対する反射は良好であり、実験終了まで死亡する個体はなく、飼育水に変化はなかった。

$\text{Cu}^{2+}0.02$ ppm 群では、実験終了時まですべての個体が生存し、外部刺激による反射は良好であったが、対照群 1 と比較し皮膚の脱落があり、飼育水が混濁した。

3.44 ppm 群では 28 時間後に 1 個体の動きが鈍くなり始め、33 時間後に 1 個体が死亡し、43 時間後に 2 個体目が死亡した。

19.68 ppm 群では、浸漬後約 1 時間で動きが緩慢になる個体が現われ、2 時間を経過した頃から 3 個体が水面に浮き始めた。3 時間 20 分後に 1 個体が死亡し、4 時間 30 分後に 2 個体目が死亡した。

実験 II

対照群 2 では、全ての個体で外部刺激に対する反射は良好で、実験終了まで死亡する個体はなく、飼育水の混濁もなかった。

$\text{Cu}^{2+}0.21$ ppm 群では浸漬 48 時間以降に剥離した脱皮が目立った。239.5 時間後に 1 個体死亡。飼育水は日を追うごとに混濁し、168 時間には、ツメガエルが辛うじて目視できる程度にまで混濁した。

0.31 ppm 群では、浸漬 48 時間以降に剥離した脱皮が目立った。213 時間、249 時間、271 時間にそれぞれ 1 個体死亡。168 時間には、水中のツメガエルが辛うじて目視できる程度にまで混濁した。

0.51 ppm 群では、浸漬 48 時間以降に剥離した脱皮が目立ち 47 時間、196 時間、260 時間にそれぞれ 1 個体が死亡した。144 時間には、水中のツメガエルが目視できない程度まで混濁した (図 14)。

3-2 半数致死時間 (LT₅₀)

対照群 1 および、Cu²⁺0.02 ppm 群は実験期間中に死亡しなかった。3.44 ppm 群では LT₅₀ は 47.6 時間であり、19.68 ppm 群では、LT₅₀ は 4.6 時間であった。

対照群 2 は全て生存し、0.21 ppm 群は 239.5 時間に 1 個体死亡したが半数致死には至らなかった。また 0.31 ppm 群の LT₅₀ は 287.6 時間であり、0.51 ppm 群の LT₅₀ は 217.6 時間であった。Cu²⁺濃度上昇にと LT₅₀ の短縮が認められた (図 15)。

3-3 血液生化学検査

実験 I

実験 I および II の対照群から血漿生化学数値の参照値を作成した (表 6)。

Cu²⁺濃度に関連して血液性状の変化が認められた (図 16.)。PCV、Glu、GOT、GPT、ALP、TP、Alb、TP は、Cu²⁺濃度の上昇に伴って高値を示す傾向があった。BUN は Cu²⁺濃度の上昇に伴って低下する傾向が認められた。また、電解質に関して、対照群 1 では、平均 Na;92 meq/l (標準誤差[SE], 2.3)、K; 2.3 meq/l (SE, 0.2)、Cl; 57.5 meq/l (SE, 3.8) であり、0.02 ppm 群では、平均 Na; 102.3 meq/l (SE, 2.3)、K; 2.2 meq/l (SE, 0.1)、Cl; 64.3 meq/l (SE, 2.9) であった。3.44 ppm 群および 19.64 ppm 群の Na、K、Cl 値は、使用した測定機械では scale over (測定不能) となる電解質の顕著な異常が認められた。したがってこれら検査項目に関してはグラフ化できなかった。

PCV、TP における対照群と 3.44 ppm 群および 19.68 ppm 群、そして Glu、GPT、GOT における対照群と 19.68 ppm 群は、統計学的有意差 (* : p<0.05) が認められた (図 16)。

実験 II

Cu²⁺濃度に関連して血液性状の変化が認められた (図 17)。Glu、BUN、Cre、GOT、GPT、ALP、TP、Alb、TP は、Cu²⁺濃度の上昇に伴って高値を示す傾向があった。Ca、Na、Cl は Cu²⁺濃度の上昇に伴って低下する傾向が認められた。特に GOT における対照群と 0.21ppm と 0.31ppm 群および Na における対照群と 0.51 ppm 群、Cl における対照群と 0.21 ppm、0.31ppm、0.51ppm 群は統計学的有意差 (* : p<0.05) が認められた (図 17)。

3-4 皮膚の Cu^{2+} 濃度による病理組織学的変化 (図 18-22.)

対照群：角化層は薄く、表皮細胞は通常 4-6 層で、基底膜は厚く、連続していた。

顆粒腺と粘液腺が整然と配列していた (図 18)。

$\text{Cu}^{2+}0.02$ ppm 群：一部で角化層が剥離。真皮層の結合組織間の一部に弱好塩基性物質沈着。一部の個体に表皮の肥厚や軽度の炎症が認められた (Cu^{2+} との関係は低いと考えられる)。孤在性壊死が観察されたが、いずれの変化も軽微で、実験に関連する変化とはみなされなかった (図 19)。

$\text{Cu}^{2+}0.21$ ppm 群：表皮細胞層肥厚。角化層は軽度肥厚し、剥離著明。孤在性壊死を伴う表皮細胞層の細胞間は離開し、空隙を形成。上皮細胞の空胞化等の変性高度。顆粒腺と粘液腺の変化は軽微 (図 20)。

$\text{Cu}^{2+}0.31$ ppm 群：角化不全。表皮細胞間が離開し、表皮細胞の腫大、空胞化、孤在性壊死、ときに核分裂像がみられた。表皮細胞層内に少数の炎症細胞が浸潤していた (図 21)。

$\text{Cu}^{2+}19.68$ ppm 群：表皮細胞層内に大型の空隙が形成され、細胞層の剥離が顕著。種々の程度の表皮細胞の空胞化がみられた。真皮層の結合組織に弱好塩基性物質が沈着。粘液腺が拡張していた (図 22)。

第4節 考察

Cu^{2+} のツメガエルに対する影響を検討したところ、濃度依存性に LT_{50} が短縮し (図 15)、血液性状にも変化が認められた。実験 I および II において、 $\text{Cu}^{2+}0.02-0.21$ ppm 群では、半数致死には至らなかったが、0.31 ppm 群では、287.6 時間で半数が死亡した。したがってツメガエルの Cu^{2+} 耐性可能な生存濃度は 0.2-0.3 ppm 濃度域と推定した。しかし、0.21 ppm 群でも実験終了時の飼育水は過剰な粘液分泌あるいは過剰脱皮により高度に混濁しており、皮膚の病理組織学的所見では表皮細胞層の肥厚、角化層の軽度肥厚と顕著な剥離を認め、孤在性壊死を伴い表皮細胞層の細胞間は離開して、空隙を形成、また上皮細胞の空胞化等の高度な変化がみられた (図 18-22)。したがって、0.21 ppm でも Cu^{2+} による障害はあり、暴露時間の延長によりその障害はさらに強くなるものと推察された。

Cu^{2+} を用いた他の水生生物における実験では、ニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) で 0.035 ppm 18 週間浸漬しても、GLU、GOT、GPT、ALP、Glu、TP に有意な変化は認められなかったとの報告がある (山本 1979)。一方、メダカ科の一種マミチヨグ (*Fundulus heteroclitus*) においては、1.0 および 5.0 ppm で腎臓に障害を認めた (Gardner & LaRoche 1973)。Baker は、ヒラメ (*Pseudopleuropectes amerimanus*) において $\text{Cu}^{2+} 0.56$ ppm、1.0 ppm、3.2 ppm に浸漬し、死亡直前の各臓器の組織像を観察しており、肝臓は、 $\text{Cu}^{2+} 0.56$ ppm 浸漬 700 時間では組織学的異常はみられないが、 $\text{Cu}^{2+} 1.0$ ppm (200 時間以内に死亡)、 $\text{Cu}^{2+} 3.2$ ppm (100 時間以内に死亡) では脂肪滴が蓄積したことを報告した (Baker 1969)。

ツメガエルでは、 Cu^{2+} 濃度上昇に伴って血中 GOT、GPT および PCV、TP、Alb、Glu が上昇した。GPT、GOT はアミノ酸代謝と TCA サイクルの接点に存在している酵素の一つであり、肝臓でその活性が高く、肝細胞傷害に比例して血中に漏出し、肝臓障害の指標となる。GOT は細胞内局在性のアイソザイム、すなわち細胞質 GOT とミトコンドリア内 GOT が存在し、GPT と合わせて肝細胞の損傷程度を判断する。羊では、銅中毒時の指標として、GOT、LDH、ブタでは GOT、GPT の上昇の報告がある (Underwood 1971)。これらの酵素活性は、一般に、犬、猫、ラット、霊長類で肝臓特異的であり、牛、豚、馬では臓器の酵素活性が低いとされ、動物種によってその診断意義は異なる。過去、無尾目においてこれら酵素の基準値および値の解釈は報告されていない。したがって、ツメガエルの肝臓の傷害程度を反映したかどうかは不明であり、これらの酵素が無尾目のいずれの臓器に分布する

かを検討する必要があると思われた。しかしながら、 Cu^{2+} 濃度上昇に伴ってこれらの酵素は明らかに上昇傾向を示しており、これら酵素を含む何らかの細胞（臓器）に強い傷害を与えていることは明らかであった。

ツメガエルは、 Cu^{2+} 3.44 ppm 以上で 48 時間以内に半数致死に至った。また、血中 Na、Cl 値は Cu^{2+} 濃度が高くなるにつれ低値を示す電解質異常が確認された。Thurberg らはミドリガニ (*Carcinus maenas*) を使って環境水を Cu^{2+} 5–40 ppm で負荷試験を行ったが、 Cu^{2+} 濃度の増加とともに血清浸透圧は低下し、浸透圧調節が崩れ、10 ppm 以上の Cu^{2+} 濃度では、外部浸透圧とほぼ等張となり浸透圧調節が完全に失われたことを報告した (Thurberg et al. 1973)。 Cu^{2+} による浸透圧調節機構の障害は、魚類では、鰓マイクロゾームに存在する Na, K, ATPase (Na の能動輸送に関係する) を阻害することで、水やイオンの膜透過性を変化させ、イオンの能動輸送の際に必要なエネルギー供給が阻害されることによって引き起こされると考えられている (Lorz & McPherson 1976)。ニジマス (*Salmo gairdneri*) における Cu^{2+} 0.135 ppm 浸漬において、鰓細胞の形態学的変化が 48 時間以内に認められ、低酸素血症を引き起こす (Daoust et al. 1984)。ヒラメ (*Pseudopleuropectes amerimanus*) の鰓では Cu^{2+} 1.0 ppm 浸漬において、対照魚と比較し、組織学的に鰓弁の上皮細胞は基底膜から遊離し、塩類細胞が異常に大きくなる傾向がみられた。3.2 ppm では、鰓弁の基本構造が完全に破壊されることが報告されている (Barker 1969)。無尾目の幼生では、浸透圧調節および酸素の体内への取り入れは、主に鰓であるが、変態を行った後の成体では、皮膚がその役割の一部を果たし体液電解質の調節や水分の取り入れも行っている (Deyrup 1964)。 Cu^{2+} 濃度依存性に血中 Na、K、Cl の異常が大きく認められたことから、これらの変化は Cu^{2+} による皮膚への傷害が起きたことに起因すると考えられた。また、PCV、TP、Alb も Cu^{2+} 濃度依存性に明らかに上昇傾向を示した。一般にこれらの項目が同時に全て上昇する病態として脱水が考えられる。皮膚損傷による水分の取り込み傷害に起因している可能性が示唆された。血中 Glu は、 Cu^{2+} 濃度上昇とともに上昇し、ツメガエルの血中 Glu は基準平均値 82.7 mg/dl であったが、 Cu^{2+} 19.68 ppm 群で対照群の 7 倍以上の非常に高値 (589mg/dl) を示した。両生類における Glu の上昇は、ストレスで起こるとされ (Wright 2001)、高濃度の Cu^{2+} によって電解質の大幅な異常も来たしていることから、急性ストレス障害に陥ったものと推察された。

本章の実験から、 Cu^{2+} は両生類に対して 0.2 ppm 以上で皮膚障害を惹起し、より高濃度では、

タンパク変性や腐食作用などによる皮膚の化学熱傷 (chemical burn) の病態を引き起こし、皮膚浸透圧異常による血中電解質異常を誘発する。併せて、濃度依存性に血中酵素値を著しく上昇させ、毒性を示すことが確認された。本研究成果を考慮すると Cu^{2+} は *B. dendrobatidis* の除菌法として実用的でないことが明らかになった。しかしながら、*Saprolegnia* は $\text{Cu}^{2+} 0.006$ ppm、*Vibrio* 属細菌は $\text{Cu}^{2+} 0.1$ ppm で増殖抑制効果があるとされる (三浦ら, 2005, 松尾 2007)。 *B. dendrobatidis* の培養は困難で、国内初の培養株樹立には 1 年を要した。これは、培養材料に含まれる皮膚表面の雑菌が除去できないことによる。このため、*B. dendrobatidis* の培養に際して、 Cu^{2+} を添加することで、選択培地になる可能性が示唆された。

図表

[A]

[B]



[C]

[D]



