

氏名(本籍)	田 向 健 一 (東京都)
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	乙第 431 号
学位授与年月日	平成 26 年 7 月 28 日
学位授与の要件	学位規則第 3 条第 3 項該当
学位論文題名	外来性両生類におけるカエルツボカビ (<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>) の疫学および臨床学的研究
論文審査委員	(主査) 宇 根 有 美 (副査) 斑 目 広 郎 村 上 賢

論 文 内 容 の 要 旨

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。両生類のみに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を中心に行われ、これを受けて国際獣疫事務局は国際的な監視を必要とする病原体に指定した。

我が国では、国内初、同時にアジア初の *B. dendrobatidis* が 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放逐されることがあり、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* 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*

の在来種への脅威を軽減することを目的とする。本研究は以下の3つの章より成っている。

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。輸入両生類の保菌率は10.3% (58/561)であり、日本国内で長期飼育ないし商業的に繁殖された両生類の保菌率は6.9% (18/259)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、本種が *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つの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。他国ではhaplotype Aが90%と多く、日本では、haplotype C 44%、A 28%、V 17%、Q 5.6%、Bd28 5.6%と様々な割合で検出され、国内の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9haplotype (A, C, E, L, Q, V, Bd28, Bd38, Bd41)、後者はわずか3haplotype (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2章 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（内訳は無尾目 4 種 11 匹、有尾目 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 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。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。

第 3 章 *Batrachochytrium 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 2 章で、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、国内外で本種の *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。 Cu^{2+} は、水産分野において、細菌・真菌性疾患の防除に広く利用されており、特に魚卵に発生するミズカビ (*Splrognia* 属菌) に対して Cu^{2+} 0.006 ppm 処置で効果があるとの報告がある。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、 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、 Cu^{2+} 濃度 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（LT₅₀）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 Cu²⁺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 匹が死亡した（n=6）。0.31 ppm 群では、287.6 時間で半数が死亡し（n=6）、Cu²⁺濃度が上昇するに従って LT₅₀の時間が短縮した。以上より、アフリカツメガエルの Cu²⁺生存可能な濃度は 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 Cu²⁺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。

本章の実験から、Cu²⁺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 Cu²⁺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、*Spleregnia* 属菌は Cu²⁺0.006 ppm、*Vibrio* 属細菌は Cu²⁺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、Cu²⁺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。

論文審査の結果の要旨

Batrachochytrium dendrobatidis は 1999 年新種記載された真菌である。少なくとも現在までに 20 科 200 種以上の両生類に感染し、ツボカビ症を引き起こし、個体数の減少や絶滅に関与したとされる新興病原体である。そのため、国際獣疫事務局は生態系保全への脅威になるとして、国際的な監視を必要とする重要な病原体に指定した。我が国では、国内初、同時にアジア初の *B. dendrobatidis* が、2006 年ペット用外来性両生類の集団死事例から見出された。本発見に、田向健一氏も携わっており、この発見を機に *B. dendrobatidis* の研究を始めた。

近年、世界的規模での感染症の流行には、物流の迅速化、大規模化および広域化が重要な役割を担っており、特に生きた動物の移動が病原体拡散を増長しているとされている。日本には、毎年 5,000 匹を超える両生類が輸入されているが、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、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。本論文は、3章から構成されており、各章の成績は以下のように要約できる。

【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年の間に採取した両生類820匹の体表ぬぐい物より、nested PCR法で *B. dendrobatidis* 遺伝子を検出、塩基配列を解析した。結果、820匹中76匹(9.3%)から本菌を検出した。輸入両生類の保菌率は10.3% (58/561)であり、日本国内で長期飼育ないし商業的に繁殖された両生類の保菌率は6.9% (18/259)であった。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。また、塩基配列解析によって陽性サンプル76は11のhaplotypeに型別された。そして、輸入両生類の52/58(90%)が、海外で最も広く分布している高病原性系統haplotype Aであった。さらに、haplotypeの数や割合は国によって異なり、アジア地域では、9種類と他地域より多く、さらに日本は、最も多くの5haplotypeを、種々の割合で検出した。これらの結果より、国内の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。

【第2章】自然発生性ツボカビ症に対するイトラコナゾールを使った治療に関する研究

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、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12匹(内訳は無尾目4種11匹、有尾目1種1匹)である。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。検査は治療中、治療直後および治療後(20-57日、平均34日)に、前述の方法で判定した。その結果、12匹中11匹の治療と除菌に成功し、副作用も再発は認められなかった。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。

【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2章で、無尾目および有尾目のツボカビ症の治療法確立に成功したが、本除菌法はアフリカツメガエルなどの完全水棲で、かつ多頭飼育される両生類には、コスト面などから適用できないため、第3章では、アフリカツメガエルを供試動物として、水産分野において、細菌・真菌性疾患の防除に利用され、かつ *in vitro* において、ある一定の濃度で、*B. dendrobatidis* の増殖抑制あるいは阻止を示す Cu^{2+} に注目して、 Cu^{2+} のアフリカツメガエルへの影響を評価した。実験は、対照群、 Cu^{2+} 濃度 0.02 ppm から 19.68 ppm まで 6 段階の濃度で行い、身体的変化の観察、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、アフリカツメガエルの Cu^{2+} 耐性可能な濃度は 0.2–0.3 ppm と推定した。*B. dendrobatidis* は Cu^{2+} 1 ppm で増殖抑制が起きるため、本研究結果を考慮すると 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、ミズカビは Cu^{2+} 0.006 ppm、*Vibrio* 属細菌は 0.1 ppm で増殖抑制効果があるとされる。一方、*B. dendrobatidis* 培養に際して、皮膚表面の雑菌が培養を困難にしている。このため、 Cu^{2+} の培地への添加が選択培地となり、*B. dendrobatidis* の培養を容易にするかもしれない。

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。よって、獣医学上意義ある業績として評価できることから、博士（獣医学）の学位を授与するのにふさわしい研究と判定した。