

カエルツボカビ (*Batrachochytrium dendrobatidis*) の
起源およびツボカビ症の病理発生に関する研究

**The study on origin of chytrid fungus
(*Batrachochytrium dendrobatidis*) and of pathogenesis
of chytridiomycosis**

2016年 2月

麻布大学大学院 獣医学研究科

獣医学専攻 博士課程

動物疾病制御学 生体疾病制御学 獣医病理学

DV1201 嘉手苺 将

目次

| | |
|---|----|
| 緒論 | 1 |
| 第1章 ウシガエル幼生における口器ツボカビ症および検査法の確立 ... | 5 |
| 第1節 序論 | 5 |
| 第2節 材料および方法 | 6 |
| 第3節 結果 | 10 |
| 第4節 考察 | 12 |
| 図表 | 15 |
| 第2章 ウシガエル幼生におけるカエルツボカビ感染の季節変動の把握 .. | 20 |
| 第1節 序論 | 20 |
| 第2節 材料および方法 | 20 |
| 第3節 結果 | 21 |
| 第4節 考察 | 21 |
| 図表 | 24 |
| 第3章 野生下ウシガエル幼生を対象としたカエルツボカビの国内分布と 遺伝子型 | 26 |
| 第1節 序論 | 26 |
| 第2節 材料および方法 | 27 |
| 第3節 結果 | 29 |
| 第4節 考察 | 30 |
| 図表 | 33 |
| 第4章 カエルツボカビ感染が皮膚水吸収に与える影響 | 41 |
| 第1節 序論 | 41 |
| 第2節 材料および方法 | 42 |
| 第3節 結果 | 45 |
| 第4節 考察 | 46 |
| 図表 | 48 |
| 総括 | 53 |

| | |
|------------|----|
| 引用文献 | 56 |
| 要旨 | 63 |
| 英文要旨 | 67 |
| 謝辞 | 72 |

緒 論

カエルツボカビ (*Batrachochytrium dendrobatidis*) およびツボカビ症について

カエルツボカビ (*Batrachochytrium dendrobatidis*) は、ツボカビ門 (Chytridiomycota)、ツボカビ綱に属する真菌であり、1999年に新種記載された新興病原体である (Longcore et al., 1999)。

カエルツボカビの生活環は遊走子嚢 (zoosporangium) および遊走子 (zoospore) の2形態からなり、宿主両生類の角質層 (ケラチン層) に感染する (Longcore et al., 1999; Marantelli et al., 2004)。遊走子嚢は球状または長球形で、筒状の放出管 (discharge tube) を有している。遊走子嚢は宿主の角質層内に形成され、放出管を外界に突出させる。遊走子内には最大 300 個ほどの遊走子が形成され、遊走子は放出管を介して、外界 (水中) に放出される。遊走子は直径 1~2 μ l の球状で後方に鞭毛を有し、水中を遊泳して宿主に到達し、宿主の角質層に感染する (Longcore et al., 1999)。よって、主な感染経路は水系および接触感染である (Pessier et al., 1999; Berger et al. 1999)。その他、個体同士の接触、カエルツボカビに汚染された土壌などを介して感染する (Pessier et al., 1999; Berger et al. 1999)。

無尾類における角質層の分布は発育ステージによって異なるため、当然、カエルツボカビの感染部位も変わり、病態が異なる。無尾類成体 (カエル) では、全身の皮膚に角質層が分布しており、カエルツボカビは皮膚全般に感染する。なかでもカエルツボカビに汚染された水や地面と接触する腹部、腹側大腿部および指端に感染しやすい (Pessier et al., 1999; Berger et al., 2005; Puschendorf et al., 2006)。無尾類幼生 (オタマジャクシ) では口器にのみ角質層が限局しているため、カエルツボカビは口器に感染する (Obendorf, 2005; Symonds et al., 2007; Fellers et al., 2001; Rachowicz et al., 2004)。このため、無尾類成体では皮膚ツボカビ症、幼生では口器ツボカビ症を発症する。

皮膚ツボカビ症は、臨床的には広範囲にわたる異常な脱皮を特徴とし、その他、食欲不振、縮瞳、異常な姿勢、立ち直り反射の消失などが認められる (Nichol et al., 2001; Pessier et al., 1999)。病理組織学的特徴は皮膚のみに認められ、表皮角質層の肥厚 (角化亢進、不全角化)、表皮過形成、表皮細胞の壊死が観察される (Pessier et al., 1999; Nichol et al., 2001)。肥厚した角質層にはカエルツボカビの遊走子嚢が主として球状構造物として、ときに放出管を外界に突出させた壺状またはフラスコ様構造物として観察され、遊走子嚢内には遊走子が形成される (Pessier et al., 1999; Une et al., 2008)。

口器ツボカビ症は、肉眼的に嘴の色素消失、色素沈着層の菲薄化、歯列の色素消失などが認められ、組織学的に、カエルツボカビ感染と、それに関連する

色素沈着層における色素の減少または消失、角質層の肥厚および上皮細胞の過形成、変性を特徴としている (Obendorf, 2005; Symonds et al., 2007; Fellers et al., 2001; Rachowicz et al., 2004)。

カエルツボカビが両生類相に与えた影響

生物種の世界的かつ急速な減少が問題となっている昨今、両生類の減少は最も突出しており、少なくとも記載種の41%が絶滅の危機に瀕している

(Monastersky, 2014)。その理由として生息地の減少、農薬の影響、乱獲、温暖化などと共にカエルツボカビ感染が挙げられており (Berger et al., 1998; Stuart et al., 2004)、世界各地で両生類の種類および個体数を大きく減少させたとされる。カエルツボカビは350種類以上の両生類に感染し、200種類以上の減少に関与している (Fisher et al., 2009)。特にカエルツボカビによるパナマとオーストラリアの被害は甚大である (Berger et al., 1998; Lips et al., 2006)。パナマにおける野外調査 (Lips et al., 2006) によると、2004年10月に初めてカエルツボカビの感染を認めてから2005年2月までの5ヵ月間に両生類の大量死が確認されている。この調査でカエルツボカビの感染が確認された種類は無尾類38種類で、これは現地に生息する種類の57%に及ぶものであった。このようにカエルツボカビは両生類に対し、世界各地で甚大な被害を及ぼすことから、国際獣疫事務局 (World Organization for Animal Health: OIE) はツボカビ症を監視すべき疾病としてリストアップした (OIE-listed diseases 2015)。

カエルツボカビの国内状況

2006年12月、我々は、日本はもとよりアジアで初めて飼育下両生類にツボカビ症を発見した (Une et al., 2008)。その後、カエルツボカビの在来両生類への影響を危惧し、環境省と共同研究者の五箇公一博士は、国内野生下両生類を対象とする全国調査を実施し (Goka et al., 2009)、さらに、我々は国内野生下両生類の大量死事例における病性鑑定を行い (工藤ら, 2011)、次の4点を明らかにした。

- ① 国内野生下両生類 49 種類 (外来種 2 種類を含む)、2,103 匹におけるカエルツボカビ感染率を調査したところ、既にカエルツボカビが感染していた。しかし、その感染率は 8 種類、87 匹 (4.1%) と非常に低く、在来種では、オオサンショウウオ (*Andrias japonicus*)、シリケンイモリ (*Cynops ensicauda*)、ヌマガエル (*Fejervarya limnocharis*)、アマガエル (*Hyla japonica*)、トノサマガエル (*Rana nigromaculata*) およびツチガエル (*Rana rugosa*) の 6 種類にしか感染が認められなかった。
- ② 日本固有種であるオオサンショウウオと沖縄固有種であるシリケンイモリ

- には、それぞれ37%および50%と高率にカエルツボカビが感染しており、さらにこれらの2種類の保有するカエルツボカビの **haplotype**は、オオサンショウウオがB、J、K typeのみ、シリケンイモリがA、E、I、W typeのみであった。
- ③ 外来両生類であるウシガエル (*Lithobates catesbeiana*) およびアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) にも約16%の感染を認め、さらにウシガエルの保有する **haplotype**は7種類と多様であった。
- ④ 日本ではカエルツボカビによる両生類の大量死が起きていない。
- これらの特徴は、カエルツボカビの被害を受けている諸外国の状況とは大きく異なっている。このことから、Goka et al.は「カエルツボカビは日本およびアジアを起源とし、世界中に拡散した」というアジア起源説を提唱した。

カエルツボカビの疫学的研究および病理発生に関する研究の現状

カエルツボカビのように生態系に多大な影響を与える感染症を制御するためには、生態系への影響を評価すると共に、病理発生機序を解明する必要がある。そのため、現在、生態系への影響を評価する疫学的研究が盛んに行われている。なかでも分子疫学的研究は、Goka et al. がアジア起源説を提唱したことを機に、多くの国や研究者から報告が相次いでいる。しかし、Goka et al.の全国調査では、前述のとおり、総感染率が4.1%と低く、また、アジア諸外国におけるカエルツボカビの状況が明らかにされていなかったため、アジア起源説という仮説を証明するに至らなかった。その後、アジア諸国における疫学調査結果が報告されたが、これらのアジア諸国に共通している状況は、大量死が認められず、**haplotype** が多数確認されていること、そして、総じて感染率が低いことであり、未だアジア起源説の結論は得られていない (Bai et al., 2012; Bataille et al., 2013)。アジア起源説を検証するためには、ある一定以上の感染率を維持し、多くの種類のカエルツボカビが感染する適切なモニター動物を用いて、カエルツボカビの地理的分布と種類を解析することで、固有 (**endemic**) の病原体であることを確認する必要がある。

一方、ツボカビ症の病理発生機序に関する研究は非常に乏しく、カエルツボカビ感染により、カエルに血液の電解質異常が引き起され、心不全によって死亡するといった機序 (Voyles et al., 2007; Voyles et al., 2009) が報告されているのみである。しかし、これは死因を特定しただけに過ぎない。両生類は皮膚を介して水や電解質を取り込み、ガス交換を行うという非常に特徴的な生理機能を有している (Hillman et al., 2009)。よって、病理発生機序を解明するためには、カエルツボカビの感染から心不全に至る過程におけるこれらの生理的機能の破綻を証明する必要がある。

本研究の目的

本研究の目的は、アジア起源説を念頭に入れて、カエルツボカビの国内分布および検出された本病原体の遺伝子型解析からカエルツボカビの由来を解明すること。さらに、無尾類の皮膚における生理学的特徴の1つである皮膚に分布する水チャネル、アクアポリンに注目して皮膚ツボカビ症の病理発生を解明することである。

第1章 ウシガエル幼生における口器ツボカビ症および検査法の確立

第1節 序論

国内自然界におけるカエルツボカビ分布に関する研究は、2007年にGoka et al.が行った調査報告のみである (Goka et al., 2009)。この報告では、外来種2種 (ウシガエル、アフリカツメガエル) と特定の在来種 (シリケンイモリとオオサンショウウオ) の感染率は12.5~50%と高かったが、その他在来種の感染率 (ツチガエル、アマガエル、トノサマガエルおよびヌマガエル) は0.4~0.8%と非常に低かった。カエルツボカビの国内分布を明らかにするためには、調査に適したモニター動物を選択し、かつ適切な検査法によって感染を確認する必要がある。第1章では、モニター動物の選定と検査法の確立を行った。そして、モニター動物は次の3つの条件を満たす動物が望ましいと考えた。

- ① 日本に広く分布していること
- ② カエルツボカビに易感染性であること、すなわち、カエルツボカビに対して感受性があり、保有する **haplotype** に偏向がないこと。そして、カエルツボカビの感染率が高いこと
- ③ 採取が容易で、保護動物 (捕獲制限のある動物) でないこと

我々は、上記の条件を満たすモニター動物として、ウシガエル幼生に着目した。すなわち、先の Goka et al.の調査で、在来種であるシリケンイモリとオオサンショウウオの感染率は高かったが、いずれも国内での分布は限局的である。さらに、オオサンショウウオは特別天然記念物の動物であるため、検査対象にはなりえない。外来種では、アフリカツメガエルは感染率 18%と高いが、その **haplotype** は A type しか確認されていない。一方、ウシガエルには感染率 13%で、8種類の **haplotype** (A、D、E、F、H、L、O、Y) が認められている。さらに、ウシガエルは北海道道南部~沖縄まで、ほぼ全国に分布している (前田憲男ら, 1989)。しかし、ウシガエルの成体は大型で、警戒心と跳脚力が強く、採集が困難である。一方、幼生個体の採取は、生息池によっては捕獲網で1回すくうだけで十数匹捕獲できるほど容易である。さらに、カエルツボカビは、無尾類幼生では唯一、角質層が分布する口器にしか感染しないため、口器に限定した検査で事足りる (Berger et al., 1998; Hyatt et al, 2007; Marantelli et al., 2004; Symonds et al., 2007; Obendorf, 2005)。このため、OIEによっても幼生の検査法として推奨されている (OIE Infection with *Batrachochytrium dendrobatidis*)。しかし、両生類の種類によっては有効でない可能性があり、既報の無尾類幼生の口器ツボカビ症は、それぞれ、研究が行われた地域の固有種であり、日本では無尾類幼生におけるカエルツボカビ感染および口器ツボカビ症の報告はなく、日本在来種に有効であるかどうかも分からない。さらに、日本は諸外国と異なり、

カエルツボカビの *haplotype* の種類が多く (Goka et al., 2009)、*haplotype* それぞれの病原性が不明で、病変が形成されるか否かもわからない。よって、我々は国内におけるウシガエル幼生の口器ツボカビ症を確認することで、ウシガエル幼生のモニター動物としての有用性を検討した。

併せて、第 1 章では、的確にカエルツボカビを検出する方法についても検討した。

無尾類幼生におけるカエルツボカビの一般的な検出法としては、口器を拭った滅菌綿棒 (swab) を材料とした PCR 検査 (swab PCR 法)、切除した口器組織を材料とした PCR 検査 (組織 PCR 法) および切除した口器を病理組織学的に観察する病理組織検査がある。PCR 検査には、主として quantitative TaqMan PCR 法 (TaqMan PCR 法) が採用されている。今までに、無尾類幼生を対象とした検査法に関する報告では、swab および切除した口器を対象として TaqMan PCR 法で検出率を比較している (Hyatt et al., 2007, Retallick et al., 2006)。しかしながら、TaqMan PCR 法は、世界流行株しか検出できないとされる。一方、日本で確認されたカエルツボカビの *haplotype* は多様性に富んでいる。そのため、Goka et al.によって、TaqMan PCR 法よりも多種類の *haplotype* を検出でき、さらに、検出感度および特異性の高い nested PCR 法が開発された (Goka et al., 2009)。実際に感度は、TaqMan PCR 法の DNA 最小検出量が 0.01pg であるのに対し、Nested PCR 法は 0.001pg である (Goka et al., 2009)。また、検出可能なカエルツボカビの *haplotype* は、TaqMan PCR 法では 4 種類であるのに対し、Nested PCR 法は 26 種類検出できることが報告されている (Goka et al., 2009)。加えて、本検査法の特異性は非常に高く、*Boothiomycetes* sp. などカエルツボカビ近縁種 15 種類と鑑別できるとされる (Goka et al., 2009)。しかしながら、nested PCR 法を用いた swab PCR 法と組織 PCR 法の検出感度を比較した報告はない。カエルツボカビの国内分布状況を正確に調査するためには、有効な検査法を用いる必要がある。そこで、swab および組織を材料とする nested PCR 法の感度について、特異性の高い病理組織検査法とあわせて比較検討した。