図 14 実験 2 における 144 時間後の飼育水の様子

[A] 対照群 2 飼育水の混濁はなく透明。

[B] 0.21 ppm 群 飼育水の混濁がみられ、辛うじてツメガエルが観察できる。

[C] 0.31 ppm 群 飼育水の混濁は高度であり、ツメガエルを観察できない。

[D] 0.51 ppm 群 飼育水の混濁は非常に高度であり、ツメガエルを観察できない。

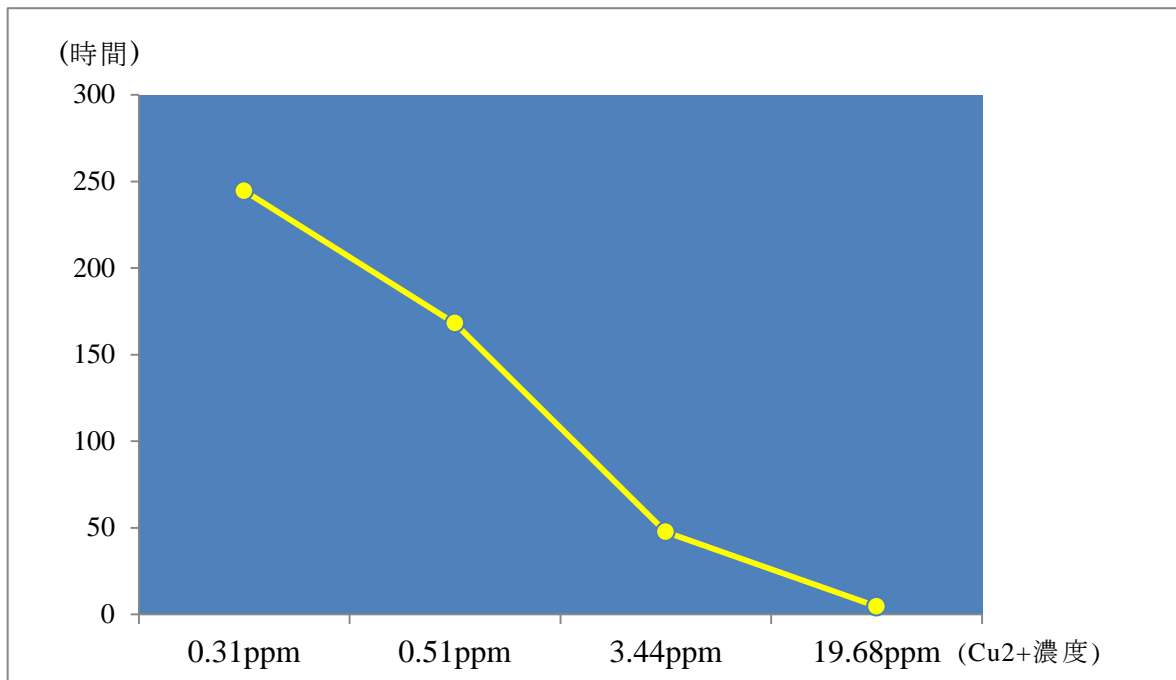


図 15 Cu²⁺濃度とツメガエルの半数致死時間 (LT₅₀ ; 50%Lethal Time)

対照群、0.02 ppm 群、0.21 ppm 群では半数致死に至らなかった。

濃度依存性に LT₅₀ の短縮が認められる。

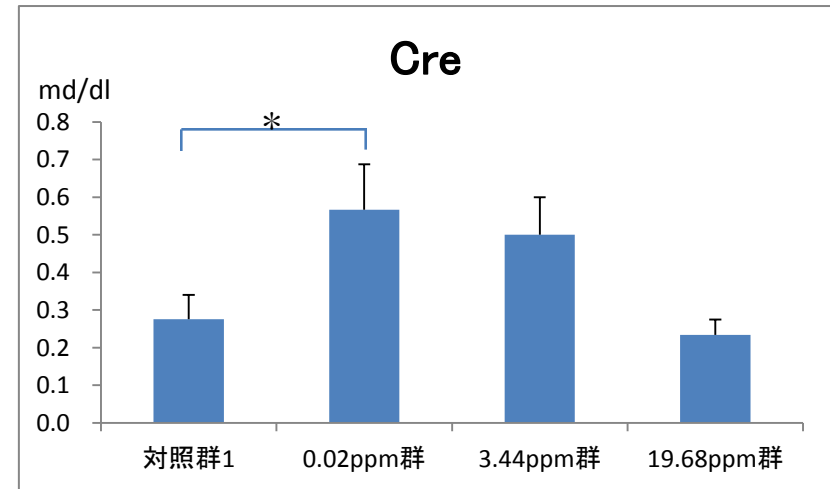
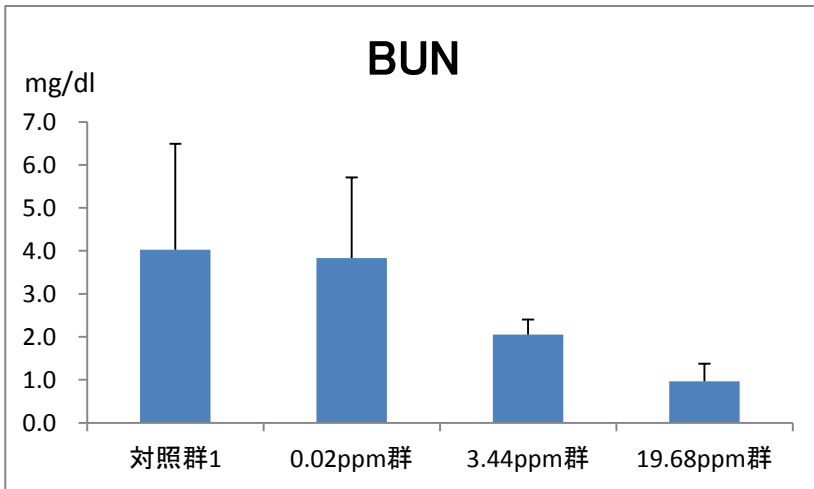
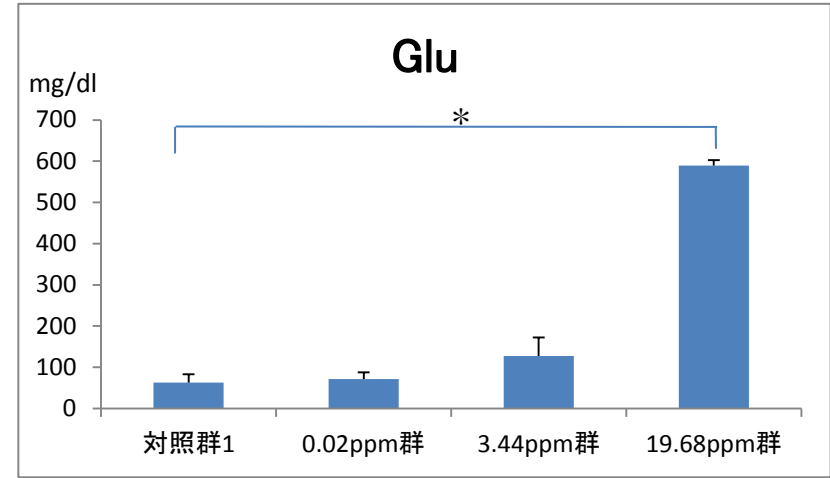
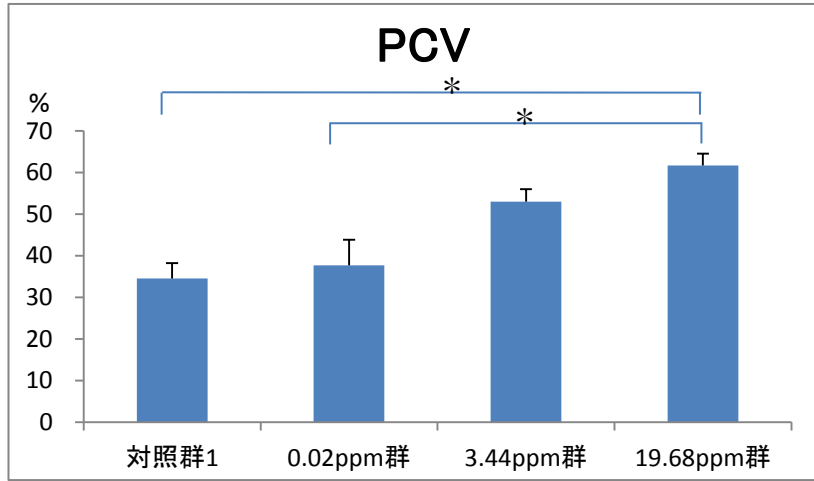
表 6 健康なアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の血漿生化学検査参照値¹⁾

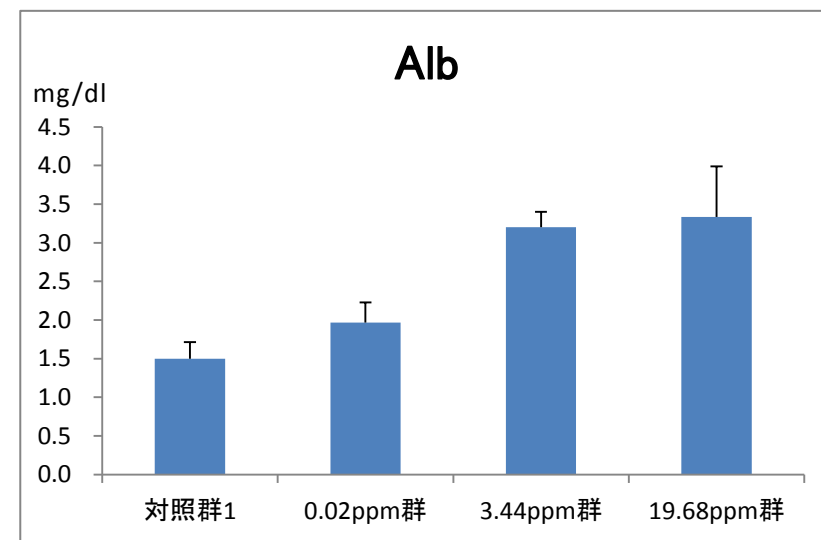
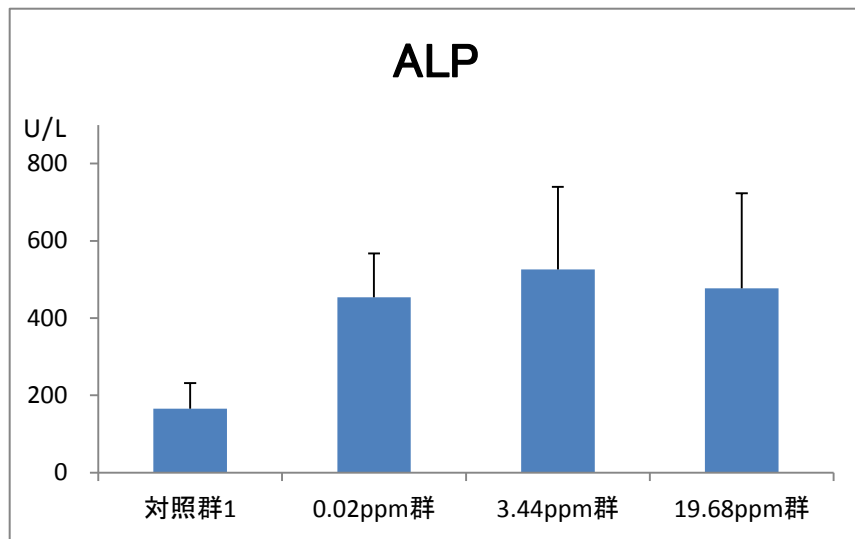
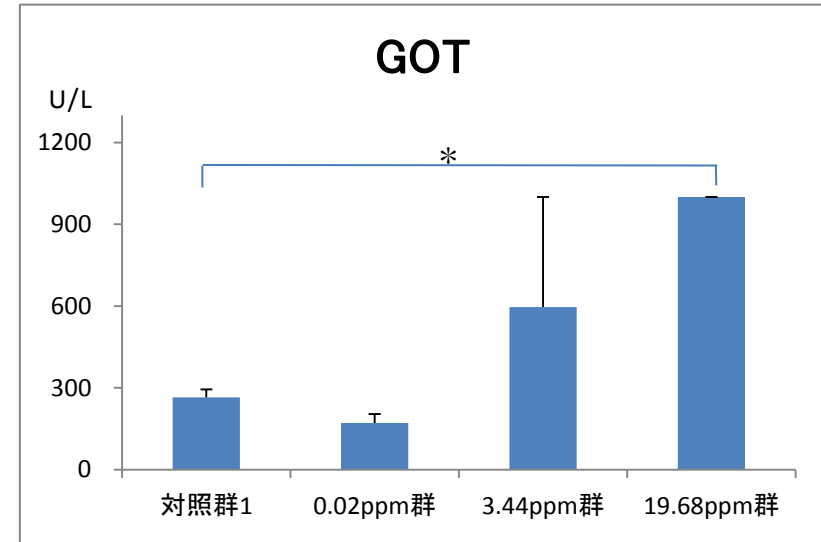
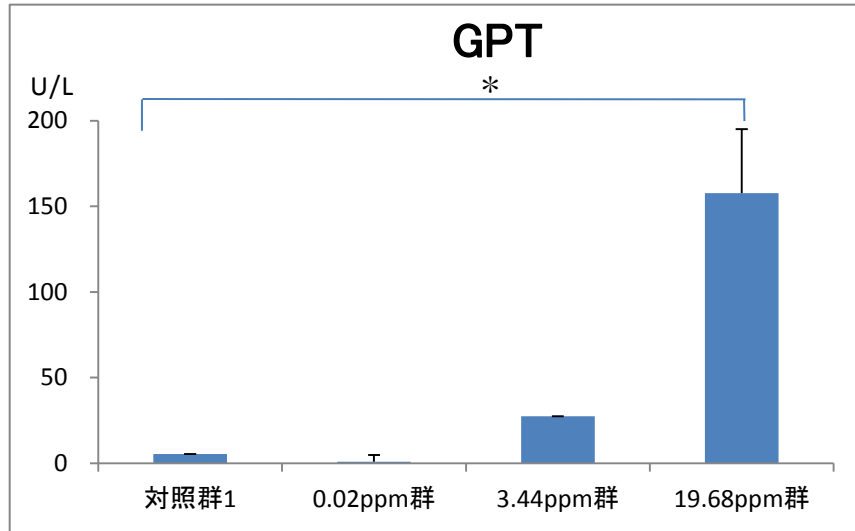
	単位	平均	標準偏差	基準範囲		
PCV	%	36.1	8.7	29.0	—	48.0
GOT	U/l	235.0	86.6	189.0	—	357.0
GPT	U/l	4.4	3.4	2.0	—	12.0
ALP	U/l	350.7	288.2	104.0	—	870.0
GLU	mg/dl	82.7	34.6	61.0	—	150.0
BUN	mg/dl	2.8	3.8	0.7	—	12.1
Tbil	mg/dl	1.0	0.8	0.6	—	3.3
Cre	mg/dl	0.3	0.1	0.2	—	0.4
TP	mg/dl	4.1	0.7	3.8	—	5.0
Alb	mg/dl	2.1	0.5	1.9	—	3.1
Ca	mg/dl	12.2	1.6	11.4	—	16.0
P	mg/dl	6.2	1.9	5.4	—	9.2
Na	mEq/l	99.4	8.1	95.0	—	112.0
K	mEq/l	2.2	0.3	2.1	—	2.7
Cl	mEq/l	63.2	6.1	59.0	—	71.0

1) : N=9

2) : 赤血球容積比率 (PCV)、血糖値 (Glu)、血中尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (Cre)、グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ (GPT)、グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ (GOT)、アルカリフォスファターゼ (ALP)、アルブミン (Alb)、総蛋白 (TP)、カルシウム (Ca)、リン (P)、ナトリウム (Na)、カリウム (K)、塩素 (Cl)

測定機器 : 富士ドライケム 3500V・富士フイルム株式会社





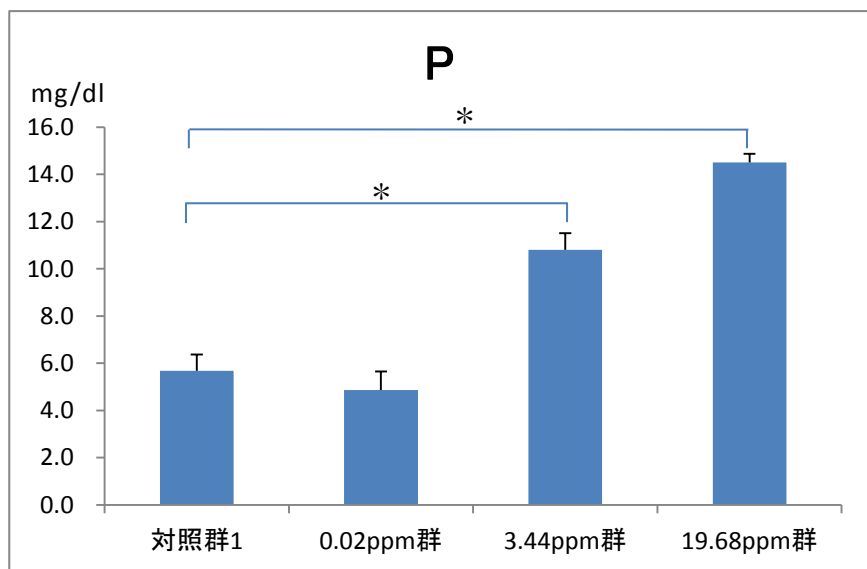
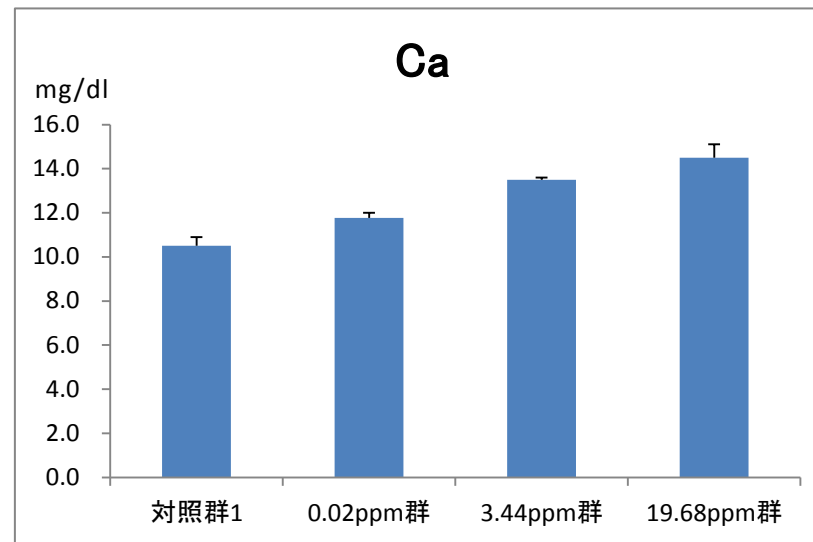
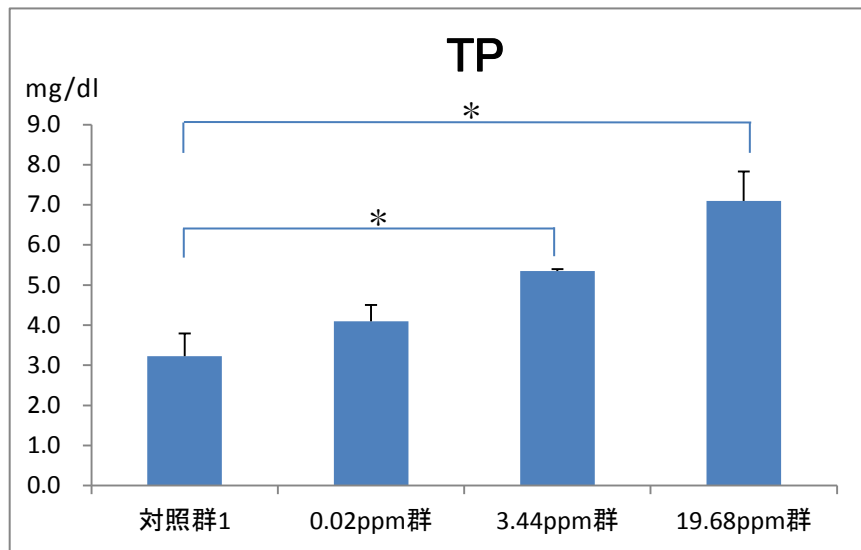
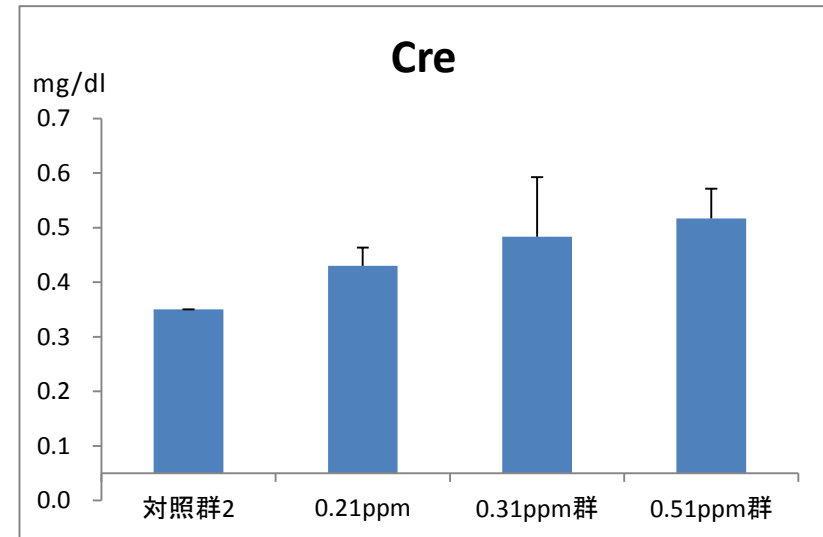
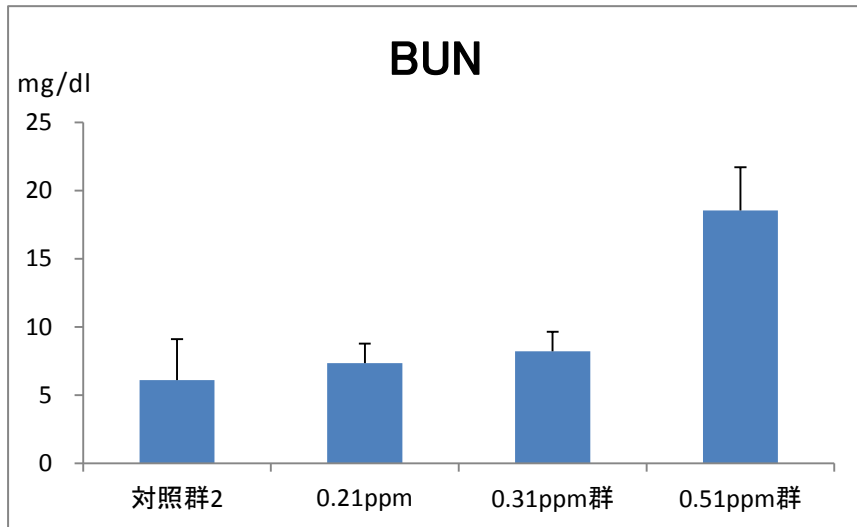
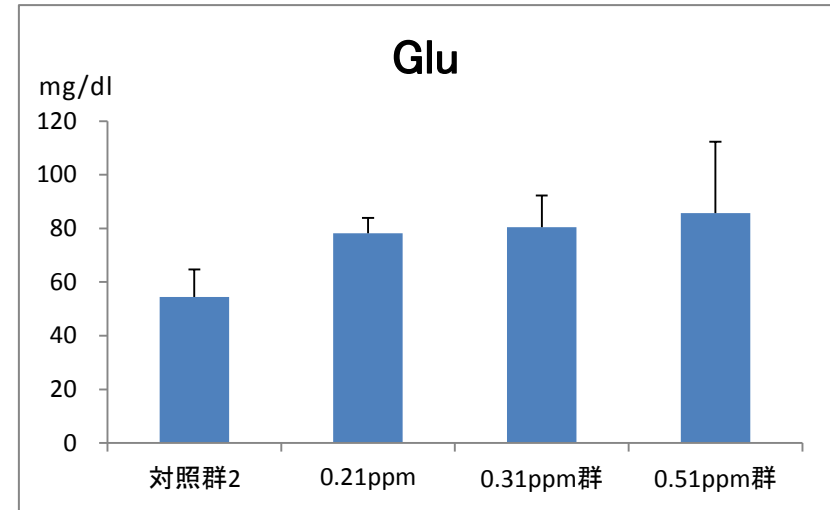
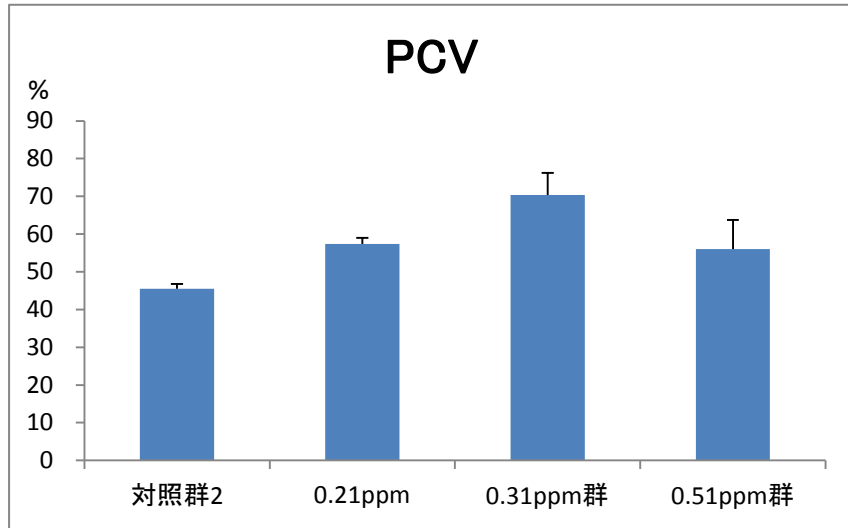
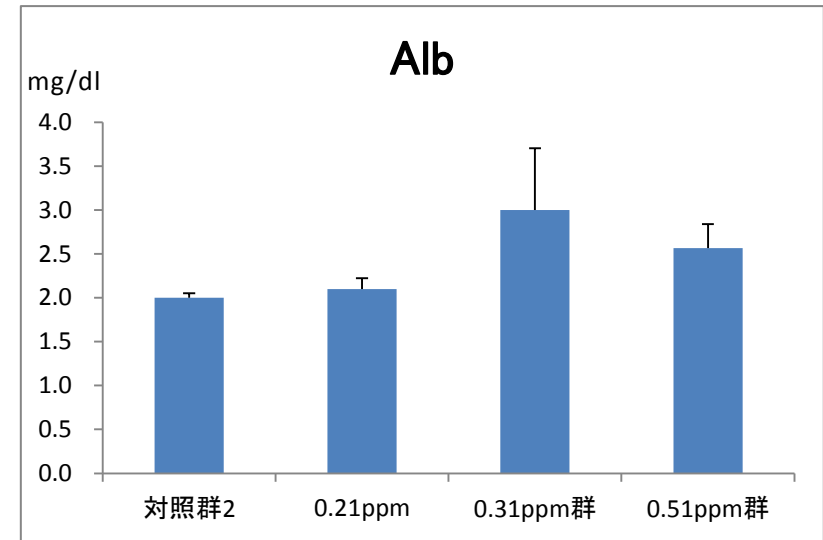
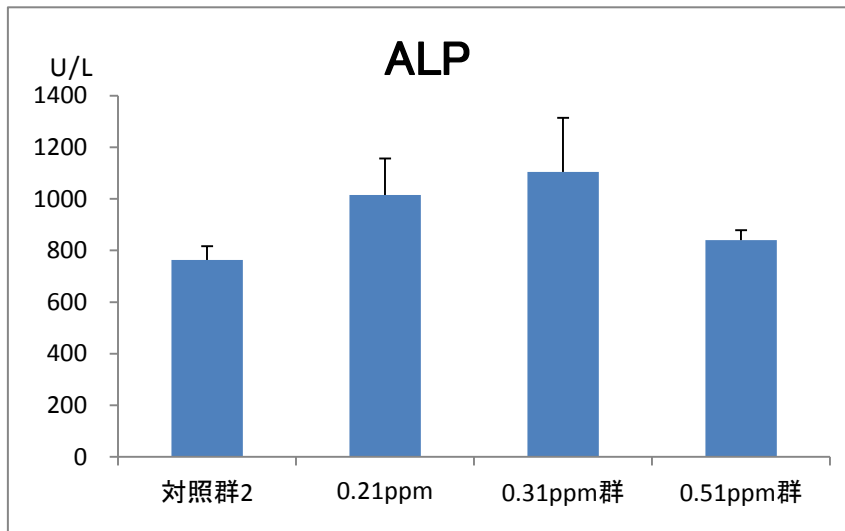
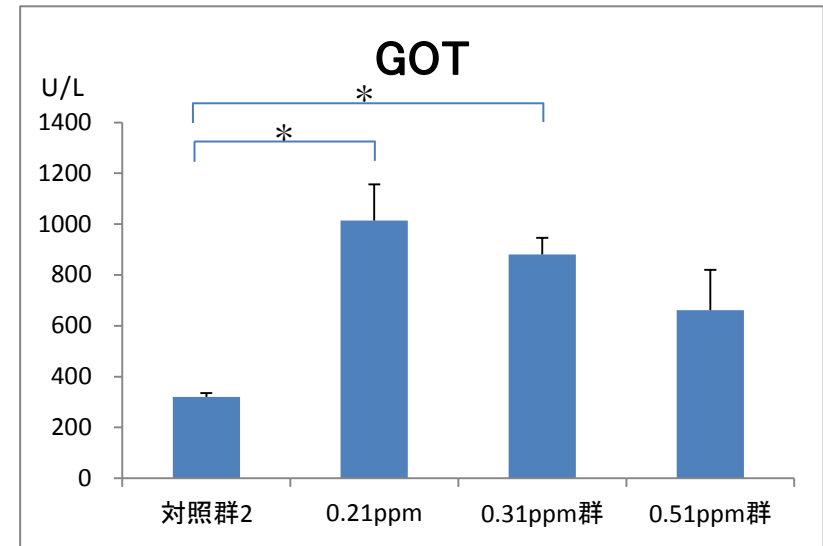
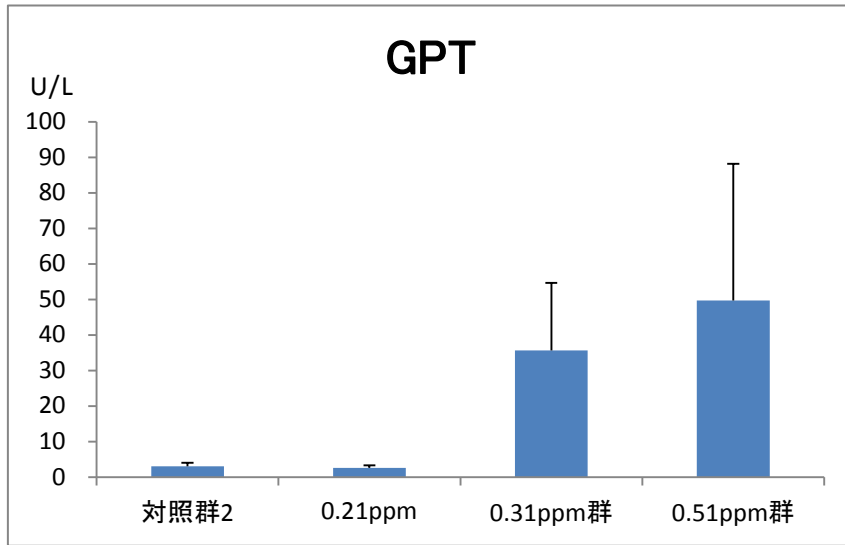
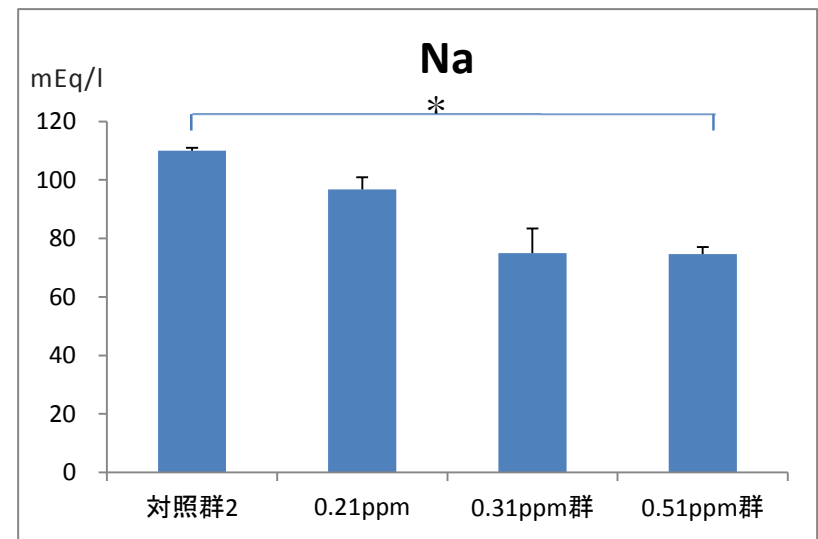
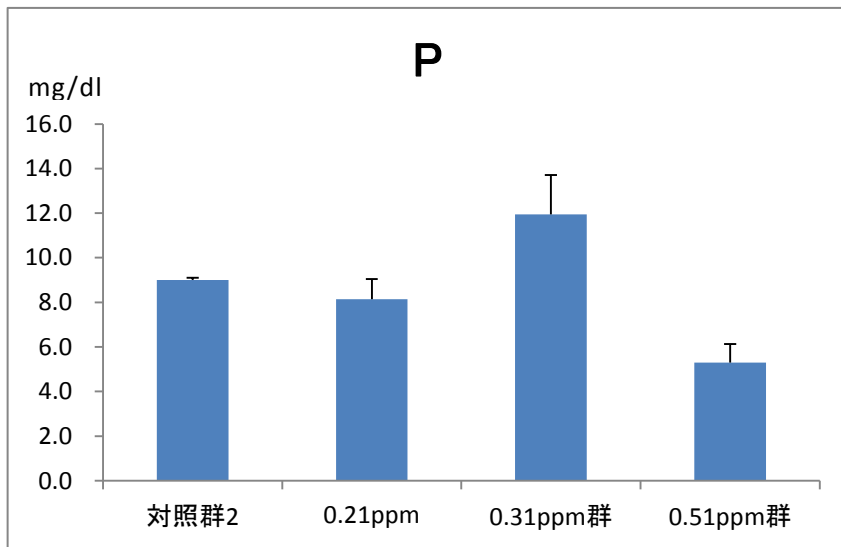
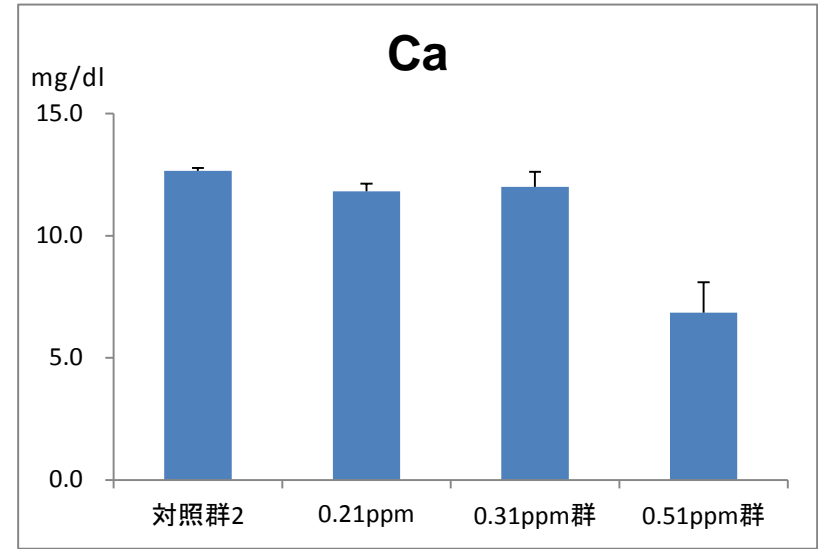
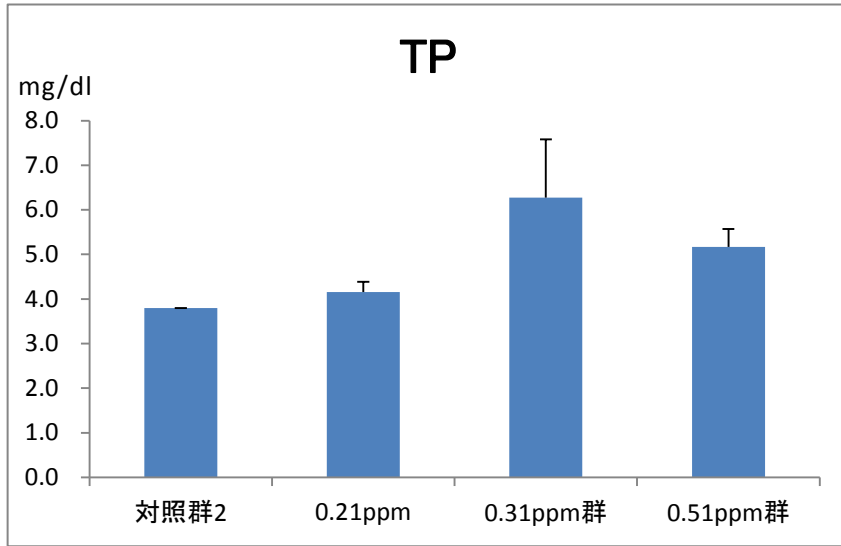