第 2 節 材料および方法

2-1 カエルツボカビ研究におけるウシガエル幼生の有用性の検討

ウシガエル幼生の口器ツボカビ症の病理像を明らかにすることを目的とし、一生息池からウシガエル幼生 59 匹を採集し、これらの口器を肉眼的に観察し、nested PCR 法 (swab、組織) および病理組織検査間で特異性、検出感度を比較した。

2-1-1 検体

2010年5～7月、神奈川県相模原市の一級河川である相模川の止水域（北緯35.561379度、東経139.323111度）で、野生のウシガエル幼生（Gosner Stage25-41）（Gosner, 1960）を無作為に59匹採取した。すべての個体は採集後、実験室にて魚類・甲殻類麻酔剤 オイゲノール0.1%（FA100、販売元：大日本製薬株式会社、製造元：田村製薬株式会社）を用いて5分間、浸漬麻酔した後、脊髓破壊法にて安楽死した。その後、動物の頭尾長および体重の測定ならびに口器の肉眼写真を撮り、肉眼検査を行った。その後、分子生物学的検査（nested PCR法）のために口器を滅菌綿棒（メンティップ1P1501、日本綿棒株、埼玉）で拭い、拭った綿棒（swab）は1.5mlチューブに保存し、検査を行うまで-20℃で保管した。Swab採取後、病理組織検査のために口器を前額断にて切除し、10%中性緩衝ホルマリンに固定した。

2-1-2 肉眼検査

肉眼検査は上下嘴、上下歯列の4部位に分けて次のように評価した。嘴の色素消失は、1カ所：Grade1、2カ所：Grade2、3カ所または50%以上：Grade3と評価した。色素沈着層の菲薄化は、50%程度：Grade1、>50%：Grade2と評価した。歯列においては色素消失（淡明化）の有無を記録した。その他、嘴の部分欠損や変形も記録した。

なお、無尾類幼生の口器の構造は、種類によって、若干異なるが、①上下の嘴、②上下の歯列、③辺縁乳頭の基本構造は同一である。そして、嘴は大量の黒色素を含み、黒色を呈している。歯列には「色素(pigment)」または「歯(teeth)」と称される黒色素を多く含み、黒色を呈する突起構造が列をなして萌出している。辺縁乳頭は口器の最外側に位置し、ひだ状の構造として認められる(Fig. 1-2, a)。

2-1-3 病理組織学的検査

ホルマリン固定後の口器を正中矢状断後、常法に従いパラフィン包埋、3～4μmに薄切し、組織標本作製した。組織標本は常法に従い、HE染色を行い、また、必要に応じてファンギフローラY染色（真菌の細胞壁を構成するβ構造を有する多糖類を特異的に染めるマーカー、バイオメイト、東京）および免疫染色を施し、鏡検した。

ファンギフローラY染色はマニュアルに従って染色した。

免疫染色では、薄切した切片をシランコーティングスライドガラスに貼り付け、37℃インキュベーターにて48時間以上乾燥させたものを組織標本として使

用した。組織標本をキシレンで脱パラフィン、下降アルコール系列にて再水和し、水道水による流水後、蒸留水に浸漬した。その後、内因性ペルオキシダーゼを不活化するために 0.3%過酸化水素加メタノールに浸漬、50%エタノールを通して流水、蒸留水に浸した後、PBS (0.01M Phosphate-buffered saline, pH7.4) で各 5 分間、3 回洗浄した。次いで、抗原賦活化のために 0.01M クエン酸緩衝液 (pH6.4) に浸した組織標本をマイクロウェーブにて 90°C、9 分加熱した後、非特異反応阻止のために湿潤箱内にて、5%スキムミルク (和光純薬、大阪) を滴下し、20 分間、静置した。その後、一次抗体として当研究室で作製した抗カエルツボカビ家兔血清・1% BSA 加 PBS (1:100) 希釈液を滴下し、湿潤箱内、4°C にて一晩反応させた。二次抗体には、ペルオキシダーゼ標識抗体 (ヒストファイン シンプルステイン MAX-PO (MULTI)、(株)ニチレイバイオサイエンス、東京) を滴下し、室温 60 分間反応させた。その後、PBS で各 5 分間、3 回洗浄後、抗原抗体反応を可視化させた。抗原抗体反応の可視化には、0.04%過酸化水素添加・0.05M トリス塩酸緩衝液 (pH7.6) 希釈 3-3'ジアミノベンチジン四酸塩に浸漬させ室温 1~2 分反応させた。その後、水洗し、対比染色としてヘマトキシリン染色を施した。

2-1-4 分子生物学的検査 (Nested PCR)

採取した swab から DNA 抽出キット NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel, Duren, Germany)を用いて、マニュアルに従い、DNA を抽出した。

PCR 検査には、従来カエルツボカビの検査に用いられている TaqMan PCR 法よりも検出感度が高く、多様な haplotype の検出に優れた nested PCR 法を用いた (Goka et. al. 2009)。一次反応では、プライマーBd18SF1 (5'-TTT GTA CAC ACC GCC CGT CGC-3') および Bd28SR1 (5'-CAT GGT TCA TAT CTG TCC AG-3') を用いて、18s rDNA-ITS1-5.8s rDNA-ITS2-28srDNA 間 (約 800~1000bp) を増幅した (Fig. 1-1)。二次反応では、プライマーBd1a (5'-CAG TGT GCC ATA TGT CAC G-3') および Bd2a (5'-CAT GGT TCA TAT CTG TCC AG-3') を用いて、ITS1-5.8s rDNA-ITS2 間 (約 300bp) を増幅した (Fig. 1-1)。

反応試薬は TaKaRa Ex Taq® (タカラバイオ(株), 滋賀) を用いた。一次反応では、1 検体につき、200µl の PCR チューブに 10×Ex Taq Buffer 2.50µl、dNTP mix 2.00µl、dH₂O 18.25µl、プライマー(10µM)各 0.50µl および検体 DNA 抽出物 1.00µl の順に加え、全量 25µl (プライマー濃度 1.0µM) とした。反応条件は、95°C、9 分で変性後、94°C、30 秒、50°C、30 秒、72°C、2 分を 30 サイクル行った後、72°C、7 分間、伸長反応させた。二次反応においても、一次反応と同じ組成で試薬および一次反応産物を入れ、95°C、9 分で変性後、94°C、30 秒、50°C、30 秒、72°C、2 分を 30 サイクル反応させた後、72°C、7 分間、伸長反応を行った。

なお、本章における分子生物学的検査は、五箇公一博士（独立行政法人 国立環境研究所）に依頼した。

2-2 ウシガエル幼生を対象としたカエルツボカビ検査法の比較

ウシガエル幼生の口器のカエルツボカビを的確に検出するための検査法の確立を目的とし、swab nested PCR 法、口器 nested PCR 法および病理組織検査の結果を比較した。

2-2-1 検体

2012年5月と2013年2月に鳥取県西伯群南部町および長崎県西海市西彼町で、それぞれ60匹ずつ、計120匹のウシガエル幼生（Gosner Stage25-41）を採集した。これらの口器を対象に swab nested PCR 法、口器 nested PCR 法および病理組織検査の感度と特異性を検討した。処理法は次のとおりである。

採集したウシガエル幼生を本章 2-1-1 と同じ方法で麻酔、安楽死させ、各個体の体長と体重を測定した。これらの平均体長および体重は 9.2cm (5.3~11.6cm)、11.58g (3.63~22.58g) であった。なお、ウシガエル幼生の口器は小さく、同一個体から全ての検査を行うことができないため、1群を swab および口器の nested PCR 法、2群を病理組織検査のみの2つの群に分けた。はじめに目視で、口器ツボカビ症を有する個体が2つの群で同程度の割合で含まれるように、各60匹に群分けした。その内訳は、肉眼病変を有する個体は1群14匹、2群15匹とした。そして、1群では本章 2-1-1 と同様に swab と口器を採取し、それぞれ 1.5ml マイクロチューブに入れ、検査を行うまで-20℃で保管した。2群では、口器を前額断にて切除後、10%中性緩衝ホルマリンで24時間以上固定した。

2-2-2 分子生物学的検査（PCR 検査）

DNA の抽出において、swab からの抽出には本章 2-1-4 と同じ方法を用いた。口器からの抽出には、ディスポーサブルホモジナイザー（バイオマッシャー II®、(株)ニッピ、東京）を用いて口器を破砕後、swab と同じく、DNA 抽出キット NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel, Duren, Germany)を用いて、マニュアルに従い、DNA を抽出した。

Nested PCR 法は、swab、口器ともに本章 2-1-4 と同じ方法を用いた。

2-2-3 病理組織検査

本章 2-1-3 と同じ方法を用いて、HE 染色および必要に応じてファンギフローラ Y 染色を行った。

2-2-4 統計学的解析

すべての検査結果の検出率（感染を認めた個体数/検査を行った個体数）を算出した。そして、swab nested PCR 法と口器 nested PCR 法の検出率および swab nested PCR 法と病理組織検査の検出率において、それぞれ 2 群間の差を比較するために χ^2 検定を行った（ $P < 0.05$ ）。

第 3 節 結果

3-1 カエルツボカビ研究におけるウシガエル幼生の有用性の検討

3-1-1 口器ツボカビ症の肉眼的特徴

口器ツボカビ症の肉眼病変の特徴は、①嘴の色素消失（部分的または広範囲、び漫性）、②嘴の色素沈着層の菲薄化および ③歯列の淡明化であり、ときに嘴先端の部分欠損、鈍化など嘴の変化であった（Fig. 1-2 b-d）。口器病変は、下嘴に最も頻繁に観察され、主として嘴の部分的、ときに全体におよぶ色素消失（Fig. 1-2 c, d）と、色素沈着層の菲薄化（Fig. 1-2 b）が 59 匹中 21 匹にみられた。嘴の色素消失は 21 匹中 11 匹にみられ、その内訳は Grade1：3 匹、Grade2：2 匹、Grade3：6 匹であった。色素沈着層の菲薄化は 10 匹にみられ、その内訳は Grade1：6 匹、Grade2：4 匹であった。色素消失が高度になると嘴先端の部分欠損や鈍化など嘴に変化がみられた（Fig. 1-2 d）。また、7 匹の幼生の歯列に淡明化（歯の消失）（Fig. 1-2 d）を認めた。

3-1-2 口器ツボカビ症の組織学的特徴

組織検査の結果、口器ツボカビ症の組織学的特徴は、色素上皮層における色素の減少または消失、角質層の肥厚（角化亢進または不全角化）、上皮細胞過形成であった。そして、角質層にカエルツボカビ感染を認めた（Fig. 1-3 b-d）。

正常な嘴組織の先端部最外層は、重層する黒色色素を大量に保有する扁平な細胞層からなり（色素含有重層上皮層、以下色素上皮層）、この細胞層は嘴基部に向かって薄くなり、ついには薄い角質層に置き換わっていた。色素上皮層の直下には、口粘膜と同様の重層扁平上皮層が存在していた（Fig. 1-3 a）。

色素消失がみられた嘴では、色素上皮層における色素の部分的あるいは瀰漫性の減少および消失があり、角化亢進や不全角化層の増加により角質層は肥厚していた（Fig. 1-3 b）。その角質層の表面には細胞屑が付着していた。また、重層扁平上皮層の細胞は増殖し、配列が乱れ、不規則に肥厚していた。高度の色素消失と変形がみられた嘴では、色素上皮層は完全に消失し、重層扁平上皮細

胞層の増殖はさらに高度で、嘴先端から基部まで肥厚した重層扁平上皮により被われていた。重層扁平上皮層の上皮細胞には、変性、孤在性壊死、皮下織の水腫などが認められたが、炎症細胞浸潤はほとんどみられなかった。肉眼的に色素沈着層が菲薄化した嘴では、色素上皮層の瀰漫性の減少がみられた。

カエルツボカビは角質層にのみ観察され、多くは球状、ときにフラスコ状を呈する遊走子嚢として観察された (Fig 1-3 b-d)。ほとんどの遊走子嚢には遊走子を含んでいなかったが、一部に遊走子がみられた。カエルツボカビの遊走子嚢は免疫染色 (Fig. 1-3 c) およびファンギフローラ Y 染色 (Fig. 1-3 d) で、より明瞭に観察された。

肉眼的に明らかな嘴病変が認められなかった 38 匹のうち、14 匹に組織学的にカエルツボカビの感染を確認した。これらの症例では、色素上皮層の減少および重層扁平上皮層の増殖は、軽度あるいはほとんど認められず、嘴の構造異常も確認されなかった。カエルツボカビは色素上皮層に連続する嘴基部および口蓋のわずかな領域において、薄い角質層内に少数観察された。

歯列および辺縁乳頭は非常に小さく、脆弱であったため、全ての検体で鏡検できたわけではないが、観察できた一部の症例には、歯の消失が認められた。

3-1-3 分子生物学的検査結果

Nested PCR 法では、59 匹中 22 匹にカエルツボカビの感染を認めた。そのうち、肉眼病変が認められた個体は 13 匹、認められなかった個体は 9 匹であった。

3-1-4 口器ツボカビ症における肉眼検査の感度および特異度

肉眼検査結果を nested PCR 法および病理組織検査結果と比較した結果、肉眼検査は、特異度 95.5% と非常に特異性の高い検査法であることがわかった。

肉眼病変を認めた 21 匹中 20 匹に nested PCR 法、病理組織検査のいずれか、または両方で感染を確認した。その内訳は、nested PCR 法・病理組織検査ともに陽性 10 匹、nested PCR 法のみ陽性 3 匹、病理組織検査のみ陽性 7 匹、陰性 1 匹であった (Table 1-1)。

肉眼検査では病変が認められなかった 38 匹のうち 17 匹に nested PCR 法、病理組織検査のいずれか、または両方で感染を確認した。その内訳は、nested PCR 法・病理組織検査ともに陽性 6 匹、nested PCR 法陽性 3 匹、病理組織検査陽性 8 匹、陰性 21 匹であった (Table 1-1)。

肉眼検査の感度 (感染を認めた個体中、肉眼病変を有する個体数)、特異度 (感染を認めない個体中、肉眼病変を有さない個体数) は、それぞれ 54.1% (20/37 匹) および 95.5% (21/22 匹) であった。

3-2 ウシガエル幼生を対象としたカエルツボカビ検査法の比較

各検査結果は 60 匹中、swab nested PCR 法 40 匹 (検出率 67%)、口器 nested PCR 法 38 匹 (63%)、病理組織検査 20 匹 (33%) の順に高かった (Fig 1-4)。Swab nested PCR 法および口器 nested PCR 法の結果と病理組織検査結果の間には有意差が認められたが、swab nested PCR 法と口器 nested PCR 法の結果の間に有意差はなかった。

第 4 節 考察

4-1 カエルツボカビ研究におけるウシガエル幼生の有用性の検討

本研究の結果、ウシガエル幼生はカエルツボカビを高率に保菌し、目視によって容易に感染を確認できることから、カエルツボカビ国内分布調査のモニター動物として有用であると結論づけた。以下にその詳細を述べる。

カエルツボカビは角質を栄養源とするため、幼生では角質が存在する口器のみに感染して病変を形成する (Obendorf, 2005; Symonds et al., 2007; Fellers et al., 2001; Rachowicz et al., 2004)。カエルツボカビの感染による口器の変化は、Mountain yellow-legged frog (*Rana muscosa*) や *Mixophyes sp.* の 2 種類で報告されており、肉眼的に、前者では嘴または歯列の色素消失、辺縁乳頭の水腫・発赤、後者では嘴の色素消失、歯列の shortening がみられる (Fellers et al., 2001; Symonds et al., 2007)。組織学的変化は、角化細胞表層における扁平なメラニン欠乏性細胞への置換 (色素消失)、糜爛および上皮過形成、歯列の色素消失 (歯の欠損) である。本研究で得られた病理学的変化は、歯列の変化が軽微であったことを除いて、これらの報告と一致した。よって今回、確認したウシガエル幼生の口器病変はカエルツボカビの感染に関連する病変と判断した。

また、口器ツボカビ症の肉眼検査は特異度が 95.5% と非常に高かったことから、口器ツボカビ症は肉眼観察で病変を確認することができると判断した。従って、採集地におけるカエルツボカビの浸淫状況を簡便に把握できると考えた。しかし、その感度が 54.1% であることから、正確な判断には、nested PCR 法を含む PCR 検査や、病理組織検査など、より詳細な検査を行う必要がある。

一方、無尾類幼生の口器異常はカエルツボカビ感染以外にも、石炭灰汚染 (Coal ash-polluted site) (Rowe et al., 1996)、生息環境のヒ素、バリウム、クロム、セレンおよびカドミウムの高濃度暴露 (Rowe et al., 1998)、DDT (Osborn et al., 1981) やコルチコステロンの暴露 (Hayes et al., 1997) によっても生じる。また、Mountain yellow-legged frog (*Rana muscosa*) では、低温環境下で口器全体におよぶ色素消失が起こるとされている (Rachowicz, 2002)。しかしながら、本研究で用いたウ

シガエル幼生の採集地は一級河川として管理されており、周辺には、口器異常の原因となる物質を排出するような施設が認められなかった。また、採集時期はカエルツボカビの活性が高い時期である晩春～初夏にあたる5～7月である。さらに、本研究で認められた病変は口器の不規則な色素消失に加え、色素消失が顕著な個体の一部には嘴の欠損などの変形を伴っていた。よって、上述した化学物質などの汚染および低温環境による変化である可能性はないと判断した。

ウシガエルは1918年に北米より輸入された外来生物で（長谷川, 2000）、北海道の一部、本州、四国および九州とほぼ全域に分布している（前田ら, 1989）。ウシガエルは日本の生態系に負の影響を与えるとして、2005年より特定外来生物に指定され、駆除対象となっている（環境省, 2011）。よって、調査のための捕獲圧を考慮せずに全国各地で採取できる。さらに、ウシガエルは日本以外にも北米、中米の一部、ヨーロッパの一部、アジアではタイ、台湾など世界的に広く分布している（Mattison et al., 2008）。このため、国内はもとより、本種を用いたカエルツボカビ感染状況の調査は日本以外の複数の国や地域でも実施でき、宿主の種類による差を考慮せずに、比較検討できると判断し、固有種、希少種を調査対象に用いた既報（Obendorf et al., 2005; Symonds et al., 2007; Fellers et al., 2001; Rachowicz et al., 2004）よりも、有用な情報が得られるものと考えた。

過去の国内野外調査では、49種類（有尾類を含む固有種47種類およびウシガエルを含む外来種2種類）、約5,400匹の両生類が検査され、その感染率は平均4～5%であった（Goka et al., 2009; Goka, 2010）。本研究では、ウシガエル幼生の感染率は平均62.7%と非常に高率であった。この高感染率は、本種がカエルツボカビ研究におけるモニター動物として有用であることを示している。

4-2 ウシガエル幼生を対象としたカエルツボカビ検査法の比較

カエルツボカビ検出率は swab nested PCR 法が最も高かったが、swab nested PCR 法の結果と口器 nested PCR 法の結果の間に有意差を認めなかったこと、swab の採取は採取者の手技の影響を受けることから、カエルツボカビ国内調査には、口器 nested PCR 法が有効な検査法であると結論づけた。

カエルツボカビの感染を確認する手法には PCR 法および病理組織検査がある（OIE, 2011; Hyatt et al., 2007）。一般に、PCR 法は感度および特異度が高く、手技が容易であり、また、冷凍保存またはアルコール固定など検体の保存も容易であることから、検体数の多い大規模調査が可能である（OIE, 2011）。PCR 法に用いる材料として、swab は非侵襲的に採取できる一方、確実に swab を採取するためには、口腔内に滅菌綿棒を入れて十分に拭う必要がある。すなわち、採集者の手技が未熟であると、十分量の検体が採取できず、偽陰性になる可能性があるという欠点がある（Hyatt et al., 2007; Retallick et al., 2006; OIE, 2011）。組織

PCR 法は組織（無尾類幼生の場合は口器）を採取することで、角質層に感染しているカエルツボカビを確実に採取することから、感度、特異度ともに高いが、侵襲的である。従って、カエルツボカビの調査において、希少種を対象とする場合は swab nested PCR 法が、生息数が多く捕獲圧を考慮する必要がない種に対しては口器 nested PCR 法が推奨される。

病理組織検査は光学顕微鏡で組織標本を観察することでカエルツボカビの感染を形態学的に確認する。特異性が高く、さらに感染による組織傷害の評価が可能である一方、侵襲的である。また、組織標本の作成には、組織の固定～染色まで作業工程が多く、標本が完成するまで最短でも 3 日を要するため、大規模調査に向いていない。

各種のカエルツボカビ検査法の感度および特異度を検討した報告によると、Hyatt et al. は *Myxophyes fasciolatus* 成体にカエルツボカビを実験感染させ、7 日間隔で継時的に TaqMan PCR 法（材料：浸漬水および指端）と病理組織検査（指端を材料とし、HE 染色および免疫染色）の結果を比較し、病理組織検査よりも TaqMan PCR 法の方がより高い感度を有していると述べている（Hyatt et al., 2007）。さらに、Hyatt et al. は *Litoria sp.* 2 種類から swab および口器組織を採材し、TaqMan PCR で各材料の検出率を比較したところ、口器組織でカエルツボカビ遊走子数 400 未満を検出した検体が swab では特異遺伝子が検出されなかったことを除いて、検査材料としての口器組織および swab は極めて優れていると報告している（Hyatt et al., 2007）。また、Retallick et al. は *Rana subaquavocalis* にカエルツボカビを実験感染させて、TaqMan PCR 法により継時的に swab と口器組織の検査結果を比較したところ、一貫して組織 PCR 法の結果が優れていたと報告している（Retallick et al., 2006）。本研究では、swab PCR 法の方が組織 PCR 法よりも感度が高かったが、その差に有意差は認められなかった。以上より、TaqMan PCR 法と nested PCR 法といった方法および実験感染例と自然感染例といった対象動物の違いはあるが、カエルツボカビの国内分布を正確に調べるためには、採取者の手技の影響を受けない口器を材料として、nested PCR 法で検査することが有効であると考えた。

なお、本研究において、swab PCR 法陽性で、組織 PCR 法陰性になった個体が 1 匹いたが、これは検査手順による偶発的事例であると考えた。すなわち、同一個体から swab、口器の順に採材したことから、カエルツボカビの感染程度が極少量であった個体の場合、swab を採った後の口器におけるカエルツボカビの特異遺伝子が組織 PCR の検出限界以下になったことが考えられた。

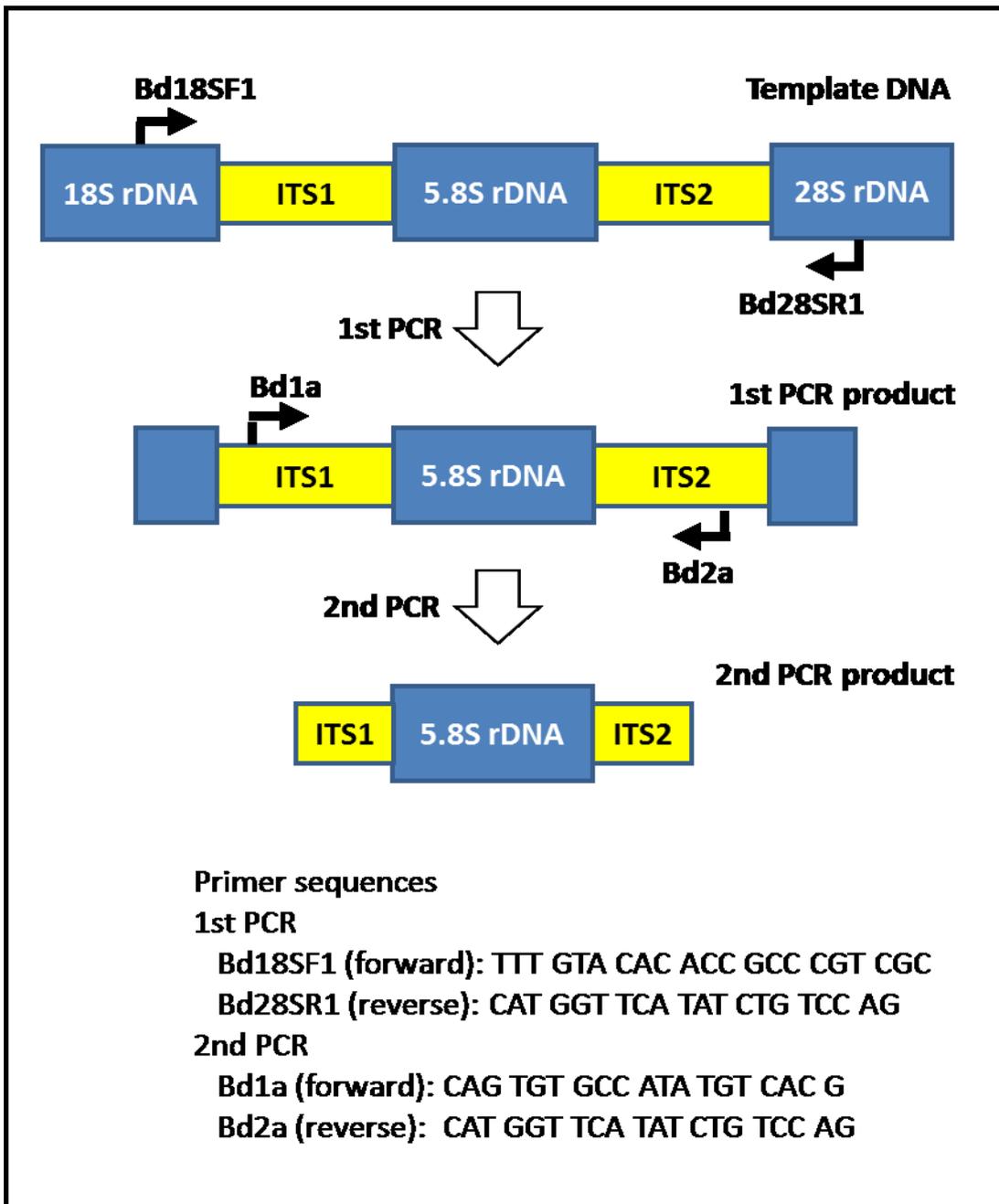


Fig. 1-1. Image of amplified region of nested PCR. A modified from Tamukai K., 2014

Table 1-1. The numbers of *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) infections in tadpoles with and without mouthpart deformities from PCR tests and histopathological examinations.

| | | Number with mouthpart deformities | Number without mouthpart deformities |
|---------------------------------|--|--------------------------------------|---|
| Confirmation of Bd infection | Nested PCR test | 3 | 3 |
| | Histopathological examination | 7 | 8 |
| | Nested PCR test and histopathological examination | 10 | 6 |
| Negative | | 1 | 21 |
| Total | | 21 | 38 |

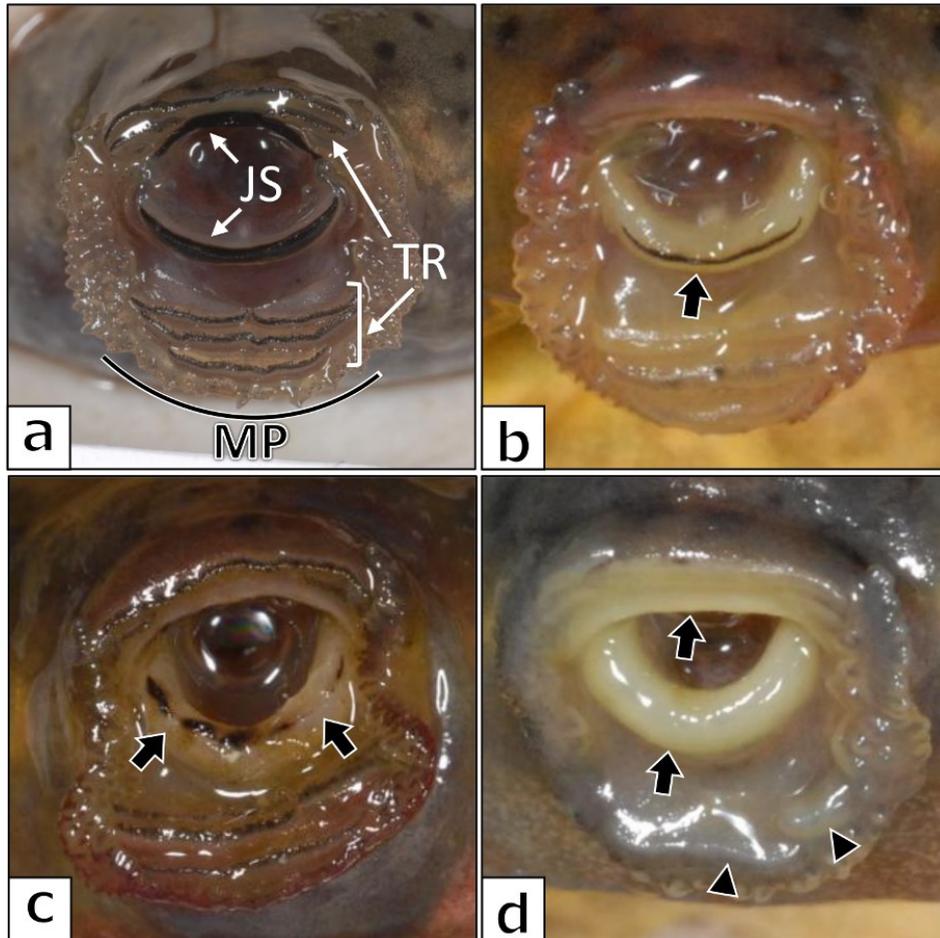


Fig. 1-2. Macroscopic features of normal specimens (a) and oral chytridiomycosis in the mouthparts of bullfrog tadpoles (b–d).