図 16 実験 I で得られ各 Cu^{2+} 濃度浸漬ツメガエルから得た血漿生化学的検査値

X 軸 : Cu^{2+} 濃度, Y 軸 : 測定値。* : $p < 0.05$







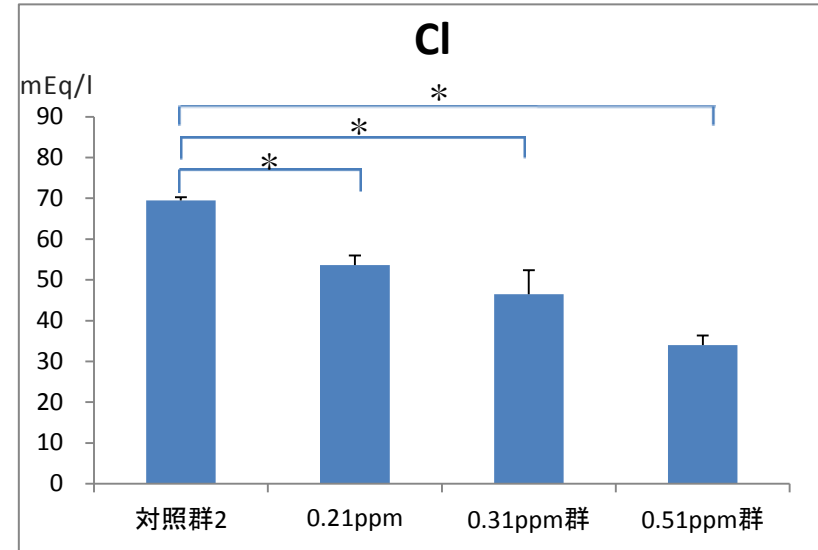
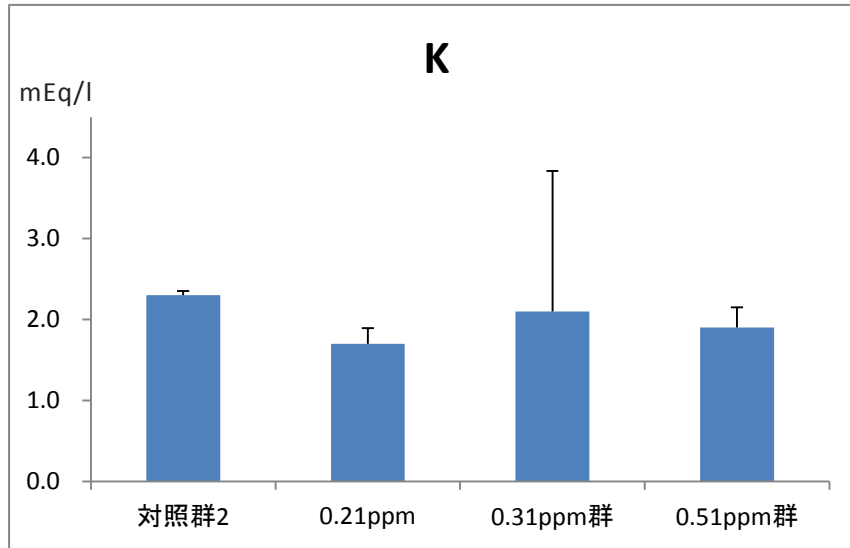
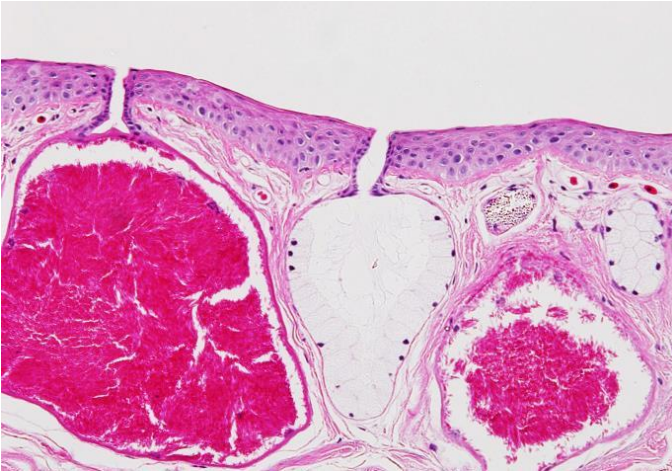


図 17 実験 I で得られ各 Cu^{2+} 濃度浸漬ツメガエルから得た血漿生化学的検査値

X 軸 : Cu^{2+} 濃度, Y 軸 : 測定値。* : $p < 0.05$

[A]



[B]

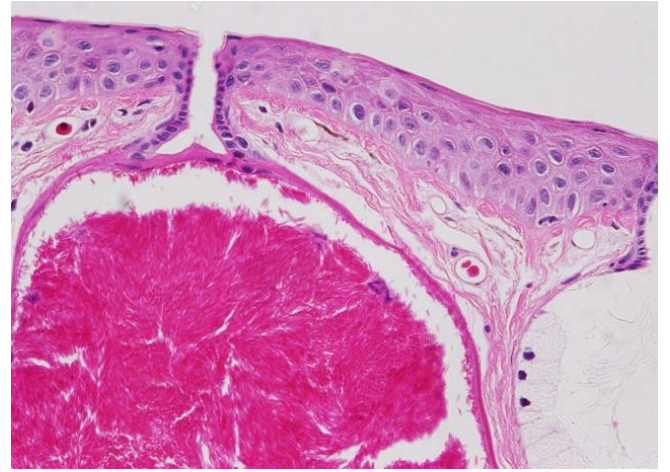
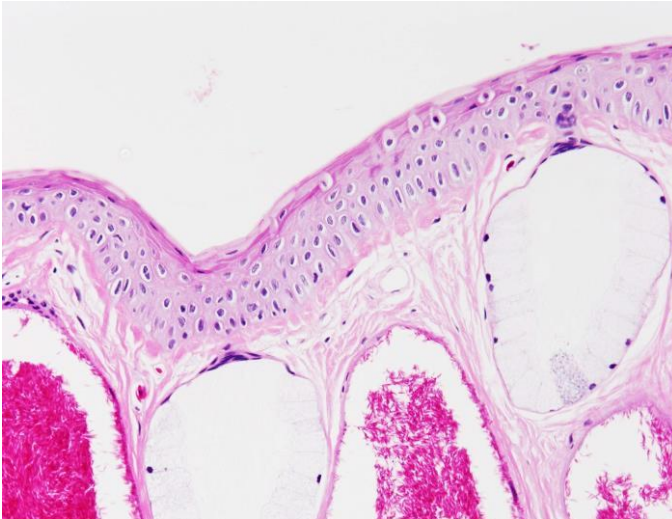


図 18 対照群におけるツメガエルの表皮組織 (H.E)

[A] (×100)