(a) From the center to the outside, normal mouthparts consist of the upper and lower jaw sheaths (JS), upper and lower tooth rows (TR), and marginal papillae (MP). Jaw sheaths and tooth rows are highly pigmented. (b) Thinning of the pigmented layer of the lower jaw sheath (arrow). (c) Partial depigmentation and defects in the lower jaw sheath (arrows). (d) Substantial depigmentation of the upper and lower jaw sheaths (arrows) and tooth row depigmentation (loss of teeth) (arrowheads).

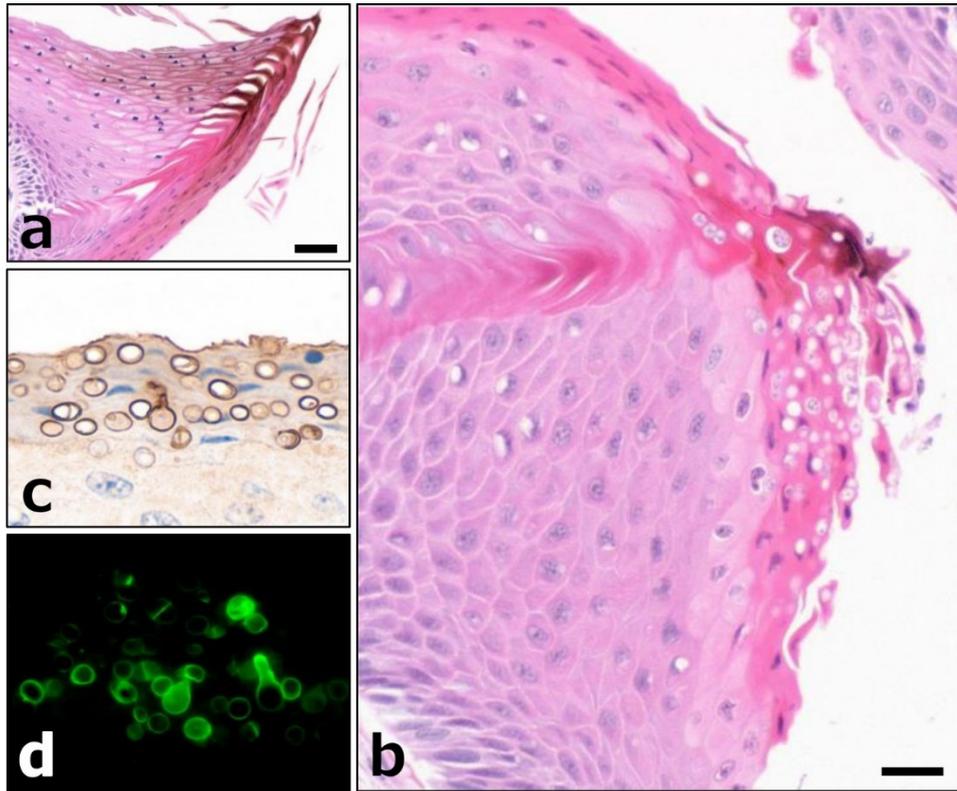


Fig. 1-3. Histological features of normal specimens (a) and oral chytridiomycosis in mouthparts (lower jaw sheaths) of the bullfrog tadpole (b–d).

(a) The superficial layer of the tip of the lower jaw sheath consists of flat cells that contain abundant black pigment (pigmented epithelial layer) and the tip of the jaw sheath is sharp. Bar = 50 μm . (b) The cutting edges of the jaw sheath have a blunt shape, the pigment is diffusely lost in the pigmented epithelial layer and slightly found at the tips of the jaw sheath. The lost pigmented epithelial layer is replaced by stratified corneum, which was caused by hyperkeratosis. *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) zoosporangia are found in spherical and flask-like forms in the stratified corneum. Bar = 25 μm . (c, d) Bd zoosporangia are clearly observed on immunohistochemical staining (c) and Fungiflora Y staining (d).

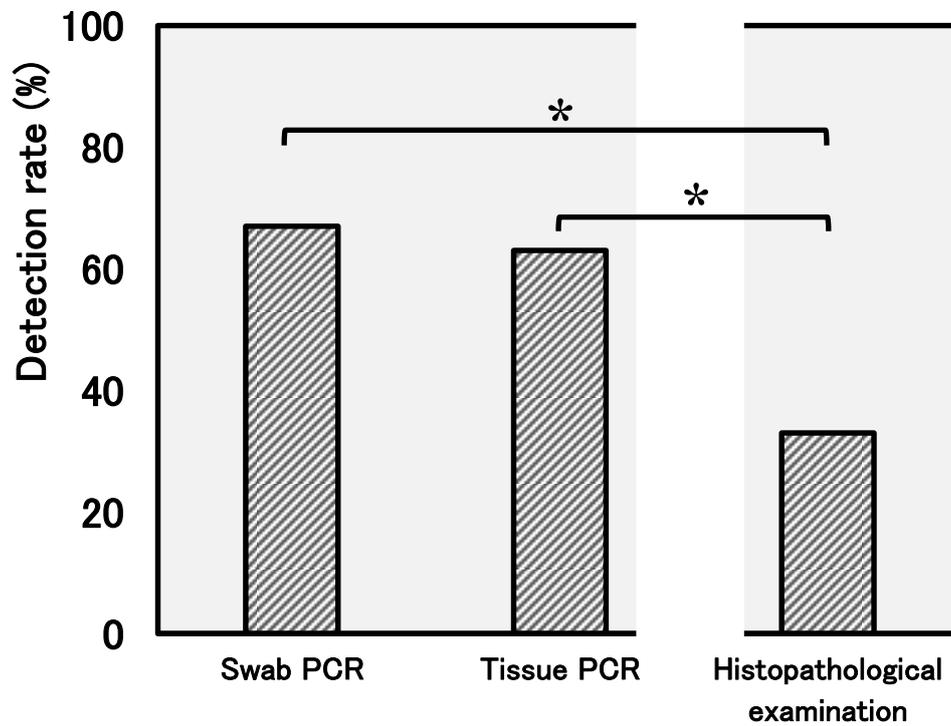


Fig. 1-4. Comparison of detection rates of swab PCR, tissue PCR and histopathological examination.

The detection rates are high in order of swab PCR (67%), tissue PCR (63%) and histopathological examination (33%). (* $P < 0.05$ the swab PCR and tissue PCR vs. histopathological examination; $n = 60$).

第2章 ウシガエル幼生におけるカエルツボカビ感染の季節変動の把握

第1節 序論

第1章では、カエルツボカビ国内分布調査を実施するのにあたり、ウシガエル幼生をモニター動物として、その口器を被検材料とする nested PCR 法が最適であると結論付けた。第2章では、さらに、カエルツボカビ国内分布調査を行う最適な時期を決定した。

カエルツボカビ感染およびツボカビ症の発生には季節変動があり、気温の高い夏場は低率であることが知られている (Berger et al., 2004; Kringer et al.; Ouellet et al., 2005; Retallick et al., 2004)。そして、国内で実施された唯一の国内分布調査は感染率が非常に低いとされる7~9月に行われており (Goka et al., 2009)、真のカエルツボカビの国内分布を反映しているか疑問である。

日本は大きく3つの気候帯からなり、北海道・東北地方、本州東北以南および沖縄県本島などの南西諸島が、それぞれ亜寒帯 (冷帯)、温帯および亜熱帯気候に属している (気象庁、2002年)。本州の広い地域を占める温帯気候の特徴は、四季の変化が著しく、東京都府中市の過去5年間 (2011~2015年) の平均気温を参照すると、冬季 (12~2月) は4.8°C (3.0~7.9°C)、夏季 (6~8月) は25.0°C (20.7~27.9°C) である。従って、日本の両生類におけるカエルツボカビ感染率も季節変動する可能性がある。

第2章では、カエルツボカビ国内分布調査を実施するに当たり、ウシガエル幼生の採集適期を決定するために、カエルツボカビ感染率の季節変動の有無と推移を調査した。

第2節 材料および方法

カエルツボカビの季節変動を把握するため、2011年12月~2014年6月の31ヵ月間、定期的にウシガエル幼生を採集し、これらの口器を用いて nested PCR 法を行い、採集月ごとのカエルツボカビ感染率の推移を調べた。

2-1 検体

2011年12月~2014年6月の間、2012年12月を除く偶数月にそれぞれ15匹または30匹、合計345匹のウシガエル幼生を長崎県西海市の一生息池から採集した (Table 2-1)。これらの個体を第1章 2-1-1 と同じ手法を用いて安楽死後、体長、体重を測定し、第1章 2-2-1 と同様の手法によって口器を採取した。

2-2 分子生物学的検査

第1章 2-2-2 の手法に従って、ウシガエル幼生の口器を材料とし、nested PCR法を行った。

第3節 結果

各採集月におけるカエルツボカビの感染率は Fig 2-1 に示すとおりで、明らかな季節変動があった。感染率が最も高い月は、気温の上昇しはじめる4月（日平均気温 13.7～14.8℃）および6月（20.9～22.2℃）で、それぞれ平均 87% および 78% であった。気温の高い8月（27.4～27.8℃）および10月（18.3～19.8℃）には感染個体を確認できなかった。2月（6.2～7.7℃）と12月（7.9～8.6℃）の感染率はそれぞれ平均 43% および 29% を示したものの、採集年によって著しく異なっていた。すなわち、2012年～2014年の2月は、それぞれ7%、60% および 63% であり、2011年、2013年の12月は、それぞれ47% および 10% であった。

第4節 考察

国内野生下のウシガエル幼生において、4～6月に高い感染率を示す季節変動があることを明らかにした。よって、カエルツボカビ国内分布調査は、2～6月に行うことが適切であると結論付けた。

これまで、カエルツボカビ感染率の季節変動は、オーストラリアのクイーンズランド州（Berger et al., 2004; Kringer et al., 2007; Retallick et al., 2004; Woodhams et al., 2005）およびカナダのケベック州（Ouellet et al., 2005）において、野外調査または野外捕獲個体の博物館保存標本を用いて調べられている。オーストラリアの調査において、Woodhams et al. は高温・多湿期よりも低温・乾燥期、Retallick et al. は夏季・秋季よりも冬季・春季、Berger et al. は冬季に高い感染率またはツボカビ症の発生を確認したと報告している。カナダでは、Ouellet et al. が春・秋季（4月～6月および10月）に感染率が高く、夏季（7月、8月）には感染率が低いと報告している。さらに、Berger et al. は上述の野外調査に加え、気温 17℃、23℃または 27℃の異なる環境下でカエルツボカビ感染実験を行い、17℃および23℃環境下の感染群が27℃環境下の感染群よりも有意に死亡率が高いと報告している。これらの結果は、低温環境下におけるカエルツボカビ高感染率といった点が共通している。本研究においても、カナダにおける10月の高感染率（Ouellet et al., 2005）を除いて、これらの報告と一致した。すなわち、カエルツボカビの感染率は、気温の上昇しはじめる4～6月（日平均気温 13～22.2℃）に高く、気温の高い8月および気温が低下して間もない10月には感染個体が確認できないという季節変動があった。

カエルツボカビ感染率が季節変動を示す理由として、本病原体の至適発育温度との関連が示唆されている。すなわち、カエルツボカビは *in vitro* では、4～25℃

と広い温度帯で増殖することができるが、至適発育温度は 17~25°Cとされている (Piotrowski et al., 2004)。また、Piotrowski et al.は、カエルツボカビ培養株を培養温度 4°Cから 23°Cに移すと、急速に増殖すると報告している (Pitrowski et al., 2004)。一方、Longcore et al. は、カエルツボカビ培養株を 30°Cに 8 日間置いた後、適温条件に戻すと、死滅あるいは増殖しないか、生存した株でも増殖速度が半減したとしている (Longcore et al., 1999)。これらのことを踏まえて、多くの研究者は、カエルツボカビ感染率の季節変動およびツボカビ症の流行季節には、カエルツボカビの至適発育温度に関連すると考察している (Berger et al., 2004; Kringer et al., 2007; Retallick et al., 2004; Woodhams et al., 2005)。本研究で確認された季節変動に関しても、南半球と北半球の違いがあっても、高感染率を示した 4~6 月は日平均気温 13~22.2°Cとカエルツボカビの増殖活性に適した気温であったことから、既報の考察を支持する結果となった。なお、10 月の感染率に関して本研究とカナダのケベック州での結果 (Ouellet et al., 2005) と大きな隔たりがあったが、世界の天候データツール (気象庁: http://www.data.jma.go.jp/gmd/cpd/monitor/climatview/graph_mkhtml.php?n=71627&y=2000&m=12&s=4&r=0&e=0&k=0) によると、2001 年におけるカナダ・ケベック州は、最も気温の高い 7 月でも月平均気温 21°Cとカエルツボカビの発育至適気温の範囲にあり、カエルツボカビ感染率は約 3%であった。そして、10 月まで気温の低下に伴い、カエルツボカビ感染率が上昇していることから、カエルツボカビの発育至適温度と関連しているものと推察された。

本研究によって明らかにされた国内自然界におけるカエルツボカビ感染動態の年間サイクルは、冬~春にかけて増殖・拡大し、気温が発育至適温度を上回る夏季に大きく減少した後、晩秋~冬にかけて再び拡大すると結論付けられた。今回、長崎県西海市で調査を実施したが、同様の季節変動は神奈川県相模原市で実施された予備研究結果 (共同研究者、富永篤琉球大学准教授、未公表データ) と一致したことから、国内での地域差はないものと考えた。

なお、気温が 18.3~19.8°Cと適温であったにも関わらず 10 月に感染を認めなかった理由は、気温の高い 8~9 月に環境中のカエルツボカビが著しく減少した後、気温が低下して間もない 10 月の時点では、PCR 検査による検出限界以下 (DNA 量 0.001pg 以下) の感染状況であったものと推察した。また、12 月および 2 月の感染率に、調査年によってバラツキがあったが、前述の相模原市での調査では高感染率を維持していたことから、この採集池における局所的な気温、水温、ウシガエル幼生の個体密度などがカエルツボカビの増殖、感染拡大に影響したものと考えた。

本章および第 1 章から、調査適期を 2~6 月として、ウシガエル幼生の口器を採材し、nested PCR 法で検査することで、正確なカエルツボカビ国内分布調査

を行えると結論づけた。

Table 2-1. Summary of *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) prevalence, captured animal data in each month

| Year | Month | Number of animals | Number of animals positive for Bd | Average body length (cm) | Average body weight (g) |
|------|-------|-------------------|-----------------------------------|--------------------------|-------------------------|
| 2011 | Dec. | 15 | 7 | 9.4 | 8.6 |
| 2012 | Feb. | 15 | 1 | 10.3 | 10.3 |
| | Apr. | 15 | 13 | 10.7 | 13.8 |
| | Jun. | 15 | 13 | 11.5 | 18.5 |
| | Aug. | 30 | 0 | 7.8 | 5.0 |
| | Oct. | 15 | 0 | 6.9 | 4.3 |
| | Dec. | | | Not done | |
| 2013 | Feb. | 30 | 19 | 8.7 | 8.8 |
| | Apr. | 15 | 14 | 9.5 | 11.8 |
| | Jun. | 15 | 15 | 12.1 | 19.6 |
| | Aug. | 30 | 0 | 9.0 | 8.7 |
| | Oct. | 30 | 0 | 8.2 | 6.7 |
| | Dec. | 30 | 3 | 9.6 | 10.5 |
| 2014 | Feb. | 30 | 18 | 9.2 | 11.4 |
| | Apr. | 30 | 24 | 9.9 | 14.6 |
| | Jun. | 30 | 14 | 13.3 | 22.9 |

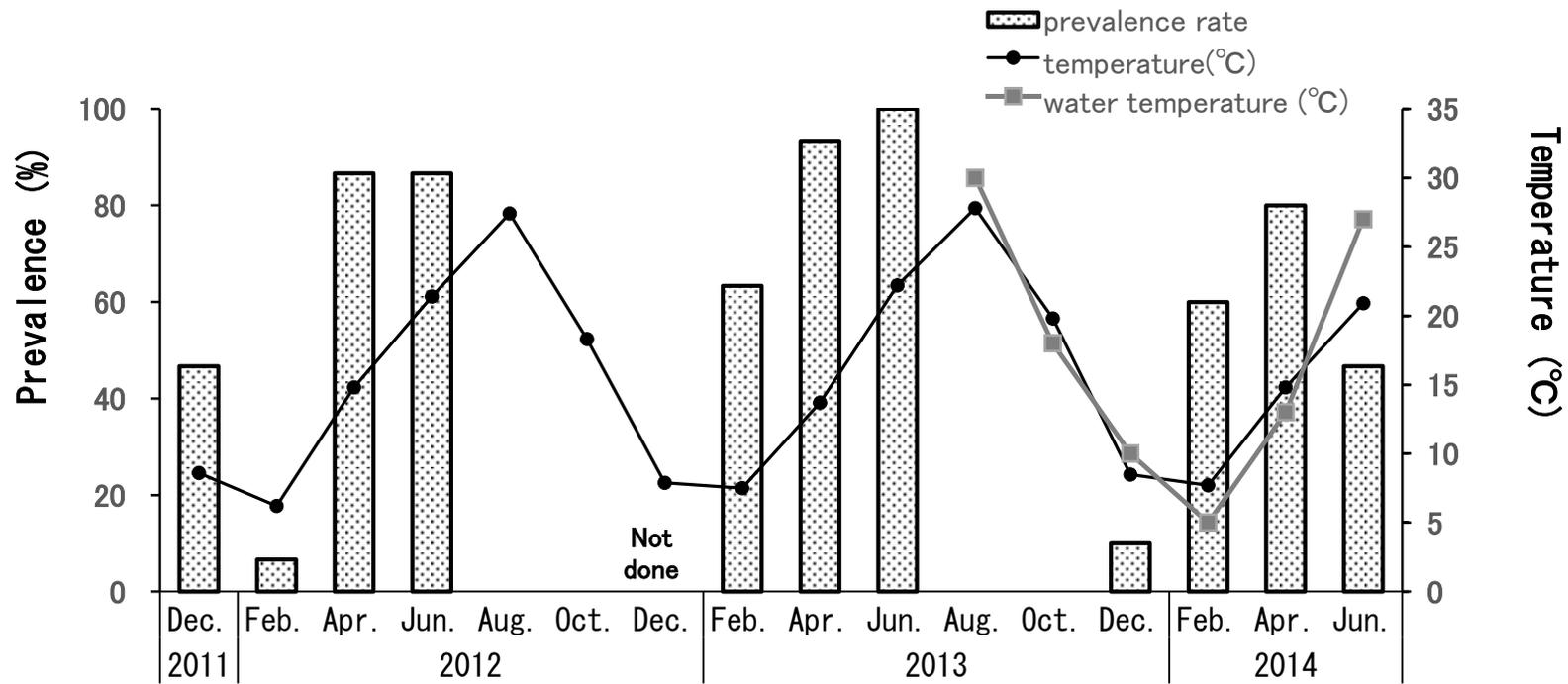


Fig. 2-1. Seasonality of prevalence of *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) infection in bullfrogs (*Lithobates catesbeiana*). The prevalence rate of Bd infection of *L. catesbeiana* is detected high in April and June, and absent in August and October.

第3章 野生下ウシガエル幼生を対象としたカエルツボカビの国内分布と遺伝子型

第1節 序論

第3章では、第1～2章の結果に基づいて、カエルツボカビの国内分布調査と併せて、検出したカエルツボカビのハプロタイプの解析を行った。

カエルツボカビは1990年代後半に両生類の絶滅に関与することが指摘され、1999年に新種記載された新興病原体である (Longcore et al., 1999)。そのカエルツボカビの起源に関して、新興感染症説や常在病原体説などいくつかの仮説が立てられている。特に、パナマやオーストラリアでは、ツボカビ症により両生類が大量死し、深刻な被害が報告された (Berger et al., 1998)。これらの国における疫学的調査の結果、採集条件などの違いはあるが、感染率が10～100%であること (Lips, 2006; Berger et al., 1998)、大量死が起きていること、ITS領域を指標とする haplotype の多様性が非常に少ないこと (Goka et al., 2009) や、北米、アフリカ、オーストラリア検出株における遺伝子領域10か所を指標とする Multilocus sequence typing (MLST) 解析においても、遺伝的多様性が少ない (Morehouse et al., 2003) ことなどから、カエルツボカビによる被害を受けたこれらの諸外国において、カエルツボカビは新興病原体であるという仮説が提唱された。さらに、その起源としては、Weldon et al.らの1879～1999年に採集された *Xenopus sp.* 3種の保存標本を対象としたカエルツボカビの遡及的研究において、現地で大量死が認められていないこと、感染率2.7%と低率なこと、カエルツボカビ感染を確認した当時、最も古い標本とされる1983年に採集されたアフリカツメガエル (*X. laevis*) にカエルツボカビの感染を認めたこと、さらに、アフリカツメガエルは妊娠診断のツールおよび実験動物として世界各地に輸出したという拡散ルートがあることなどから、アフリカ起源説が有力視された (Weldon C., 2004)。

しかしながら、我々の先行研究によって、国内野生下両生類はカエルツボカビに感染しているが、感染率が4.1%と非常に低く、在来種では、オオサンショウウオ (*Andrias japonicus*)、シリケンイモリ (*Cynops ensicauda*)、ヌマガエル (*Fejervarya limnocharis*)、アマガエル (*Hyla japonica*)、トノサマガエル (*Rana nigromaculata*) およびツチガエル (*Rana rugosa*) の6種類にしか感染が認められなかったこと、検出された haplotype は59種類にも及ぶこと、中でも、日本固有種であるオオサンショウウオと沖縄固有種であるシリケンイモリにおける感染率が、それぞれ37%および50%と高感染率で、さらに、これらの2種類の保有するカエルツボカビの haplotype は、オオサンショウウオが K type のみ、シリケンイモリが A、E、I、W type のみであった (Goka et al., 2009)。また、野

生下の両生類には大量死がみられないこと、加えて、南アフリカの保存標本より、さらに81年も古い1902年に採集されたオオサンショウウオの保存標本にカエルツボカビ感染を確認した。以上の結果から、カエルツボカビは、日本およびアジアを起源として、世界中に拡散したという仮説（アジア起源説）を提唱した(Goka et al., 2009)。

この発表を受けて、アジア諸国における疫学調査が実施され、アジア諸国に共通している状況として、大量死が認められず、総じて感染率が低い (Swei et al., 2011; Bai et al., 2012; Bataille et al., 2013) ことが挙げられた。そして、haplotypeが多数確認されているが、未だアジア起源説の結論に至っていない (Bai et al., 2012; Bataille et al., 2013)。

アジアにおけるこれらの報告から、Swei et al.は、アジアの現状について、①アジアにおいて、他国と同様にカエルツボカビは新興病原体であるが、現在、未だ大量死が起きていない状況にある。②カエルツボカビは、日本およびアジアの固有病原体 (endemic) であり、長い歴史を経て、在来両生類と共進化している。③気候、カエル皮膚の共生微生物など、カエルツボカビと両生類をとりまく環境要因がツボカビ症を制御しているの3つの仮説を立てた (Swei et al., 2011)。しかし、これらの仮説もまた、アジアにおけるカエルツボカビの発見および疫学的知見が得られて間もないこともあって、未だ結論を得るに至っていない。

アジア起源説を検証するためには、広域にわたって、適切な方法、時期と対象を用いて、正確な分布、感染率および遺伝子型データの集積、解析が必須である。日本において、過去、Goka et al. (2009) によって、全国調査が実施されたが、調査時期は2007年5～11月の、主として夏季で、至適増殖温度を25℃以下とするカエルツボカビにとって、最も増殖活性が低い時期に行われ、感染率も4.1%と低かったことから、的確にカエルツボカビの国内分布を反映していない可能性があった。

そこで、本章ではカエルツボカビによる両生類の影響における国内外の相違について、カエルツボカビの感染率、遺伝的多様性から解明すべく、特に、カエルツボカビのアジア起源説を念頭において、考察するために、カエルツボカビの国内分布とハプロタイプ解析を行った。

第2節 材料および方法

カエルツボカビの国内分布を明らかにするため、26都府県、44地域から835匹のウシガエル幼生を採集し、これらの口器を分子生物学的検索 (nested PCR法) に供した。Nested PCR法によって陽性となったPCR産物から、ダイレクトシーケンス法によりカエルツボカビのITS領域の塩基配列を決定し、既存のhaplotypeと比較するとともに、各haplotypeの国内分布を調べた。

2-1 検体

2012年および2013年、各1～6月、26都府県、44地域、835匹のウシガエル幼生を採集した (table 3-1)。第1章2-1-1と同じ手法を用いて、これらの動物を安楽殺し、体長、体重を測定し、第1章2-2-1と同じ手法によって、口器を採取した。

2-2 分子生物学的検索 (PCR 検査)

第1章2-2-2と同じ手法を用いて、ウシガエル幼生の口器を材料とし、nested PCR法を行った。

2-3 カエルツボカビ ITS 領域の塩基配列の解読

Nested PCR法によって陽性となったPCR産物から、直接シーケンス法にて、カエルツボカビのITS領域の塩基配列、約300 bpを解読した。

ExoSAP-IT® (Affymetrix, California, USA)を用いて、マニュアルに従い、次のとおり2nd PCR産物から未反応プライマーおよびdNTPsを除去した。氷上で、1検体につき、0.2μlマイクロチューブにExoSAP-IT試薬2μl、および2nd PCR産物5μlの順に入れ、ピペッティング混合した。これをサーマルサイクラーにて、37°C・20分、80°C・15分の条件で反応させた。

次いで、Big dye terminator® (Applied Biosystems, Foster City, CA)を用いて、マニュアルに従い、シーケンス反応を行った。なお、forwardとreverseの両方の塩基配列を解読するために、1検体につき、2つの0.2μlマイクロチューブを用意し、氷上で、次のとおり試薬などを混合した。0.2μlマイクロチューブに①dDW 8μl、②あらかじめマニュアルに従って1/8希釈済Big dye terminator 8μl、③Exo Sap処理した2nd PCR産物2μl、④1.6μMプライマー2μl (一方にはforward: Bd1aを、他方にはreverse: Bd2aを入れる)の順に入れ、合計20μlとし、これをサーマルサイクラーに設置し、反応させた。反応条件は96°C・1分反応させた後、96°C・10秒、50°C・55秒、60°C・4分のサイクルを25サイクル行い、4°C・∞とした。反応後、すみやかにエタノール沈殿を行った。

エタノール沈殿では、1.5μlマイクロチューブに5mM EDTA 5μl、Big dye処理後の検体20μl (全量)、99.5%エタノール60μlを入れて、ピペッティング後、室温15分間、静置させた。その後、4°C・15,000 rpm・20分間、遠心後、上清を捨てた。次いで、70%エタノールを100μl入れ、沈渣物を洗い、4°C・15,000 rpm・10分間、遠心し、上清を捨てた後、室温・遮光環境下にてマイクロチューブの蓋を開けたまま置き、DNA沈渣物を乾燥させた。

ABI PRISM3100 Genetic Analyzerを用いて、精製したDNAの塩基配列を解読した。上述の方法にて各検体の精製したDNAをDW 50μlに溶解し、96穴ウエ

ルプレート (MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate, 製品号: N8010560, Applied Biosystems, Foster City, CA) に入れて、ABI PRISM3100 Genetic Analyzer にて塩基配列を解読した。なお、ABI PRISM3100 Genetic Analyzer の操作は、本学分子生物学研究室教授 村上賢先生に依頼した。

得られた DNA 塩基配列データは、MEGA 6 software および FinchTV1.4 software を用いて、塩基配列を決定した。決定した配列を BLAST で検索し、カエルツボカビの haplotype を決定した。なお、haplotype の命名について、既存の haplotype と同じ場合はその名称を用い、報告されていない haplotype については、Isolate No. をつけた。

2-4 カエルツボカビ ITS 領域の塩基配列のアライメントおよび系統解析

2-3にて得られたカエルツボカビITS領域の塩基配列データを国内検出株56種類、中国検出株21種類、アフリカ検出株8種類ブラジル検出株20種類およびオーストラリア、エクアドル、テキサス検出株、各1種類とともに多重アライメントを行い、系統解析を行った (Goka et al., 2009; Bai et al., 2012; Schloegel et al., 2012)。なお、ブラジル検出株には、過去の報告のMLST解析によって、世界流行系統とされるBd global pandemic lineage: Bd-GPLとBd-GPLよりも先祖代にあたり、ブラジルで検出されているBd-Brazilの2群が含まれている。また、アフリカ検出株もBd-GPLに含まれる。多重アライメントには、MAFFT ver. 7を用いた。系統解析では、MEGA 6 softwareを用いて、近隣結合法にて系統樹を作成した。なお、Goka et al. (2009) の手法を参考して、*Kappamyces*、*Boothiomycetes*および*Terramyces* のITS領域遺伝子を外群として用いた。