[B] (×200)

[C]



[D]

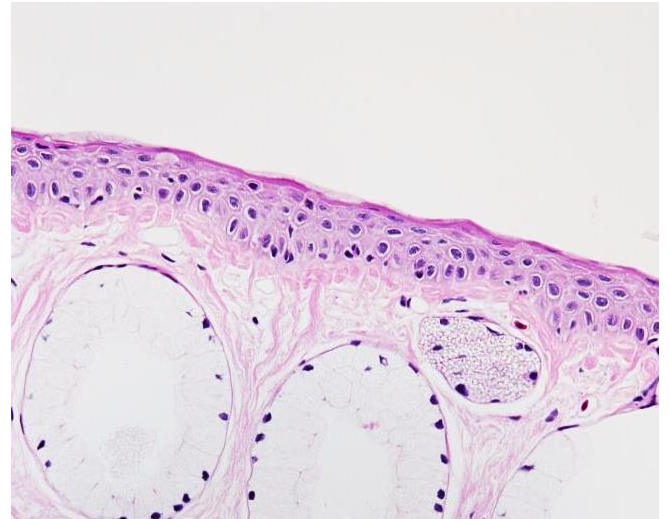
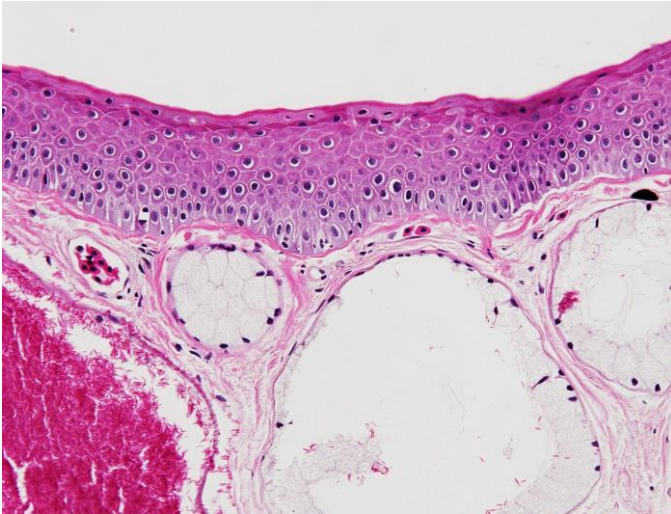


図 19 Cu²⁺濃度 0.02 ppm 群 (生存個体) におけるツメガエルの表皮組織 (H.E.)

[C] (×100)

[D] (×200)

[E]



[F]

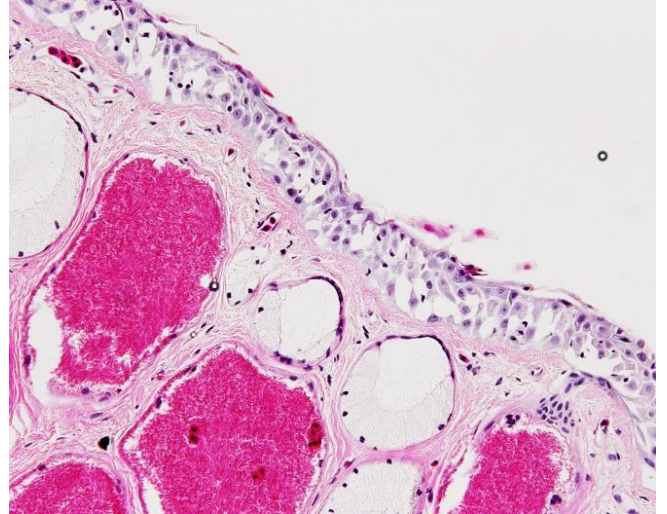
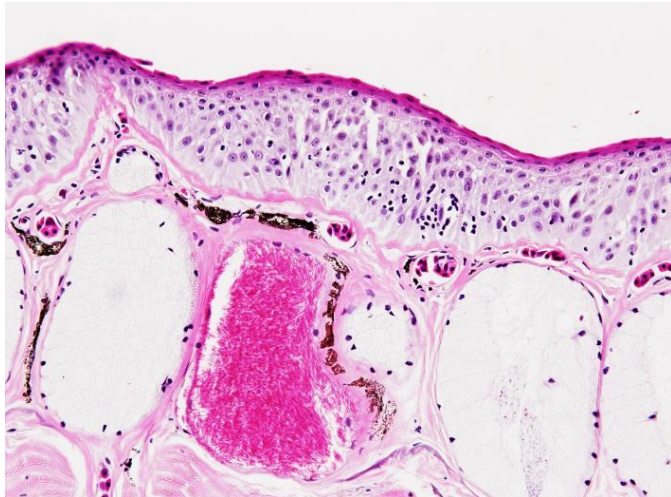


図 20 Cu^{2+} 濃度 0.21 ppm 群におけるツメガエルの表皮組織 (H.E.)

[E] 生存個体 ($\times 100$)

[F] 死亡個体 ($\times 100$)

[G]



[H]

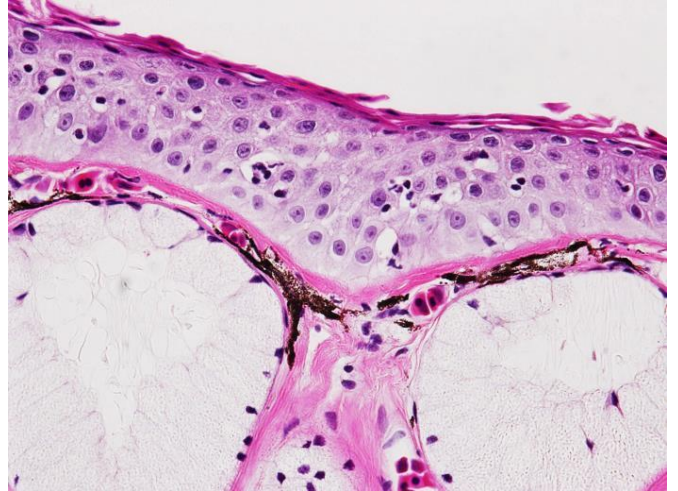
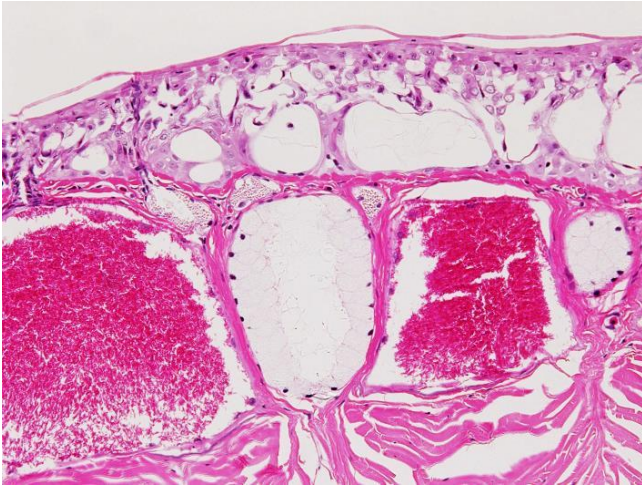


図 21 Cu^{2+} 濃度 0.31 ppm 群におけるツメガエルの表皮組織 (H.E.)

[G] 生存個体 ($\times 100$)

[H] 死亡個体 ($\times 200$)

[I]



[J]

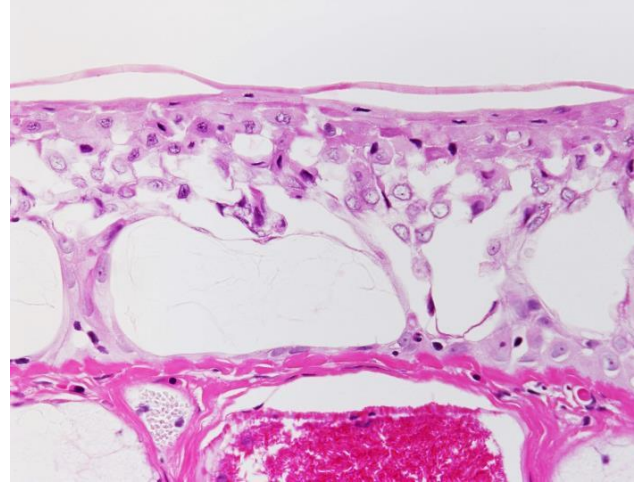


図 22 Cu^{2+} 濃度 19.64 ppm 群におけるツメガエルの表皮組織 (H.E.)

[I] 死亡個体 ($\times 100$)

[J] 死亡個体 ($\times 200$)

総括

近年の経済のグローバル化と輸送手段の変革により、物流は広域、大規模、迅速化された。その結果、生きた動物の人為的な移動、商取引により、H5N1 鳥インフルエンザやコイヘルペスウイルスのような新興病原体が、急速かつ広域に拡散され、汎発流行の大きな原因となっている。これらは、ときに野生生物個体群に壊滅的な影響をもたらし、また、甚大な経済的損失を生じる。

Batrachochytrium dendrobatidis は 1999 年ツボカビ門ツボカビ科に新種記載された真菌である。両生類にのみ感染しツボカビ症を引き起こし、少なくとも現在までに 20 科 200 種以上の両生類の生息数を減少、絶滅させたことが判明している。海外では、病原体としての特性に関する研究はもとより、生態系への影響の評価が国際自然保護連合(IUCN) を中心に行われ、これを受けて国際獣疫事務局(OIE) は国際的な監視を必要とする病原体に指定した。我が国で国内初、同時にアジア初の *B. dendrobatidis* は、2006 年両生類愛好家が飼育していた外来性両生類の不審死事例から見出された。

日本には 66 種 (内訳：無尾目 39 種、有尾目 27 種) の在来両生類が生息しており、環境省が作成した 2012 年のレッドリストでは、そのうち絶滅危惧種が 42 種、全体の 67%にも及ぶ。ペットとして飼育される両生類は野外に遺棄されることがあり、これが感染源となり、野生の両生類に感染拡大する可能性も指摘されている。そのため、日本固有の両生類を *B. dendrobatidis* の脅威から守るためには、流通する両生類における *B. dendrobatidis* 保菌状況の把握、流通個体を含めた飼育下両生類における適切な *B. dendrobatidis* の管理方法の確立が欠かせない。しかしながら、わが国に輸入される外来性両生類の *B. dendrobatidis* 感染実態を調査した報告はなく、一般家庭で飼育される両生類における保菌状況も把握されていない。さらに、多種多様の両生類に適用可能な除菌法および治療法の確立も不十分である。そこで、本研究では、流通する両生類の *B. dendrobatidis* 感染実態を明らかにし、併せて新たな除菌法・治療法を確立し、飼育下両生類を感染源とする、*B. dendrobatidis* の在来種への脅威を軽減することを目的とする。本研究の成果は、絶滅に瀕する希少な両生類の保全医学にも寄与する。本研究は以下の 3 つの章より成っている。

第 1 章では、国内飼育下および輸入された外来性両生類における *B. dendrobatidis* の保菌状況を明

らかにすることを目的とした。2008–2011 年の間に両生類 820 匹 (内訳：21 科 109 種、無尾目 722 匹、有尾目 96 匹、無足目 2 匹。うち 561 匹は 20 カ国から輸入) より体表スワブを採取し、nested-PCR 法で *B. dendrobatidis* 遺伝子を検出、塩基配列を解析した。820 匹中 76 匹 (9.3%) から *B. dendrobatidis* が検出された。*B. dendrobatidis* が検出された動物の内訳は、無尾目 20 種 66 匹、有尾目 7 種 10 匹であった。輸入両生類の保菌率は 10.3% (58/561) であり、日本国内で長期に飼育もしくは商業的に養殖されている両生類の保菌率は 6.9% (18/259) であった。陽性個体の原産国は 9 カ国 (ブルガリア、ドイツ、日本、マダガスカル、ペルー、タンザニア、タイ、アメリカ、ベトナム) で、日本とドイツ由来 24 個体は、各々の国内で人工繁殖された個体であり、残り 52 個体は野生採集個体であった。輸入動物群における高い保菌率は、*B. dendrobatidis* 暴露機会の増加、輸送時の過密や輸送ストレスなどによる易感染性の上昇によるものと考えた。以上より、ペットとして輸入される外来性両生類の商取引を介して現在も *B. dendrobatidis* が日本国内に侵入していること、また、すでに日本国内で飼育されているペット用両生類には、*B. dendrobatidis* の不顕性感染個体が多く含まれていることを明らかにした。

陽性サンプル 76 の PCR 産物の塩基配列解析によって、*B. dendrobatidis* は 11 の haplotype に型別された。そして輸入両生類の 52/58 (90%) が haplotype A (DDBJ accession number AB435211) であった。haplotype A は、海外においてもっとも広く分布している高病原性系統 (Global pandemic lineage : *Bd*-GPL) である。また、日本国内の施設で繁殖されているアフリカツメガエル (*Xenopus leavis*) から、4 つの haplotype (A, C, Q, V) が検出され、本研究で対象とした両生類のうち最も多くの haplotype を保菌しており、アフリカツメガエルが *B. dendrobatidis* の主要なキャリアとする仮説を支持した。また、調査した国の中で、日本において最も多くの 5 haplotype が確認されるとともに、その割合は他国と異なっていた。すなわち、他国では haplotype A が 90% と圧倒的に多いが、日本では、haplotype C, 44%、A, 28%、V, 17%、Q, 5.6%、Bd28, 5.6% と、多くの種類の haplotype、様々な割合で検出され、国内飼育下外来性両生類では、*B. dendrobatidis* の多様性が高いことが明らかにされた。この状況は、流通過程や飼育施設内で、在来両生類を含めた多種類の両生類との間接的あるいは直接的接

触により形成されたものと考えられた。さらに、日本を含むアジアとその他の国における haplotype 数が、前者は 9 haplotype (A, C, E, L, Q, V, Bd28, Bd38, Bd41)、後者はわずか 3 haplotype (A, Bd29, Bd43) と、アジアにおいて高い遺伝子的多様性がみられ、Goka らが提唱する *B. dendrobatidis* アジア起源説を支持する結果となった。

第 1 章で、ペットとして流通する外来性両生類が、一定の割合 (10.3%) で *B. dendrobatidis* を保菌し、さらに、ツボカビ症を発症している個体や大量死も確認された。*B. dendrobatidis* は、直接接​​触のみならず、飼育水を介して、容易に水平伝播するとともに、広く拡散し、感染源となるため、有効な除菌法や治療法の確立が欠かせない。特にツボカビ症を発症した両生類では、莫大な数の遊走子が生産、放出されることから、感染拡大を防ぐために治療法の確立は最優先で取り組む課題である。