第3節 結果

3-1 国内野生下ウシガエル幼生におけるカエルツボカビの検出状況

835匹のウシガエル幼生の口器を対象として、nested PCR法でカエルツボカビの感染を確認したところ、カエルツボカビは高率に感染しており、その感染率は平均32%であった。また、調査した26都府県、44地域のうち19都県、29地域、266匹に感染を認めた (Table 3-1, Fig.3-1)。カエルツボカビは東北 (青森)、関東 (群馬、埼玉、東京、神奈川)、中部 (福井、長野、岐阜、愛知、兵庫、和歌山、鳥取、広島、山口)、四国 (高知)、九州 (福岡、長崎、宮崎、沖縄) と国内に広く分布していた。検出した地域における感染率は3~100%であった (Table 3-1)。特に高率に検出される地域の集積地はなかった。なお、検出されなかった地域は7県、15カ所であった。

3-2 野生下ウシガエル幼生から検出されるカエルツボカビのhaplotype

Nested PCR法により、カエルツボカビが検出された266検体のPCR産物を、直接シーケンス法によりカエルツボカビのITS領域の塩基配列（約300 bp）を解読したところ、68検体の解析に成功した（Table 3-2）。その結果、41種類のhaplotypeが検出され、なかでもA typeが高率（28%）に検出された（Table 3-2, Table 3-3）。

41種類のhaplotypeのうち、過去に報告されているhaplotypeが6種類26検体（A type：19、CW34 Clone N：1、P type：2、Z type：2、Bd41：1、Bd50：1）および今回新たに確認したhaplotypeが35種類42検体（No.7：5検体、No.8：3、No.9：2、その他No.10～No.41：各1）あった（Table 3-2）。

各地方におけるhaplotypeの分布状況は、関東：10種類14検体、中部：6種類9検体、近畿：10種類14検体、四国：5種類8検体、九州：17種類23検体であった。検出されたhaplotypeのうち、A typeは中部地方を除く4地方から認められ、19検体と最も多く検出された（Table 3-3）。その他、No.7が3地方5検体（関東：2検体、近畿：2、四国：1）、Z typeが2地方2検体（四国および九州：各1検体）認められた（Table 3-3）。また、同一地域に複数のhaplotypeが混在していた（Table 3-3）。なお、A typeおよびCW34 Clone Nは世界的に両生類の被害を与えている系統（*B. dendrobatidis* global pantootic lineage: Bd-GPL）に属するtypeであった。また、鳥取で検出されたBd50および長崎で検出されたBd41は、それぞれ中国で検出されたCN3およびCN10と同一の塩基配列であった。

3-3 カエルツボカビITS遺伝子領域における系統解析

本研究で得られた検出株と過去に報告のある国内、中国、アフリカ、ブラジル、オーストラリア、エクアドルおよびテキサス検出株とともに多重アライメントを行った後、近隣結合法にて、系統解析を行った。Clade 形成に明確な地域差は認められなかった。また、中国検出株と同じ clade を形成している検体も認められた（Fig.3-2）。

第4節 考察

日本におけるカエルツボカビの国内分布とそのハプロタイプを解析した結果、カエルツボカビは日本を含むアジアを起源としている可能性が考えられた。

本章によって、カエルツボカビが東北～沖縄まで国内に広く分布しており、感染率が32%と高いことを明らかにした。また、本研究では、過去に日本、中国およびアフリカで認められているhaplotype 6種類（Goka et al., 2009; Bai et al., 2012; Farrer et al., 2011）に加え、新たに32種類のhaplotypeを確認した。既報の国内検出株を含めると（Goka et al., 2009）、日本には少なくとも91種類ものhaplotype

が存在している。検出されたhaplotypeのうち、世界流行系統 (Bd-GPL) に属するA typeが68検体中19検体 (28%) と最も多く、さらに、関東、近畿、四国および九州と最も広域に分布していた。その他、No.7とZ typeが複数地方で確認された。一地方に存在しているhaplotypeは2種類 (中国地方) ~20種類 (九州) と各地方に複数のhaplotypeが混在していた。既報の中国検出株 (CN) およびブラジル検出株 (Bd-Brazil、Bd-GPL) のITSと比較した分子系統解析では、cladeの形成に明確な地域差などは認められなかった。これらの結果から、本章第1節で述べた既報の国内状況も踏まえて、Swei et al. (2011) が提唱した3つの仮説のうち、②カエルツボカビは、日本およびアジアでは固有病原体 (endemic) であり、長い歴史を経て共進化している可能性を示唆している。

中国、韓国の調査においても、感染率が低いことを除いて、カエルツボカビの広域分布、haplotypeの高い多様性および一部に日本と共通のhaplotypeを認め、かつ、地域固有のhaplotypeを多数検出していることは、本研究の結論を支持している (Bai et al., 2012; Bataille et al., 2013)。中国 (Bai et al., 2012) では、野生下両生類 2,075 匹 (在来種 19 種類、ウシガエル成体) におけるカエルツボカビ感染状況を調べたところ、感染率 7.6%であった。検出された haplotype は 30 種類で、その内 20 種類は中国固有 haplotype であり、他 10 種類は中国国外と共通の haplotype であった。その中には、日本検出 type である A、L、E type を含んでいた。さらに、最も多く検出された haplotype は本研究と同じく、世界流行系統である A type であった。韓国では、在来種 13 種類およびウシガエル成体の計 1,863 匹におけるカエルツボカビの感染状況を調べたところ、330 匹 (18%) にカエルツボカビ感染を認めた。その haplotype は 50 種類であった。そのうち、45 種類は韓国と共通の haplotype であり、他 5 種類は、日本検出株である U、P、O type を含む他国と共通の haplotype であった。

興味深いことに、日本 (本研究) および中国 (Bai et al., 2012) から Bd-GPL に属する A type が最も多く検出された。このことから、カエルツボカビがアジアから拡散し、世界的に両生類の減少に関与したことが推察された。しかし、具体的な拡散経路については不明であった。

本章では、国内におけるカエルツボカビ分布調査を行った結果、カエルツボカビは日本に広く分布しており、多数の haplotype が存在していること、また、世界流行系統である A type が広域かつ高率に検出された。分子系統解析では、日本、中国、アフリカ、ブラジル、オーストラリア、エクアドルおよびテキサス検出株の clade 形成において、明瞭な地域差などは認められず、また、中国検出株と同じ clade に含まれるものもあった。過去の調査、中国および韓国の調査 (Goka et al., 2009; Bai et al., 2012; Bataille et al., 2013) も含めて、カエルツボカビ

は日本およびアジアにおいて古くから存在している固有病原体 (**endemic**) であり、両生類在来種とともに共進化していることが推察された。さらに、**Bd-GPL** に属する **A type** が広域かつ高率に検出されたことは、カエルツボカビがアジアから世界に拡散したという仮説を支持するものであった。

Table 3-1. Summary of *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) prevalence in bullfrog sampled in Japan during 2012-2013.

| No. | Region | Collection site | Number of collection | Number of Bd positive | % | Latitude | Longitude | Date |
|-----|-----------------------------------|---------------------------|----------------------|-----------------------|-----|-----------|------------|--------------------------------|
| 1 | Tohoku | Tsuruta machi, Aomori | 1 | 1 | 100 | 40.753603 | 140.378575 | May 13 2012 |
| 2 | Kanto | Tomioka city, Gumma | 57 | 43 | 75 | 36.273364 | 138.887573 | March 28 2012 |
| 3 | | Hanyuu city, Saitama | 13 | 6 | 46 | 36.174547 | 139.601671 | May 1 2012 |
| 4 | | Machida city, Tokyo | 1 | 0 | 0 | 35.598044 | 139.415018 | April 30 2012 |
| 5 | | Machida city, Tokyo | 30 | 4 | 13 | 35.577714 | 139.447514 | May 12 2012 |
| 6 | | Nerima, Tokyo | 31 | 0 | 0 | 35.76656 | 139.63005 | February to April 2012 |
| 7 | | Sagamihara city, Kanagawa | 30 | 4 | 13 | 35.562884 | 139.3195 | April 13 2013 |
| 8 | | Yokohama city, Kanagawa | 30 | 1 | 3 | 35.447362 | 139.531818 | February 17 2012 |
| 9 | | Chubu | Sabae city, Fukui | 35 | 5 | 14 | 35.937822 | 136.147895 |
| 10 | Awara city, Fukui | | 50 | 28 | 56 | 36.217927 | 136.242066 | April 15 2012 |
| 11 | Awara city, Fukui | | 11 | 0 | 0 | 36.230666 | 136.261224 | April 15 2012 |
| 12 | Nagano city, Nagano | | 16 | 8 | 50 | 36.552382 | 138.221955 | April 16 2012, February 5 2013 |
| 13 | Nagano city, Nagano | | 4 | 4 | 100 | 36.345435 | 138.7279 | June 20 2013 |
| 14 | Gifu city, Gifu | | 27 | 6 | 22 | 35.456149 | 136.868841 | February 3 2012 |
| 15 | Okazaki city, Aichi | | 38 | 1 | 3 | Unknown | | January 12 2012 |
| 16 | Okazaki city, Aichi | | 34 | 4 | 12 | 35.00687 | 137.179005 | February 5 2012 |
| 17 | Minamichitamachi Chita-gun, Aichi | | 1 | 1 | 100 | 34.736777 | 136.902164 | February 9 2012 |

Table 3-1. Continue of summary of *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) prevalence in bullfrog sampled in Japan during 2012-2013.

| No. | Region | Collection site | Number of collection | Number of Bd positive | % | Latitude | Longitude | Date |
|-----|---------|-------------------------------------|----------------------|-----------------------|----|-----------|------------|------------------------------|
| 18 | Kinki | Tsu city, Mie | 4 | 0 | 0 | 34.711857 | 136.44705 | March 17 2012 |
| 19 | | Kizugawa city, Kyoto | 8 | 0 | 0 | 34.75961 | 135.820458 | April 22 2012 |
| 20 | | Kyoto | 15 | 0 | 0 | Unknown | | July 2012 |
| 21 | | Kasai city, Hyogo | 19 | 15 | 79 | 34.86575 | 134.8702 | March 19 2013 |
| 22 | | Yamatogun, Nara | 10 | 0 | 0 | 34.655407 | 135.752896 | February 19 2012 |
| 23 | | Tanabe city, Wakayama | 25 | 21 | 84 | 33.734283 | 135.362294 | April 14 2012 |
| 24 | Chugoku | Nanbumachi Saihakugun, Tottori | 34 | 20 | 59 | 35.361568 | 133.345821 | April 16 2012 May 13 2012 |
| 25 | | Kurashiki city, Okayama | 11 | 0 | 0 | 34.619444 | 133.7897 | April 15 2013 |
| 26 | | Konkocho Asaguchigun, Okayama | 11 | 0 | 0 | 34.54333 | 133.6433 | April 11 2013 |
| 27 | | Kurashiki city, Okayama | 33 | 0 | 0 | 34.617025 | 133.783543 | February 17 2012 |
| 28 | | Higashihiroshima city, Hiroshima | 19 | 9 | 47 | 34.39815 | 132.7130 | March 26 2013 |
| 29 | | Akitakata city, Hiroshima | 7 | 0 | 0 | 34.751689 | 132.694329 | February 15 2012 |
| 30 | | Yamaguchi city, Yamaguchi | 8 | 1 | 13 | 34.1901 | 131.500873 | February 29 2012 |

Table 3-1. Continue of summary of *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) prevalence in bullfrog sampled in Japan during 2012-2013.

| No. | Region | Collection site | Number of collection | Number of Bd positive | % | Latitude | Longitude | Date |
|-------|---------|--------------------------|----------------------|-----------------------|-----|-----------|------------|--------------------------------|
| 31 | Shikoku | Kouchi city, Kouchi | 6 | 1 | 17 | 33.526258 | 133.585325 | April 21 2012 |
| 32 | | Kouchi city, Kouchi | 29 | 16 | 55 | 33.547053 | 133.5776 | February 17 2013 |
| 33 | Kyushu | Higashiku, Fukuoka | 9 | 5 | 56 | 33.664232 | 130.36163 | February 5 2012 |
| 34 | | Higashiku, Fukuoka | 8 | 2 | 25 | 33.664232 | 130.36163 | February 5 2012 |
| 35 | | Kitakyushu city, Fukuoka | 30 | 1 | 3 | 33.893375 | 130.719723 | May 1 2012 |
| 36 | | Kitakyushu city, Fukuoka | 5 | 5 | 100 | 33.82147 | 130.909051 | March 7 2012 |
| 37 | | Fukuoka city, Fukuoka | 3 | 0 | 0 | 33.552129 | 130.414085 | April 16 2012 |
| 38 | | Tosu city, Saga | 3 | 0 | 0 | 33.385634 | 130.493106 | April 15 2012 |
| 39 | | Saikai city, Nagasaki | 30 | 19 | 63 | 32.989265 | 129.787052 | February 7 2013 |
| 40 | | Yamaga city, Kumamoto | 19 | 0 | 0 | 33.011424 | 130.775158 | February 28 2012 |
| 41 | | Oita city, Oita | 1 | 0 | 0 | 33.200725 | 131.658564 | February 19 2012 |
| 42 | | Miyazaki city, Miyazaki | 49 | 33 | 67 | 31.962293 | 131.413159 | March 24 2012, March 6 2013 |
| 43 | | Kumejimacho, Okinawa | 2 | 2 | 100 | Unknown | | February 20 2012 |
| 44 | | Kumejimacho, Okinawa | 28 | 0 | 0 | 26.359679 | 126.749511 | February 20 2012 |
| Total | | | 835 | 266 | 32 | | | |

Table 3-2. Haplotype and sample number of detected *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) haplotypes.

| Haplotype | number of detected sample |
|------------------------------|------------------------------|
| A type | 19 |
| CW34 Clone N | 1 |
| P type | 2 |
| Z type | 2 |
| Bd 41 | 1 |
| Bd 50 | 1 |
| No.7 | 5 |
| No.8 | 3 |
| No.9 | 2 |
| Other 32 types (No. 10 – 41) | 32 (1in each sample) |
| total 41 types | 68 samples |

Table 3-3. Detected *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) haplotypes in each collection site.

| Region | Collection site | Haplotype | | |
|---------|--------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------|---|
| | | Number of detected kind of haplotype | Total number of detected Bd | Kind of haplotypes (number of detected sample) |
| Kanto | Tomioka city, Gunma | 8 | 11 | A type (3), No.7 (2), No.17 – No.22 (each 1 tadpole) |
| | Hanyuu city, Saitama | 1 | 1 | A type (1) |
| | Machida city, Tokyo | 1 | 1 | No.31 (1) |
| | Yokohama city, Kanagawa | 1 | 1 | No.15 (1) |
| Chubu | Awara city, Fukui | 1 | 1 | No.25 (1) |
| | Nagano city, Nagano | 2 | 4 | No.8 (3), No.26 |
| | Gifu city Gifu | 2 | 2 | P type (1), No.9 (1) |
| | Okazaki city, Aichi | 2 | 2 | P type (1), No.14 (1) |
| Kinki | Kasai city, Hyogo | 4 | 4 | No.38 – No.41 (each 1 tadpole) |
| | Tanabe city, Wakayama | 4 | 8 | A type (4), No.7 (2), No.23 (1), No.24 (1) |
| chugoku | Nanbucho Saihakugun, Tottori | 2 | 2 | CW34 Clone N, Bd50 |
| Shikoku | Kouchi city, Kouchi | 5 | 8 | A type (3), Z type (1), No.7 (1), No.36 (1), No.37 (1) |
| Kyushu | Fukuoka city, Fukuoka | 5 | 7 | A type (1), No.10 – No.13 (each 1 tadpole) |
| | Kitakyushu city, Fukuoka | 5 | 5 | A type (1), No.27 – No.30 (each 1 tadpole) |
| | Saikai city, Nagasaki | 7 | 8 | A type (2), Z type (1), Bd41 (1), No.32 – No.35 (each 1 tadpole) |
| | Miyazaki city, Miyazaki | 2 | 2 | A type (1), No.8 (1) |
| | Kumejimacho shimajirigun, Okinawa | 1 | 1 | No.16 (1) |



Fig. 3-1. Distribution of *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) in Japan. Bd detected sites are indicated as red marker, and undetected sites are indicated as blue marker.