そこで、第 2 章では自然発生性ツボカビ症の両生類を対象として、効果的、簡便かつ安全な治療法の確立を目的とした。供試動物は 12 匹 (内訳は無尾類 5 種 11 匹、有尾類 1 種 1 匹) で、臨床症状、脱皮皮直接鏡検による *B. dendrobatidis* 確認および nested-PCR 法によりツボカビ症と確定診断された。治療プロトコルは、トリアゾール系抗真菌薬イトラコナゾール 0.01% 水溶液に、1 回 10 分間、1 日おきに計 7 回の薬浴とした。除菌および治療効果は、臨床症状、直接鏡検法と nested-PCR 法の 3 つで、治療中、治療直後および治療後 (20–57 日、平均 34.4 日) に判定した。その結果、12 匹中 11 匹の治療と除菌に成功した。さらに 12 ヶ月を経過しても再発は認められなかった。また、臨床症状は、治療開始から 5 日後、わずか 3 回の薬浴で改善した。死亡した 1 匹のカエルは、供試動物中最も体重が軽く、若齢で、病勢もかなり進行していたため死亡したものと判断され、その他の動物を含めて副作用は確認されなかった。また、過去報告例のない有尾類のツボカビ症でも効果が得られたことから、共同研究者の宇根有美らはこの治療プロトコルを用いて、我が国の特別天然記念物であるオオサンショウウオ (*Andrias japonicus*) の *B. dendrobatidis* の除菌に成功した。以上より本研究によって確立した治療法は、有尾類にも適応でき、ツボカビ症に対して安全かつ効果的であると判断した。

第2章で、無尾類および有尾類のツボカビ症の治療法の確立に成功した。この研究では、高価ではあるが、高い除菌効果が期待できる人体用の薬剤を、動物を小型の個別容器にいれ、確実に薬浴するとともに、薬剤量を最小量にすることで低コスト化を図った。これは、地上性の両生類を供試動物とすることで実現した。しかし、完全水棲で、かつ多頭飼育されるアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) などの両生類には、作業の煩雑さはもとより、費用の面で適用できない。アフリカツメガエルは、生物学、遺伝学、発生学などの分野の研究には欠かせない重要な実験動物で、世界中で広く用いられている。その一方で、アフリカツメガエルは *B. dendrobatidis* の自然宿主で、かつ重要なキャリアとされ、この種を通じて世界的に *B. dendrobatidis* が拡散したとする報告がある。また、実際、第1章の結果のようにアフリカツメガエルの26.9%から *B. dendrobatidis* が検出された。しかし、国内外で、アフリカツメガエルの *B. dendrobatidis* 除菌法は確立されていない。

そこで、第3章では、アフリカツメガエルの *B. dendrobatidis* に対して安全かつ容易、安価で、効果的な除菌方法を検討することとして、銅イオン (Cu^{2+}) のもつ抗菌効果に注目した。銅イオンは、水産分野において、細菌・真菌性疾患の防除に利用されており、特に魚卵に発生するミズカビ (*Spleregria*) に対して $\text{Cu}^{2+}0.006$ ppm 処置で効果があり、幅広く用いられている。また、共同研究者の宇根有美らは、*B. dendrobatidis* の培養株を使って、*in vitro* において Cu^{2+} が *B. dendrobatidis* に与える影響を評価し、 $\text{Cu}^{2+}1$ ppm で増殖抑制がおき、5 ppm 以上で増殖を阻止できることを明らかにした。

以上のことから、アフリカツメガエルの Cu^{2+} への感受性を検証し、 Cu^{2+} を *B. dendrobatidis* の除菌法として適用できるか検討した。銅標準液を用いて、対照群、 $\text{Cu}^{2+}0.02$ ppm から 19.68 ppm まで6段階の濃度の Cu^{2+} 水を調整した。 Cu^{2+} がアフリカツメガエルに与える影響を身体的変化の観察 (飼育水の変化を含む)、半数致死時間 (LT_{50}) の計測、血液化学検査および病理組織学的検査によって評価した。その結果 $\text{Cu}^{2+}0.02$ ppm 群では死亡個体はなく、0.21 ppm 群では浸漬 239.5 時間後に1匹 ($n=6$) 死亡した。0.31 ppm 群では、287.6 時間で半数が死亡し ($n=6$)、 Cu^{2+} 濃度が上昇するに従って LT_{50} の時間が短縮した。以上より、アフリカツメガエルの Cu^{2+} 耐性可能な臨界濃度は 0.2–0.3 ppm 濃度域と推定した。しかし、0.21 ppm 群でも実験終了時の飼育水は過剰な粘液分泌あるいは過剰脱皮に

より高度に混濁しており、皮膚の病理組織学的所見では表皮細胞層の肥厚、角化層の軽度肥厚と顕著な剥離を認め、孤在性壊死を伴い表皮細胞層の細胞間は離開して空隙を形成、また上皮細胞の空胞化等の高度な変化がみられた。したがって、0.21 ppmでも Cu^{2+} による障害はあり、暴露時間の延長によりその障害はさらに強くなるものと推察された。また、 Cu^{2+} 濃度上昇に伴って GOT、GPT および PCV、TP、Alb、Glu が上昇することが明らかになった。

本章の実験から、 Cu^{2+} は両生類に対して 0.2 ppm 以上で皮膚障害を惹起し、より高濃度では、タンパク変性や腐食作用などによる皮膚の化学熱傷 (chemical burn) の病態を引き起こし、皮膚浸透圧異常による血中電解質異常を誘発する。併せて、濃度依存性に血中酵素の異常を引き起こす毒性を示すことが確認された。本研究成果を考慮すると Cu^{2+} は *B. dendrobatidis* の除菌法として実用的でないことが明らかになった。しかしながら、*Saprolegnia* は Cu^{2+} 0.006 ppm、*Vibrio* 属細菌は Cu^{2+} 0.1 ppm で増殖抑制効果があるとされる。*B. dendrobatidis* の培養は困難で、国内初の培養株樹立には 1 年を要した。これは、培養材料に含まれる皮膚表面の雑菌が除去できないことによる。このため、*B. dendrobatidis* の培養に際して、 Cu^{2+} を用いることで、選択培地になる可能性が示唆された。

以上、本研究では、我が国における輸入両生類の *B. dendrobatidis* 感染実態を、分子生物学的な手法を用いて明らかにするとともに、自然発生性のツボカビ症の除菌・治療法を確立した。本研究で得られた成果は、飼育下両生類における *B. dendrobatidis* 拡散阻止の方法を提供し、さらに、ツボカビ症の脅威にさらされる絶滅に瀕する希少な両生類の保全医学分野への貢献が期待される。

本論文の一部は、以下の論文に公表した。

- Tamukai K, Une Y, Tominaga A, Suzuki K, Goka K (2014) *Batrachochytrium dendrobatidis* prevalence and haplotypes in domestic and imported pet amphibians in Japan. *Diseases of Aquatic Organisms*, 109: 165–175

Abstract <http://www.int-res.com/abstracts/dao/v109/n2/p165-175/>

DOI: 10.3354/dao02732.

- Tamukai K, Une, Tominaga A, Suzuki K, Goka K (2011) Treatment of spontaneous chytridiomycosis in captive amphibians using itraconazole. *Journal of Veterinary Medical Science*, 73: 155–159

謝辞

本研究の実施および本論文をまとめるにあたり、終始ご懇篤なるご指導ご鞭撻頂きました麻布大学獣医学部病理学研究室、宇根有美教授、小動物臨床研究室、斑目広郎教授、分子生物学研究室、村上賢教授に深く感謝致します。

また、実験の実施およびデータ解析にあたっては、国立環境研究所、生物・生態系環境研究センター主席研究員、五箇公一博士、鈴木一隆様、琉球大学教育学部、富永篤准教授の皆様には大変お世話になりました。深く感謝致します。

この論文を書き終えるにあたり、社会人研究生として日頃から研究活動を支えてくれた麻布大学病理学研究室の皆様、田園調布動物病院のスタッフ、そして家族に深く感謝致します。

参考文献

- Andreone F, Mercurio V, Mattioli F (2006) Between environmental degradation and international pet trade: conservation strategies for the threatened amphibians of Madagascar. *Natura-Soc It Sci Nat Museo Civ Stor Nat Milano*. 95: 81–96
- 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.
- Bai C, Garner TWJ, Li Y (2010) First evidence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in China: discovery of chytridiomycosis in introduced American bullfrogs and native amphibians in the Yunnan Province, China. *Ecohealth* 7:127–134
- Bai C, Liu X, Fisher MC, Garner TWJ, Li Y (2012) Global and endemic Asian lineages of the emerging pathogenic fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* widely infect amphibians in China. *Divers Distrib*. 18: 307–318
- Bailey TA (1984) Effects of twenty-five compounds on four species of aquatic fungi (Saprolegniales) pathogenic to fish. *Aquaculture*. 38: 97–104
- Baker JTP (1969) Histological and electron microscopical observations on copper poisoning in the winter flounder (*Pseudopleuroectes americanus*) *J Fish Res Bd of Can*. 26: 2785–2793
- Bataille A, Fong JJ, Cha M, Wogan GO, Baek HJ, Lee H, Min MS, Waldman B (2013) Genetic evidence for a high diversity and wide distribution of endemic strains of the pathogenic chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in wild Asian amphibians. *Mol Ecol*. 22: 4196–4209
- Berger L, Speare R, Daszak P, Green DE, Andrew AC, Goggin L, Slocombe R, Mark RA, Hyatt AD, Keith RM, Hines HB, Lips KR, Marantelli G, Parkes H (1998) Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rainforests of Australia and Central America. *Proc Natl Acad Sci*. 95: 9031–9036
- Berger L, Speare R, Hyatt AD (1999) Chytrid fungi and amphibian declines: overview, implications and future directions. In: Campbell A (ed) *Declines and disappearances of Australian frogs*. pp 23–33. Environment Australia, Canberra.
- Berger L, Speare R, Hines HB, Marantelli G, Hyatt AD, McDonald KR, Skerratt LF, Olsen V, Clarke JM,

- Gillespie G, Mahony M, Sheppard N, Williams C, Tyler MJ (2004) Effect of season and temperature on mortality in amphibians due to chytridiomycosis. *Aust Vet J.* 82: 434–439
- Bishop PJ, Speare R, Poulter R, Butler M, Speare BJ, Hyatt AD, Olsen VH (2009) Elimination of the amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* by Archey's frog *Leiopelma archeyi*. *Dis Aqua Org.* 84: 9–15
- Bosch J, Martinez-Solano I, Garcia-Paris M (2001) Evidence of a chytrid fungus infection involved in the decline of the common midwife toad (*Alytes obstetricans*) in protected areas of central Spain. *Biol Conserv.* 97: 331–337
- Bradley GA, Rosen PC, Sredl MJ, Jones TR, Longcore JE (2002) Chytridiomycosis in native Arizona frogs. *J Wildl Dis.* 38: 206–212
- Codiță I, Caplan DM, Drăgulescu EC, Lixandru BE, Coldea IL, Dragomirescu CC, Surdu-Bob C, Bădulescu M. (2010) Antimicrobial activity of copper and silver nanofilms on nosocomial bacterial species. *Roum Arch Microbiol Immunol.* 69: 204–12
- Chatfield MW, Moler P, Richards-Zawacki CL (2012) The amphibian chytrid fungus, *Batrachochytrium dendrobatidis*, in fully aquatic salamanders from Southeastern North America. *PLoS One* 7: e44821.
- Daoust PY, Wobeser G, Newstead JD (1984) Acute pathological effects of inorganic mercury and copper in gills of rainbow trout. *Vet Pathol.* 21: 93–101
- 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
- Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD (2000) Emerging infectious diseases of wildlife-threats to biodiversity and human health. *Science* 287:443–449
- Deacon JW (2006) Introduction, the fungi and fungal activities. *In* : *Fungal Biology*, 4th ed. (Deacon JW eds.), pp.1–15. Wiley–Blackwell, Oxford.
- Deyrup JJ (1964) Water balance and the kidney. *In* *Physiology of the Amphibia* (Edited by Moore J. A.), pp. 251–328. Academic Press, New York.
- Farrer RA, Weinert LA, Bielby J, Garner TWJ, Balloux F, Clare F, Bosch J, Cunningham AA, Weldon C, du Preez LH, Anderson L, Pond SL, Shahar-Golan R, Henk DA, Fisher MC (2011) Multiple emergences

- of genetically diverse amphibian-infecting chytrids include a globalized hypervirulent recombinant lineage. *Proc Natl Acad Sci.* 108: 18732–18736
- Fisher MC, Garner TWJ (2007) The relationship between the emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the wildlife trade in amphibians and introduced amphibian species. *Fungal Biol Rev.* 21: 2–9
- Forzán MJ, Gunn H, Scott P (2008) Chytridiomycosis in an aquarium collection of frogs: diagnosis, treatment, and control. *J Zoo Wildl Med.* 39: 406–411
- Frías-Alvarez P, Vredenburg VT, Familiar-López M, Longcore JE, González-Bernal E, Santos-Barrera G, Zambrano L, Parra-Olea G (2008) Chytridiomycosis survey in wild and captive Mexican amphibians. *Ecohealth.* 5: 18–26
- Gardner GR, LaRoche G (1973) Copper induced lesions in estuarine Teleosts. *J Fish Res Bd of Can.* 30: 363–368
- Gaertner JP, Forstner MR, O'Donnell L, Hahn D (2009) Detection of *Batrachochytrium drobatidis* in endemic salamander species from central Texas. *Ecohealth.* 6: 20–26
- Gaertner, JP, Mendoza JA, Neang T, Forstner MJR, Hahn D (2011) Detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* in frogs from different locations in Cambodia. *Herp Rev.* 42: 546–549
- Garner TWJ, Perkins MW, Govindarajulu P, Seglie D, Walker S, Cunningham AA, Fisher MC (2006) The emerging amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* globally infects introduced populations of the North American bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Biol Lett.* 2: 455–459
- Garner TWJ, Stephen I, Wombwell E, Fisher MC (2009) The amphibian trade: bans or best practice? *Ecohealth.* 6: 148–151
- Garner TWJ, Garcia G, Carroll B, Fisher MC (2009) Using itraconazole to clear *Batrachochytrium dendrobatidis* infection and subsequent depigmentation of *Alytes muletensis* tadpoles. *Dis Aquat Org.* 83: 257–260
- Goka K, Okabe K, Yoneda M, Niwa S (2001) Bumblebee commercialization will cause worldwide migration of parasitic mites. *Mol Ecol.* 10: 2095–2099
- 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. Mol Ecol. 18: 4757–4774

- Hanselmann R, Rodriguez A, Lampo M, Fajardo-Ramos L, Aguirre AA, Kilpatrick AM, Rodriguez J, Daszak P (2004) Presence of an emerging pathogen of amphibians in introduced bullfrogs (*Rana catesbeiana*) in Venezuela. Biol Conserv. 120: 115–119
- Harris RN, Brucker RM, Walke JB, Becker MH, Schwantes CR, Flaherty DC, Lam BA, Woodhams DC, Briggs CJ, Vredenburg VT, Minbiole KP (2009) Skin microbes on frogs prevent morbidity and mortality caused by a lethal skin fungus. Isme J. 3: 818–824
- Holsbeek G, Mergeay J, Hotz H, Plötner J, Volckaert F, De Meester L (2008) A cryptic invasion within an invasion and widespread introgression in the European water frog complex: consequences of uncontrolled commercial trade and weak international legislation. Mol Ecol. 17: 5023–5035
- Hyatt AD, Boyle DG, Olsen V, Boyle DB, Berger L, Obendorf D, Dalton A, Kriger K, Hero M, Hines H, Phillott R, Campbell R, Marantelli G, Gleason F, Colling A (2007) Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. Dis Aquat Org. 73: 175–192
- IUCN (2004) Global Amphibian Assessment, Available at http://data.iucn.org/Themes/ssc/biodiversity_assessments/gaa/index_gaa.htm (accessed 18 April 2013)
- James TY, Litvintseva AP, Vilgalys R, Morgan JA, 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 Pathog. 5: e1000458
- Johnson ML, Speare R (2003) Survival of *Batrachochytrium dendrobatidis* in water: quarantine and disease control implications. Emerg Infect Dis. 9: 922–925
- Karesh W, Cook R, Bennett E, Newcomb J (2005) Wildlife trade and global disease emergence. Emerg Infect Dis. 11: 1000–1002
- Keitzer SC, Goforth R, Pessier AP, Johnson AJ (2011) Survey for the pathogenic chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in southwestern North Carolina salamander populations. J Wildl Dis. 47: 455–458
- Kinney VC, Heemeyer JL, Pessier AP, Lannoo MJ (2011) Seasonal pattern of *Batrachochytrium dendrobatidis* infection and mortality in *Lithobates areolatus*: affirmation of Vredenburg's "10,000 zoospore rule".

- Kruger KM, Hero JM (2009) Chytridiomycosis, amphibian extinctions, and lessons for the prevention of future panzootics. *Ecohealth*. 6:6–10
- Kusnetsov J, Iivanainen E, Elomaa N, Zacheus O, Martikainen PJ (2001) Copper and silver ions more effective against legionellae than against mycobacteria in a hospital warm water system. *Water Res*. 35: 4217–25.
- Kusrini MD, Skerratt LF, Garland S, Berger L, Endarwin W (2008) Chytridiomycosis in frogs of Mount Gede-Pangrango, Indonesia. *Dis Aquat Org*. 82: 187–194
- Laurance WF, McDonald KR, Speare R (1996) Epidemic disease and the catastrophic decline of Australian rain forest frogs. *Conserv Biol*. 10: 406–413
- Lips KR (1999) Mass mortality and population declines of anurans at an upland Site in Western Panama. *Conserv Biol*. 13:117–125
- Lips KR, Diffendorfer J, Mendelson JR, Sears MW (2008) Riding the wave: reconciling the roles of disease and climate change in amphibian declines. *PLoS Biol*. 6: e72
- Longcore JE, Pessier AP, Nichols DK (1999) *Batrachochytrium dendrobatidis* gen et sp nov, a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia*. 91: 219–227
- Lorz HW, McPherson BP (1976) Effect of copper or zinc in fresh water on the adaptation to the sea water and ATPase activity, and the effects of copper migratory disposition of coho salmon (*Oncorhynchus kisuthi*) . *J Fish Res Bd of Can*. 33:2033–2030
- Martel A, Spitzen-van der Sluijs A, Blooi M, Bert W, Ducatelle R, Fisher M C, Pasmans F (2013) *Batrachochytrium salamandrivorans* sp. nov. causes lethal chytridiomycosis in amphibians. *Proc Natl Acad Sci*. 110: 15325–15329
- Martin S (1999) Itraconazole. *Comp Cont Educ Pract Vet*. 21: 145–147
- Mazzoni R, Cunningham AA, Daszak P, Apolo A, Perdomo E, Speranza G (2003) Emerging pathogen of wild amphibians in frogs (*Rana catesbeiana*) farmed for international trade. *Emerg Infect Dis*. 9: 995–998
- McLeod DS, Sheridan JA, Jiraungkoorskul W, Khonsue W (2008) A survey for chytrid fungus in Thai amphibians. *Raffles Bull Zool*. 6: 199–204

- Mendoza JA, Gaertner JP, Holden J, Forstner, MJR, Hahn D (2011) Detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* on Amphibians in Pursat Province, Cambodia. *Herp Rev.* 42: 542–545
- Minervino AH, Barrêto Júnior RA, Ferreira RN, Rodrigues FA, Headley SA, Mori CS, Ortolani EL (2009) Clinical observations of cattle and buffalos with experimentally induced chronic copper poisoning. *Res Vet Sci.* 87: 473–4788
- Ministry of the Environment Government of Japan (2004) The Invasive Alien Species Act, Available at <http://www.env.go.jp/en/nature/as.html> (accessed 18 April 2013)
- Ministry of the Environment Government of Japan (2012) Red list of amphibians, Available at http://www.env.go.jp/press/file_view.php?serial=20553&hou_id=15619 (accessed 18 April 2013)
- Morehouse EA, James TY, Ganley AR, Vilgalys R, Berger L, Murphy PJ, Longcore JE (2003) Multilocus sequence typing suggests the chytrid pathogen of amphibians is a recently emerged clone. *Mol Ecol.* 12: 395–403
- Morgan JA, Vredenburg VT, Rachowicz LJ, Knapp RA, Stice MJ, Tunstall T, Bingham RE, Parker JM, Longcore JE, Moritz C, Briggs CJ, Taylor JW (2007) Population genetics of the frog-killing fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Proc Natl Acad Sci.* 104: 13845–13850
- Murray KA, Skerratt LF, Speare R, McCallum H (2009) Impact and dynamics of disease in species threatened by the amphibian chytrid fungus, *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Conserv Biol.* 23: 1242–1252
- Mutschmann F, Berger L, Zwart P, Gaedicke C (2000) Chytridiomycosis on amphibians: first report from Europe. *Berl Muench Tieraerztl Wochenschr* 113: 380–383
- Nichols DK, Lamirande EW (2000) Treatment of cutaneous chytridiomycosis in blue-and-yellow poison dart frogs (*Dendrobates tinctorius*). pp.51. In: *Proceedings of Getting the Jump On Amphibian Diseases Conference Workshop*. Cairns, Australia.
- Nijman V, Shepherd CR (2011) The role of Thailand in the international trade in CITES-listed live reptiles and amphibians. *PLoS One.* 25: e17825
- OIE (2012) Aquatic Animal Health Code, Available at <http://www.oie.int/en/international-standard-setting/aquatic-code/> (accessed 18 April 2013)
- Parker JM, Mikaelian I, Hahn N, Diggs HE (2002) Clinical diagnosis and treatment of epidermal

- chytridiomycosis in African clawed frogs (*Xenopus tropicalis*). *Comp Med.* 52: 265–268
- Pearson H (2004) Carp virus crisis prompts moves to avert global spread. *Nature.* 427: 577
- Peel AJ, Hartley M, Cunningham AA (2012) Qualitative risk analysis of introducing *Batrachochytrium dendrobatidis* to the UK through the importation of live amphibians. *Dis Aquat Org.* 98: 95–112
- Phillips BL, Puschendorf R (2013) Do pathogens become more virulent as they spread? Evidence from the amphibian declines in Central America. *Proc Biol Sci.* 7: 280
- Picco AM, Collins JP (2008) Amphibian commerce as a likely source of pathogen pollution. *Conserv Biol.* 22: 1582–1589
- Picco AM, Karam AP, Collins JP (2010) Pathogen host switching in commercial trade with management recommendations. *EcoHealth.* 7: 252–256
- Rowley JLL, Chan SKF, Tang WS, Speare R, Skerratt LF, Alford RA, Cheung KS, Ho CY, Campbell R (2007) Survey for the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* in Hong Kong in native amphibians and in the international amphibian trade. *Dis Aquat Org.* 78: 87–95
- Rollins-Smith LA, Doersam JK, Longcore JE, Taylor SK, Shamblin JC, Carey C, Zasloff MA (2002) Antimicrobial peptide defenses against pathogens associated with global amphibian declines. *Dev Comp Immunol.* 26: 63–72
- Savage AE, Grismer LL, Anuar S, Onn CK, Grismer JL, Quah E, Muin MA, Ahmad N, Lenker M, Zamudio KR (2011) First record of *Batrachochytrium dendrobatidis* infecting four frog families from Peninsular Malaysia. *EcoHealth.* 98: 165–170
- Schlaepfer MA, Hoover C, Dodd CK (2005) Challenges in evaluating the impact of the trade in amphibians and reptiles on wild populations. *Bioscience.* 55: 256–264
- Schloegel LM, Picco A, Kilpatrick AM, Davies AJ, Hyatt AD, Daszak P (2009) Magnitude of the US trade in amphibians and presence of presence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and *Ranavirus* infection in imported North American bullfrogs (*Rana catesbeiana*) *Biol Conserv.* 142: 1420–1426
- Schloegel LM, Daszak P, Cunningham AA, Speare R, Hill B (2010) Two amphibian diseases, chytridiomycosis and ranaviral disease, are now globally notifiable to the World Organization for Animal Health (OIE) : an assessment. *Dis Aquat Org.* 92: 101–108

- Schloegel LM, Toledo LF, Longcore JE, Greenspan SE, Vieira CA, Lee M, Zhao S, Wangen C, Ferreira CM, Hipolito M, Davies AJ, Cuomo CA, Daszak P, James TY (2012) Novel, panzootic and hybrid genotypes of amphibian chytridiomycosis associated with the bullfrog trade. *Mol Ecol.* 21: 5162–5177
- Sheehan DJ, Hitchcock CA, Sibley CM (1999) Current and emerging azole antifungal agents. *Clin Microbiol Rev.* 12: 40–79
- Skerratt LF, Berger L, Speare R, Cashins S, McDonald KR, Phillott AD, Hines HB, Kenyon N (2007) Spread of chytridiomycosis has caused the rapid global decline and extinction of frogs. *EcoHealth.* 4: 125–134
- Sluijs AS, Martel A, Wombwell E, Rooij PV, Zollinger R, Woeltjes T, Rendle M, Freddy P, Hasmans F (2011) Clinically healthy amphibians in captive collections and at pet fairs: A reservoir of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Amphibia-Reptilia.* 32: 419–423
- Smith KF, Behrens M, Schloegel LM, Marano N, Burgiel S, Daszak P (2009) Reducing the risks of the wildlife trade. *Science.* 324: 594–595
- Stuart SN, Chanson J S, Cox NA, Young BE, Rodrigues AS, Fischman DL, Waller RW (2004) Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science.* 306: 1783–1786
- Sundarajan M, Prabhudesai S, Krishnamurthy SC, Rao KV (2001) Effect of metanil yellow and malachite green on DNA synthesis in N-nitrosodiethylamine induced preneoplastic rat livers. *Indian J Exp Biol.* 39: 845–52.
- Swei A, Rowley JLL, Rödder D, Diesmos ML, Diesmos AC, Briggs CJ, Brown R, Cao TT, Cheng TL, Chong RA, Han B, Hero JM, Hoang HD, Kusri MD, Le DT, McGuire JA, Meegaskumbura M, Min MS, Mulcahy DG, Neang T, Phimmachak S, Rao DQ, Reeder NM, Schoville SD, Sivongxay N, Srei N, Stöck M, Stuart BL, Torres LS, Tran DT, Tunstall TS, Vieites D, Vredenburg VT (2011) Is chytridiomycosis an emerging infectious disease in Asia? *PLoS ONE.* 6: e23179
- Thurberg FP, Dawson MA, Collier RS (1973) Effects of copper and cadmium on osmoregulation and oxygen consumption in two species of estuarine crabs. *Mar Biol.* 23: 171–175
- Une Y, Kadokaru S, Tamukai K, Goka K, Kuroki T (2008) First report of spontaneous chytridiomycosis in frogs in Asia. *Dis Aquat Org.* 82: 157–160
- Une Y, Matsui K, Tamukai K, Goka K (2012) Eradication of the chytrid fungus *Batrachochytrium*

- dendrobatidis* in the Japanese giant salamander *Andrias japonicus*. Dis Aquat Org. 98: 243–247
- Vörös J, Satasook C, Bates P, Wangkulangkul S (2012) First record of the amphibian chytrid fungus, *Batrachochytrium dendrobatidis* in Thailand. Herpetol Notes. 5: 519–521
- Voyles J, Berger L, Young S, Speare R, Webb R, Warner J, Rudd D, Campbell R, Skerratt LF (2007) Electrolyte depletion and osmotic imbalance in amphibians with chytridiomycosis. Dis Aquat Org. 77: 113–118.
- Voyles J, Young S, Berger L, Campbell C, Voyles WF, Dinudom A, Cook D, Webb R, Alford RA, Skerratt LF, Speare R (2009) Pathogenesis of chytridiomycosis, a cause of catastrophic amphibian declines. Science. 326: 582–585
- Voyles J, Rosenblum EB, Berger L (2011) Interactions between *Batrachochytrium dendrobatidis* and its amphibian hosts: a review of pathogenesis and immunity. Microbes Infect. 13: 25–32
- Vredenburg VT, Knapp RA, Tunstall TS, Briggs CJ (2010) Dynamics of an emerging disease drive large-scale amphibian population extinctions. Proc Natl Acad Sci. 107: 9689–9694
- Weldon C (2002) Chytridiomycosis survey in South Africa. Froglog, Newsletter of the Declining Amphibian Population Task Force 51: 2. Dept Biological Science, Milton Keynes
- Weldon C, du Preez LH, Hyatt AD, Muller R, Spears R (2004) Origin of the amphibian chytrid fungus. Emerg Infect Dis. 10: 2100–2105
- Weldon C, De Villiers AL, Du Preez LH (2007) Quantification of the trade in *Xenopus laevis* from South Africa, with implications for biodiversity conservation. Afr J Herpetol. 56: 77–83
- Woodhams DC, Alford RA, Marantelli G (2003) Emerging disease of amphibians cured by elevated body temperature. Dis Aquat Org. 55: 65–67
- Wright KM (2001) Amphibian hematology, *In* Amphibian medicine and captive husbandry, Wright KM, Whitaker BR ed. pp129–146. Krieger, Florida.
- Yang H, Baek H, Speare R, Webb R, Park S, Kim T, Lasater KC, Shin S, Son S, Park J, Min M, Kim Y, Na K, Lee H, Park S (2009) First detection of the amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in free-ranging populations of amphibians on mainland Asia: survey in South Korea. Dis Aquat Organ. 86: 9–13.