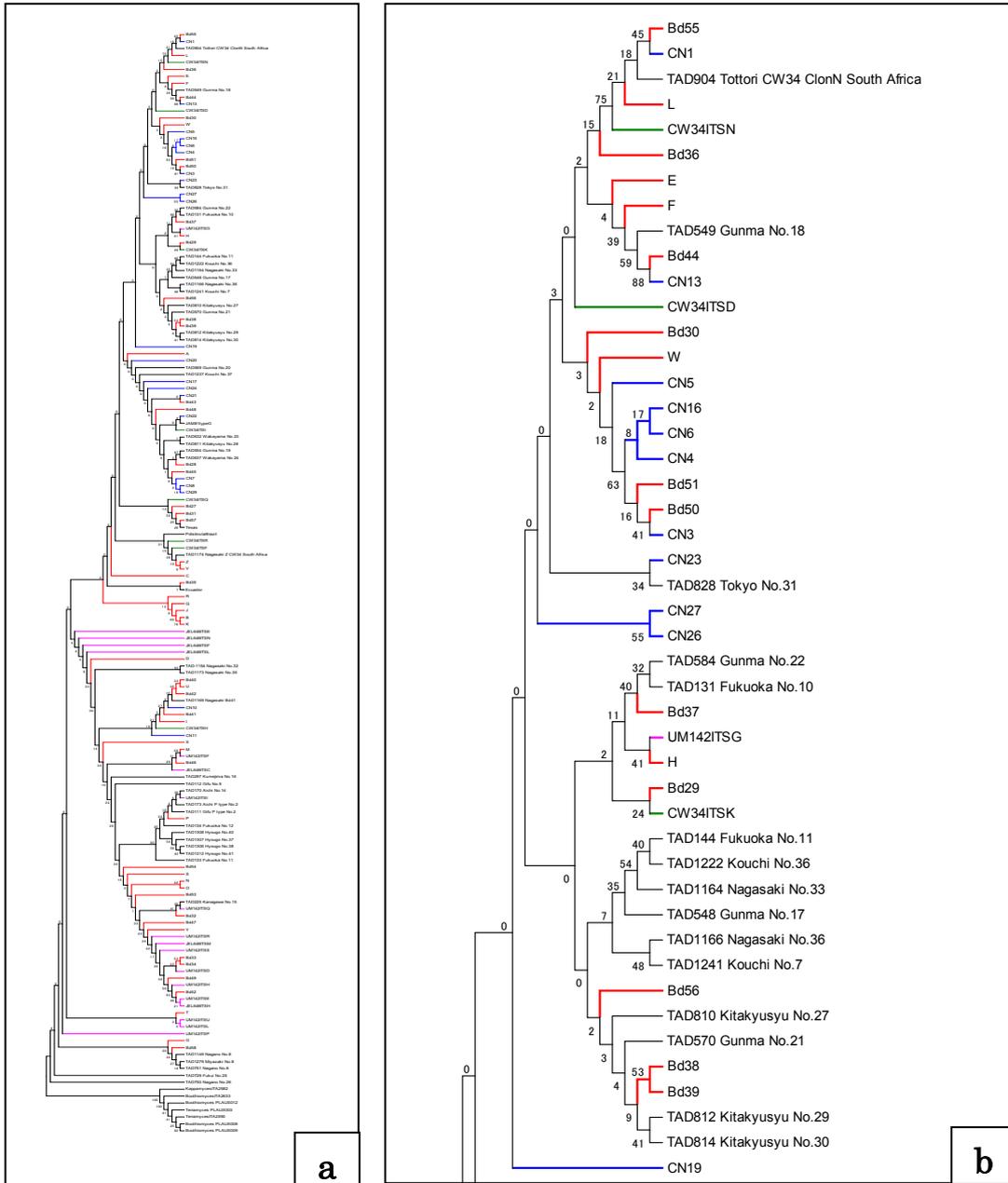


Fig. 3-2. Phylogenetic tree of *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) that detected in Japan, China, Brazil, Texas, Australia, Ecuador and Africa. (a) The whole drawing of phylogenetic tree. (b, c, d) The enlarged drawing of a part of phylogenetic tree. The colors of branches indicate as follows. Black: Bd detected in this study and out group. Red: Bd already detected in Japan. Blue: Bd detected in China. Green: Bd detected in Africa and belong to Bd-GPL lineage. Pink: Bd-GPL.

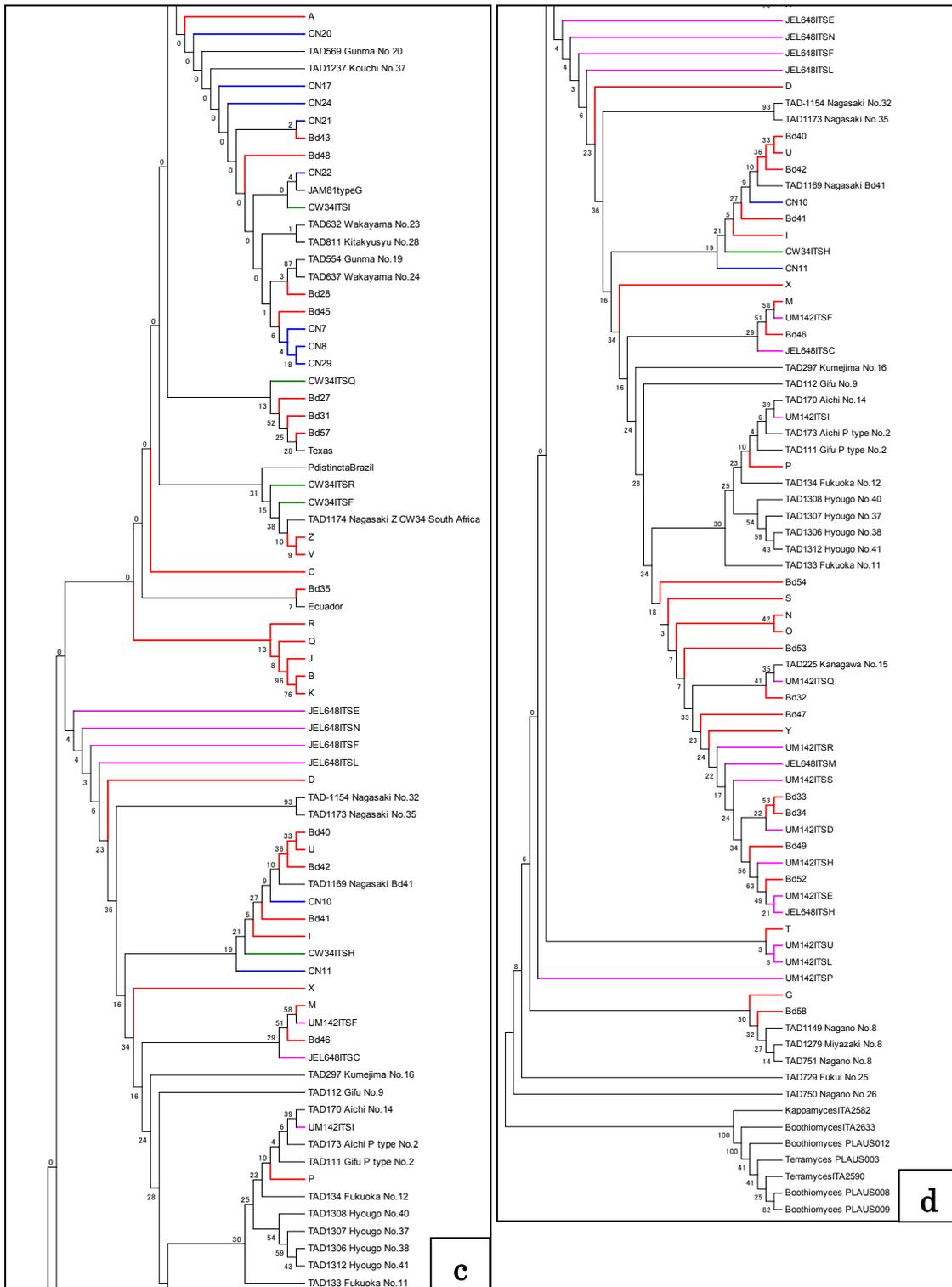


Fig. 3-2. Continue of phylogenetic tree of *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) that detected in Japan, China, Brazil, Texas, Australia, Ecuador and Africa.

第4章 カエルツボカビ感染が皮膚水吸収に与える影響

第1節 緒言

第4章では、無尾類両生類（カエル）の皮膚に分布する水チャンネル、アクアポリンに着目して、ツボカビ症の病理発生機序を解明した。

現在のカエルツボカビ研究は、生態系保全などを目的とした疫学的研究が主流となっているが、カエルツボカビの感染から死に至る機序については、未だ十分に解明されていない（Rosenblum et al., 2010）。ツボカビ症の死の機序に関して、カエルツボカビがカエルの皮膚に感染することによって、血漿電解質が減少し、心不全によって死亡すると報告されている（Voyles J et al., 2009; Voyles J et al., 2007）。しかし、これは死因を特定したにすぎない。一方、カエルの皮膚はガス交換、電解質輸送、水吸収などを担っており、生命維持に大きく関わっている（Hillman et al., 2009）。ツボカビ症の病理発生機序を解明するためには、両生類、特にカエル特有の皮膚生理学的機能の破綻を解明する必要がある。

カエルは、下腹部～腹側大腿部（pelvic patch）の皮膚に分布する Aquaporin: AQP を介して水を吸収する（鈴木 雅一ら 2014）。AQP は、細胞膜に存在する水チャンネルである。哺乳類では、13 種類の AQP（AQP0～AQP12）が確認されており、腎臓、膀胱、眼の水晶体、肝臓、脂肪組織、皮膚など様々な器官に分布している。両生類には、ヒトの AQP に相当する AQP が 10 種類（AQP0～AQP5、AQP7～AQP10）同定されている他、無尾類特異的 AQP として AQP_{Pa1} および AQP_{Pa2S} (AQP6_{vs}) が確認されており、皮膚、腎臓、膀胱などに存在している。なかでも、それぞれ機能の異なる AQP_{Pa2S} (AQP6_{vs}) と AQP3 の 2 種類はカエルの皮膚水透過性に関与している。

カエルの皮膚は、多くの主細胞と少数のミトコンドリア豊富細胞（mitochondria-rich cell）から成っている。主細胞は、表層から深層に向かって角質層、顆粒層、有棘層および基底層（胚芽層）の層構造を形成している（Hillman et al., 2009）。AQP_{Pa2S} (AQP6_{vs}) は最外層の皮膚顆粒細胞の細胞質内に存在し、抗利尿ホルモン Arginine vasotocin (AVT) の刺激を受けると、細胞の頂端膜（apical membrane）に移動して水を吸収する（Hasegawa et al., 2003）。AQP3 は数層の顆粒細胞の側底部細胞膜（basolateral membrane）に存在し、AVT 刺激の有無に関わらず、水を透過させる。このことから、皮膚を介する水の移動は、AVT の刺激によって、AQP_{Pa2S} (AQP6_{vs}) を介して、外界の水が細胞質内に取り込まれ、AQP3 を介して、細胞質から間質、血管側に輸送されると考えられている。また、水吸収の調節は AQP_{Pa2S} (AQP6_{vs}) を介して行われると考えられている（Hasegawa et al. 2003, 鈴木ら 2014）。

我々はツボカビ症の病理発生機序の1つに、この AQP の生理的機能の破綻が関与していると考えた。本章では、カエルツボカビ感染がカエルの水吸収調節に与える影響について調べた。

第2節 材料および方法

カエルツボカビ感染によるカエルの水吸収の影響を調べるために、高感受性動物であるイエアメガエル (*Litoria caerulea*) にカエルツボカビを実験感染させ、カエルの皮膚水吸収の生理学的検索を行い、カエルツボカビ感染による影響を血清生化学的および病理組織学的に検索した。なお、本研究では、表皮表層に分布する AQP の影響を調べることを目的としたことから、感染期間1週間という軽度のツボカビ症を再現した。

2-1 動物

感染実験には、Voyles et al.を参考に、カエルツボカビ高感受性動物であるイエアメガエル (*L. caerulea*) を感染群、対照群、各5匹、合計10匹を用いた (Voyles et al., 2009)。これらの動物の体長は平均7.3cm (6.5~8.1cm)、体重は平均32g (19.9~49.6g) であった。なお、これらのカエルはペット用として市販されている動物を用いた。また、実験前、nested PCR 法にて、2匹にカエルツボカビ感染を認めたことから、抗真菌薬0.001% イトラコナゾール (イトリゾール内用液1%、ヤンセンファーマ(株)、東京) 10日間の薬浴後、70日間の休薬期間を設けた。

2-2 菌株

カエルツボカビは、過去に飼育下外来種を大量死させた高病原性株、ITS haplotype: C type の凍結保存株 (独立行政法人 製品評価技術基盤機構より提供) を用いた。菌株は室温にて解凍後、PmTG 寒天平板培地に培養し、同液体培地に継代培養したものを使用した。