- Yasuyuki M, Kunihiro K, Kurissery S, Kanavillil N, Sato Y, Kikuchi Y (2010) Antibacterial properties of nine pure metals: a laboratory study using *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Biofouling*. 26: 851–858
- Young S, Berger L, Speare R (2007) Amphibian chytridiomycosis strategies for captive management and conservation. *Int Zoo Yearb* 41: 1–11
- 宇根有美 (2007) 第4章日本におけるカエルツボカビの現状, 第2項 飼育下両生類における感染状況, 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, 爬虫類・両生類の臨床と病理に関する研究会編, 神奈川.
- 菊野理津子, 笹原武志, 関口朋子, 高橋晃, 曾我英久, 青木正人, 佐藤義則, 高山陽子, 北里英郎, 井上松久 (2004) 銅イオンの *Cryptosporidium parvum* オーシスト感染性に対する不活化効果, *感染症誌*. 78: 138–140
- 岸田直裕, 島崎 大, 小坂浩司, 小菅瑠香, 秋葉道宏, 林謙治 (2013) 銅を用いた水中の微生物の不活化技術の現状と課題, *日本公衆衛生雑誌*. 60: 579–585
- 玉城英信, 吉里文夫 (2007) クルマエビのフサリウム症に対する銅イオン発生装置の効果, 平成 18 年度沖縄県水産海洋研究センター事業報告書. 112–115
- 藤本 宏・岩本明雄 (2007) 銅イオン発生装置によるトラフグのビブリオ病防除の可能性, *栽培漁業センター技報*. 16–18
- 松尾 太嗣 (2007) 銅イオンにおける *Vibrio* 属細菌の制御, 愛媛県立宇和島水産高等学校水産増殖科専攻科紀要. 13: 77–80
- 三浦正之, 大野平祐, 土田奈々, 畑井喜司雄, 桐生透 (2005) 銅ファイバー浸漬によるニジマス卵のミズカビ病の防除, *魚病研究*. 40: 81–86
- 山本義和, (1979) 4. 薬理作用, 水生生物と重金属銅, [1] 尾崎久雄監修, pp107–138, サイエンティスト社, 東京.
- Underwood EJ (1975) Trace elements in human and animal nutrition. 微量元素・栄養と毒性, 日本化学会訳編, pp57–111, 丸善出版, 東京.

Summary

Epidemiological and Clinical Studies of the Amphibian Chytrid Fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in Exotic Amphibians

The animal trade has aided in pathogen dispersal and has frequently been the cause of pandemics such as SARS, H5N1, avian influenza, and koi herpes. Its effects may be sufficiently significant to cause declines in wild populations as well as serious economic losses around the world. *Batrachochytrium dendrobatidis*, a fungus which belongs to the Chytridiomycetes class of the Chytridiales order of fungi and which was first described in 1999, causes chytridiomycosis, a disease which infects amphibians. This fungus is responsible for the decline or extinction of more than 20 families and 200 species of amphibians.

Abroad, the International Union for Conservation of Nature (IUCN) has designated *B. dendrobatidis* a pathogen that requires global monitoring and specific study in order to determine its role as a causative factor of chytridiomycosis, and also to evaluate its effects on ecological systems. *B. dendrobatidis* is also listed in the obligatory Aquatic Animal Health Code published by the World Organization for Animal Health (OIE). The first cases of chytridiomycosis in Asia were confirmed in captive exotic amphibians in Japan by Une et al. (2007), with some of the cases resulting in death. Japan is home to 63 species of amphibians, 40 species of anurans, and 23 species of urodeles, including endemic species. Of these, 42 species (67%) are listed as endangered and near-threatened on the Red List compiled by the Ministry of the Environment of the Government of Japan.

B. dendrobatidis has a broad host range, is highly infectious, and has a high fatality rate. *B. dendrobatidis* zoospores can spread through water and cause infection rapidly over a wide area. To date, however, no studies have sought to determine the prevalence of *B. dendrobatidis* in imported exotic amphibians in Japan. In addition, the prevalence of *B. dendrobatidis* in captive amphibians is unknown, and, moreover, treatment methods and elimination techniques for chytridiomycosis have yet to be established for many of the amphibian species at risk of infection.

The aim of this study was to survey imported and captive exotic amphibians in Japan in order to determine the prevalence of *B. dendrobatidis*, and to establish chytridiomycosis treatment and *B. dendrobatidis* elimination techniques. An additional goal was to decrease the threat of *B. dendrobatidis* infection in endemic Japanese amphibians.

This study consists of three areas of research, described in Chapters 1 to 3, respectively.

Chapter 1. *B. dendrobatidis* Prevalence and Haplotypes in Domestic and Imported Pet Amphibians in Japan.

In order to clarify the infection status of *B. dendrobatidis*, we surveyed amphibians imported into Japan and those held in captivity for a long period or bred in Japan. Between 2008 and 2011, samples were taken from 820 individuals of 109 amphibian species and were analyzed using nested-PCR assays. A total of 76 samples (9.3%) from these 820 amphibians were identified as *B. dendrobatidis*-positive. Although *B. dendrobatidis* prevalence was 6.9% (18/259) in sampled amphibians from private collections and those commercially bred in Japan, it was 10.3% (58/561) in imported amphibians.

The high prevalence of *B. dendrobatidis* in imported animals is possibly a result of the increased opportunity for infection due to the high density of individuals in closed environments in the distribution process, particularly breeding facilities, as well as reduced immunity, resulting from the stress of living in an environment different from their natural habitats.

Both captive amphibians and those from the pet trade that were surveyed for this study included a significant number of healthy *B. dendrobatidis* carriers.

We identified the genotypes of this fungus using partial DNA sequences of the internal transcribed spacer (ITS) region. Sequencing the PCR products of all 76 *B. dendrobatidis*-positive samples revealed 11 haplotypes. The species infected with the greatest variety of haplotypes was the Japanese-bred *Xenopus laevis*, in which haplotypes A, C, Q, and V were detected. This finding supports the contention that *Xenopus laevis* is a key *B. dendrobatidis* host species.

Whereas five haplotypes, A, C, Q, V and Bd28, were detected in captive Japanese amphibians, the proportion of *B. dendrobatidis* haplotypes found in samples from Japan differed from that of those from other

countries. Haplotype A (DNA Data Bank of Japan accession number AB435211) was found in 90% (52/58) of imported amphibians. Haplotype A is a hypervirulent strain of the global panzootic lineage (*Bd*-GPL). In contrast, we respectively detected haplotypes C, A, V, Q, and Bd28 in 44%, 28%, 17%, 5.6%, and 5.6% of the sample collected in Japan. On the basis of these results, we determined the diversity of *B. dendrobatidis* ITS haplotypes in Japan. The exotic amphibians, which had been kept in captivity for a long period of time, would most likely have come into contact with native amphibians during transport and at rearing facilities, allowing the formation of a variety of haplotype phases.

Nine *B. dendrobatidis* haplotypes (A, C, E, L, Q, V, Bd28, Bd38, and Bd41) were detected in amphibians originating from Asia, whereas only three (A, Bd29, and Bd43) were detected in amphibians from outside of Asia. It is clear that Asian amphibians are infected with a high diversity of *B. dendrobatidis* haplotypes, a fact that supports the “Chytrid out of Asia” hypothesis described by Goka (2009).

Chapter 2. Treatment of Spontaneous Chytridiomycosis in Captive Amphibians Using Itraconazole.

In Chapter 1, it was mentioned that exotic amphibians imported for the pet trade had a *B. dendrobatidis* prevalence of 10.3%, and that we confirmed infection and die-off from chytridiomycosis. *B. dendrobatidis* infects amphibians not only through direct contact but also through *B. dendrobatidis* zoospores in water, which can cause rapid widespread infection. One particular set of chytridiomycosis-infected amphibians released a large number of zoospore, necessitating the urgent development of treatment methods and elimination techniques for chytridiomycosis.

In Chapter 2, we describe the development of an effective, simple, and safe treatment method that targets clinical cases of chytridiomycosis in various amphibian species. The subjects were 12 amphibians (11 anurans of 4 different species and 1 urodela) diagnosed with chytridiomycosis by clinical signs, microscopic findings of shed skin, and a PCR assay. The treatment protocol consisted of a 10-minute immersion in a 0.01% aqueous solution of itraconazole every other day for a total of 7 treatments. We evaluated the efficacy of the treatment using 3 methods: clinical signs, direct microscopy, and a nested-PCR assay. In addition, re-examination was performed to confirm the elimination of chytridiomycosis after treatment (20–57 days, average 34.4 days). As a result, we succeeded in curing 11 of the amphibians of chytridiomycosis and

eliminating *B. dendrobatidis*. Recurrence of chytridiomycosis has not been observed in the past 12 months. This protocol is the first treatment method to cure a caudata of chytridiomycosis. Using the same protocol, coauthor Dr. Une et al. (2012) succeeded in eradicating *B. dendrobatidis* in a Japanese giant salamander (*Andrias japonicus*), an endangered species considered to be a special natural monument of Japan. Therefore, we recommend this as a proven treatment method and elimination technique for chytridiomycosis for use in captive amphibians, including caudata.

Chapter 3. Efficacy of Copper Ions (Cu^{2+}) for Eradicating *B. dendrobatidis* : Assessment of Cu^{2+} on the African Clawed Frog (*Xenopus laevis*).

In Chapter 2, we described the successful development of a method for treating chytridiomycosis in anuran and caudata. Although the medicinal agent used in that research, Itraconazole, is costly when employed to treat humans, it is very effective for treating chytridiomycosis. In the case of amphibians, test animals were placed in small, individual containers, enabling total immersion in the chemical agent and maximizing the cost performance of the medicine.

Although this method is well suited for treating terrestrial amphibians, because of the complexity and high cost of managing breeding water, it is not suitable for treating the African clawed frog (*Xenopus laevis*) or other aquatic amphibians. The African clawed frog is an important laboratory animal that is widely used in biology, genetics, embryology and other fields around the world. The African clawed frog is also an important natural host and carrier of *B. dendrobatidis*. Indeed, some studies have proposed that the pervasiveness of the African clawed frog may have facilitated the global spread of *B. dendrobatidis*. As discussed in Chapter 1, *B. dendrobatidis* was detected in 26.9% of African clawed frogs surveyed and there is currently no established method for eradicating *B. dendrobatidis* in this species.

In this Chapter, we focus on the use of copper ions (Cu^{2+}) as a safe, simple, inexpensive and effective method for eradicating *B. dendrobatidis* in the African clawed frog. Cu^{2+} is already used to control bacterial and fungal diseases in fisheries. A previous study demonstrated the application of a 0.006 ppm Cu^{2+} solution to control *Saprolegnia*, a fungus which infects fish eggs. Une et al. (unpubl. data) used a *B. dendrobatidis* strain to examine the effect of Cu^{2+} on *B. dendrobatidis* in vitro, and found that 1 ppm of Cu^{2+} could inhibit

fungal growth, while 5 ppm or more could prevent fungal proliferation.

We therefore set out to assess the sensitivity of African clawed frogs to Cu^{2+} and to investigate the application of Cu^{2+} as means of eradicating *B. dendrobatidis*. We prepared a copper standard solution for the control group as well as six additional Cu^{2+} solutions with ion concentrations ranging from 0.02 to 19.68 ppm. The effects of Cu^{2+} on the African clawed frog were determined by observing physical changes (including changes in the breeding water), measurement of the 50% lethal time (LT_{50}), blood biochemistry, and histopathological examination. No deaths were observed after exposure to the 0.02 ppm Cu^{2+} solution, one animal died after 239.5 hours of exposure to the 0.21 ppm solution, and half of the animals died after 287.6 hours of exposure to the 0.31 ppm solution; in other words, LT_{50} and Cu^{2+} are inversely proportional, with LT_{50} decreasing as the Cu^{2+} concentration increases.

The optimum Cu^{2+} concentration of viable African clawed frog is therefore considered to be approximately 0.2-0.3 ppm. However, even in the 0.21 ppm group, the breeding water at the end of the experiment was very cloudy due to excessive mucus secretion and/or the presence of sloughed skin. Histopathological examination of the skin revealed acanthosis, mild hyperkeratosis and detachment of the cornified layer in the low Cu^{2+} concentration group. There were severe changes in skin structure, such as intercellular dissociation accompanied by single cell necrosis, cleft formation between the epidermal cells, and reticular degeneration in the epidermal layer in the high Cu^{2+} concentration group. These findings indicate that Cu^{2+} is capable of harming a specimen being treated, even at 0.21 ppm, and that the severity of any damage could be expected to increase with continued exposure.

The results described in this Chapter therefore show that Cu^{2+} concentrations of 0.2 ppm or higher damage the skin of amphibians. At higher concentrations, Cu^{2+} may cause chemical burns which result in protein denaturation and corrosion of the skin as well as blood electrolyte abnormalities, which result in the damaged skin being unable to function effectively in osmoregulation. Blood enzyme activities will also increase dramatically as the Cu^{2+} concentration increases and the solution becomes toxic. Thus, these findings show that Cu^{2+} is not well suited for eradicating *B. dendrobatidis*. However, Cu^{2+} can inhibit the proliferation of *Saprolegnia* at 0.006 ppm and *Vibrio* bacteria at 0.1 ppm.

Culturing *B. dendrobatidis* is very difficult and establishing the first strain in Japan took one year.

The reason it was so time-consuming was because bacteria from the surface of the frog skin could not be removed from the culture medium. However, it may now be possible to supplement the culture medium with Cu^{2+} and create a selective medium for *B. dendrobatidis*.

We have clarified the extent of *B. dendrobatidis* infection in amphibians introduced to Japan from abroad using a molecular biology approach, and have established a method for treatment and eliminating spontaneous chytridiomycosis. The findings from this research now provide us with a method for preventing the proliferation of *B. dendrobatidis* in captive amphibians and show promise for developing medical treatments for wild amphibians threatened by chytridiomycosis.