2-3 感染実験

すべてのカエルは個別に飼育、取り扱い、次のとおり感染実験を行った。

感染群において、1mL の蒸留水中にカエルツボカビ遊走子 1×10^6 、5,000 または 6,000 個の濃度になるように液体培地を添加した菌液を入れた容器にカエルを入れて、20 または 100ml (カエルの腹部~側面が浸かる量) を添加し、24 時間浸漬させた (Table 4-1)。24 時間後、カエルを通常飼育に戻した。感染期間は7日間 (菌液を添加した日を1日目とする) とした (Table 4-1)。

対照群においては、感染群同様に、飼育水に24時間後浸漬後、通常飼育した。

感染期間中は毎日、カエルを観察し、臨床症状の有無を確認した。給餌は感染期間中1回のみ、コオロギを3匹与えた。

2-4 採材

感染実験後、カエルの皮膚水透過性試験、血清生化学的、分子生物学的（カエルツボカビ感染の確認）および病理組織学的検索を行うために次のとおり、採材した。

カエルの体長および体重を測定後、ピッシングを行った。その後、血清生化学的検索のために、胸部を切開し、心臓を露出、切開し、ヘパリン処理済ヘマトクリット毛細管で血液を採り、1.5ml チューブに集めた。採取した血液は、3,000rpm、5分間、遠心し、血清を回収し、血清生化学的検索を行うまで -80°C にて保存した。採血を行った後、カエルの頭部を剪刀で切断破碎した。その後、水透過試験および病理組織学的検索を行うために、下腹部～大腿部および背部の皮膚を採取した。病理組織学的検索では、採集した皮膚約 $1\times 3\text{cm}$ をろ紙に貼り付け、PLP固定液に固定した。分子生物学的検索（カエルツボカビ感染の確認）のために、腹側皮膚および指端の皮膚を採取した。

その他、背景病変の有無を病理組織学的に調べるために、腎臓、膀胱、腹側・背側・大腿部皮膚、脳を除く緒臓器をホルマリン固定した。

2-5 水透過試験

大腿部および背部皮膚において、それぞれ Arginine vasotocin (AVT) 反応性 (AQP2) 水吸収および AVT 非反応性 AQP (AQP3) 水吸収量を調べるために、大腿部と背部皮膚を次のとおり前処理し、水透過性試験を行った。

前処理において、採取した皮膚を AVT 刺激条件および非刺激条件に用いるため、2分割した後、両生類用リンゲル液に30分間浸漬した。その際、余分な筋肉、皮下結合組織などを排除した。その後、AVT 刺激条件に用いる皮膚は 10^{-8}M AVT 含有両生類用リンゲル液に15分、両生類用リンゲル液に15分の順に浸漬させた。AVT 非刺激条件に用いる皮膚は両生類用リンゲル液に30分間浸漬した。

Ussing chamber 改良装置を用いて、上記のとおり前処理を行った皮膚の水透過性試験を行った。本装置は、測定する皮膚を境界とし、2区画に分かれており、表皮側（外界側）に飼育水を入れ、皮下組織側（体内側）には、AVT 刺激条件の皮膚には 10^{-8}M AVT 含有両生類用リンゲル液を、AVT 非刺激条件の皮膚には両生類用リンゲル液を入れた。装置の体内側には、内部に攪拌スターラーを入れ、溶液を攪拌させ、また、上方にメスシリンダーを挿し、5分間隔のメスシリンダーの水位の上昇の有無を記録し、合計45分における水の吸収量を測定した。

2-6 病理組織学的検索

カエルツボカビ感染による皮膚病変を調べるため、すべての個体の腹部および背部皮膚を病理組織学的に観察した。また、感染群 3 匹 (AP57、58、60) および非感染群 2 匹 (AP56、59) の皮膚病変を半定量的に解析した。

PLP 固定した皮膚は、固定約 24 時間後に 70%エタノール固定に移した。その後、キシレンで透徹、パラフィンに置換・包埋、薄切し、常法に従い HE 染色およびカエルツボカビ感染の確認のためにファンギフローラ Y 染色を行った。

カエルツボカビ感染による皮膚病変の組織学的変化を半定量的に解析するため、感染群 3 匹 (AP57、58、60) および非感染群 2 匹 (AP56、59) の皮膚約 5.2mm 範囲における表皮細胞層 (基底層～顆粒層) および角質層の面積を測定した。また、表皮細胞数をカウントした。これらの計測には、画像解析ソフト Image J を用いた。

カエルの背景病変などの有無を調べるために、常法に従い、心臓、肝臓および脾臓の組織標本作製し、病理組織学的に検索した。

2-7 血清生化学的検索

すべてのカエルから採取した血清を用いて血清生化学的検索 (膠質浸透圧、Na、K、Mg、Ca、Cl) を行った。なお、本検索は静岡大学大学院理学研究科、鈴木雅一先生に依頼した。

2-8 分子生物学的検索 (カエルツボカビ感染の確認)

カエルツボカビの感染の有無を調べるために、感染群 3 匹 (AP57、58、60) および非感染群 2 匹 (AP56、59) の皮膚および指端を材料とし、第 1 章 2-2-2 と同様に nested PCR 法を行った。

2-9 統計解析

カエルツボカビ感染の影響を評価するために、皮膚水透過性試験、病理組織学および血清生化学的検索結果の統計解析を行った。

水透過性試験においては *Turkey's test* を、血清電解質性状においては t 検定を行った。

計測した感染群および対照群における角質層面積、表皮面積および表皮細胞数の有意差を求めるため、マン・ホイットニーの *U* 検定を行った。

第3節 結果

3-1 臨床症状

感染群 5 匹のうち、3 匹（AP7、10、60）にカエルツボカビ感染の特徴的臨床症状である高度の脱皮を認めた。また、AP60 に食欲不振・元気消失を認めた。

3-2 カエルツボカビ感染の有無

感染群 5 匹中、2 匹にカエルツボカビ感染を確認した。Nested PCR 法を行った 5 匹（感染群：AP57、58、60、対照群：56、59）中 1 匹（感染群：AP57）にカエルツボカビ特異バンドを認めた。病理組織学的に検索した 10 匹中、1 匹（感染群：AP7）にカエルツボカビ感染を確認した。

3-3 カエルツボカビ感染による水透過性の影響

カエルツボカビ感染によって、大腿部皮膚の水透過性を介する水分調節が障害されていることを確認した。なお、背部皮膚には対照群、感染群ともに水透過性は認められなかった。

大腿部皮膚において、AVT 非刺激条件（AQP3 を介する水吸収）における平均水吸収量は、対照群が $-2\mu\text{l}$ であったのに対して、感染群は $41\mu\text{l}$ と有意に多かった（Fig 4-1）。一方、AVT 刺激条件（AQP α 2 を介する水吸収）における感染群の平均水吸収量は、対照群が $110\mu\text{l}$ であったのに対して、感染群が $64\mu\text{l}$ と有意に低かった（Fig 4-1）。その結果、AVT 刺激および非刺激条件の水吸収量の差は、非感染群が $112\mu\text{l}$ に対し、感染群は $23\mu\text{l}$ と低かった（Fig 4-1）。

背部皮膚の水吸収量は、AVT 刺激の有無に関わらず、対照群（AVT 非刺激条件： $-25\mu\text{l}$ 、AVT 刺激条件： $-17\mu\text{l}$ ）、感染群（AVT 非刺激条件： $-8\mu\text{l}$ 、AVT 刺激条件： $-17\mu\text{l}$ ）ともに、水吸収は認められなかった（Fig 4-1）。

3-4 皮膚における病理組織学的検索結果

感染群の皮膚には、背部、腹部ともに軽微であったが、カエルツボカビ感染による組織学的変化が認められた。すなわち、感染群すべての個体に角質層の肥厚・水腫、表皮細胞の過形成・変性などの他、表皮細胞の極性の乱れといった分化秩序の乱れが認められた（Fig 4-2, b-c）。また、2 匹（AP57、AP58）の表皮有棘細胞層において、淡明な核および細胞質を特徴とする細胞が瀰漫性に観察された（Fig 4-2, c）。

病変の半定量解析では、感染群と対照群において有意差は認められなかったが、角質層および表皮細胞層（基底層～顆粒層）の面積の拡大および表皮細胞数の増数を認めた（Table 4-2）。

3-5 血清生化学的検索結果

カエルツボカビ感染による血液性状の変化を調べるため、膠質浸透圧および Na、K、Mg、Ca ならびに Cl の濃度を測定した。

K 値を除いて、膠質浸透圧および血液電解質成分は、減少していた (Table 4-3)。これらの成分のうち、Mg と Ca 値の低下には有意差を認めしたが、膠質浸透圧、Na および Cl 値の低下には有意差は認められなかった (Table 4-3)。

第 4 節 考察

以上の結果より、我々はツボカビ症の病理発生機序において、カエルツボカビ感染から心不全に至る経路の 1 つに、皮膚水透過性を介する水分調節機能の障害が関与していると結論づけた。

無尾類両生類の皮膚は、ガス交換、電解質輸送、水透過など生体恒常性の維持に重要な役割を果していることから (Hillman et al., 2009)、カエルツボカビ感染がこれらの機能に影響を与える可能性が想定される。Voyles et al (2007) は実験的にカエルツボカビを重篤感染させたイエアメガエルの血液生化学検査を行ったところ、血漿膠質浸透圧、電解質成分 (Na、K、Mg および Cl) が総じて減少したことを確認している。血中電解質成分の減少には、皮膚を介する水吸収量の増加に伴う、電解質成分の相対的減少 (電解質成分の希釈) または、水吸収量に変化は無く、電解質成分が循環血中から喪失する絶対的減少が考えられる。これに対し、Voyles et al (2007) は体重、アルブミン値やヘマトクリット値の低下を認めないことから、絶対的減少を引き起していると推察している。さらに Voyles et al (2009) は、皮膚および心臓における電気生理学的実験を行い、カエルツボカビ感染が皮膚を介する Na の吸収を阻害し、また、Na および Cl チャネル活性を低下させること、感染末期に心不全で死亡することを確認したことから、カエルツボカビの感染によって、電解質の低下を引き起し、心不全を招来すると述べている。しかし、これらの研究は感染カエルの皮膚の水透過性について調べていない。我々の研究は、カエルツボカビ感染によって、AVT の作用によって外界から水を取り込む AQP2S(AQP6vs) を介する水吸収量は低下し、一方、表皮細胞の基底側膜側に構成的に存在し、AVT の作用に関わらず水を透過させ、血管極への水輸送に関わる AQP3 を介する水吸収量は上昇することを確認した。これは、カエルツボカビ感染によって、主として AQP2S(AQP6vs) を介する水吸収が阻害されており、また、何らかの形で皮膚を透過した水が AQP3 を介して吸収されていることを示唆している。Voyles et al (2007) が水の吸収に影響を認めなかったことは、おそらく AQP2S(AQP6vs) を介する水吸収量は低下しても、AQP3 による水吸収量の上昇が補正していたものと思われる。し

かしながら、カエルツボカビの感染が宿主に対し、水吸収の亢進または脱水に導くのかについては、今後、更なる研究が必要である。

病理組織学的検索では、角質層の肥厚と表皮細胞の増生を認めたが、カエルツボカビの感染は2匹のみしか認められず、また、糜爛、潰瘍など形態的に明らかな傷害は観察されなかった。この結果は、カエルツボカビ感染によるカエルの水透過を含む皮膚生理機能障害は、単純な物理的傷害による変化というよりも、むしろ、カエルツボカビから放出される毒素、生理活性物質などによって引き起される可能性が高いと推察した。皮膚ツボカビ症の程度が軽度であったにも関わらず、水透過性の影響に有意差と認めたことは、カエルツボカビ感染は皮膚水透過性に対し、強く影響を与えることが示唆され。

本研究において、感染群の血中電解質成分は、Kを除いて、Voyles et al (2007)と同様に減少していた。カエルの皮膚には Na^+ チャネル、 $\text{Na}-\text{K}-\text{Cl}$ 共輸送担体、 $\text{Na}-\text{K}$ ATPase など種々のトランスポーターが分布し、電解質の恒常性を維持していることから (Hillman et al., 2009)、電解質喪失機序の詳細については今後、詳細に調べる必要がある。なお、血中Kレベルの高値は、一部の検体に溶血を認めたことから、溶血による変化であると考えた。

感染群におけるカエルツボカビ感染を確認した個体は、5匹中2匹であった。これは、本研究におけるツボカビ症の程度が感染期間的に7日間と短く、軽度であったこと、または、実験に用いたカエルは、事前検査にて、すでにカエルツボカビに感染していたため、除菌を行った。そのため、すでにカエルツボカビに対して抵抗性を獲得していた可能性が考えられた。

感染群の内2匹の表皮に淡明な核および細胞質を有する細胞を瀰漫性に認めた。カエルの皮膚に認められる淡明な細胞質を特徴とする細胞として、カエルの皮膚に散在するミトコンドリア豊富細胞 (mitochondria-rich cell) または樹状細胞 (dendritic cell) である可能性、または主細胞の変性などと思われたが、特定できなかった。

本章では、高感受性動物イエアメガエルを用いてカエルツボカビ感染実験を行い、カエルの皮膚水透過性について、生理学的、生化学的および病理組織学的に調べた結果、皮膚ツボカビ症から心不全に至る病理発生機序の1つとして、カエルの皮膚水透過性に影響を与えることを解明した。

Table 4-1. Summary of infection experiment of *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd).

| Group | Animal number | sex | Body length (cm) | Body weight (g) | Exposure dose (zoospores / ml) | Exposure duration (day) | Clinical sign | Bd Infection |
|-----------|---------------|--------|------------------|-----------------|--------------------------------|-------------------------|---------------------|--------------|
| Infection | AP7 | Male | 8.1 | 49.6 | 1x 10 ⁶ | 7 | sloughing | Bd +* |
| | AP10 | Female | 6.7 | 24.0 | 1x 10 ⁶ | | sloughing | - |
| | AP57 | Male | 7.4 | 34.1 | 5,000 | | - | Bd +** |
| | AP58 | Female | 7.6 | 31.9 | 5,000 | | - | - |
| | AP60 | Male | 7.2 | 39.6 | 6,000 | | sloughing, lethargy | - |
| Control | AP8 | Male | 6.5 | 19.9 | Not done | - | - | - |
| | AP9 | Female | 6.6 | 20.9 | | | - | - |
| | AP12 | Male | 7.2 | 29.8 | | | - | - |
| | AP56 | Male | 8.1 | 38.7 | | | - | - |
| | AP59 | Female | 7.4 | 33.4 | | | - | - |

* Bd infection was confirmed in stratum corneum of thigh skin by histopathological examination.

** Bd infection was confirmed by nested PCR.

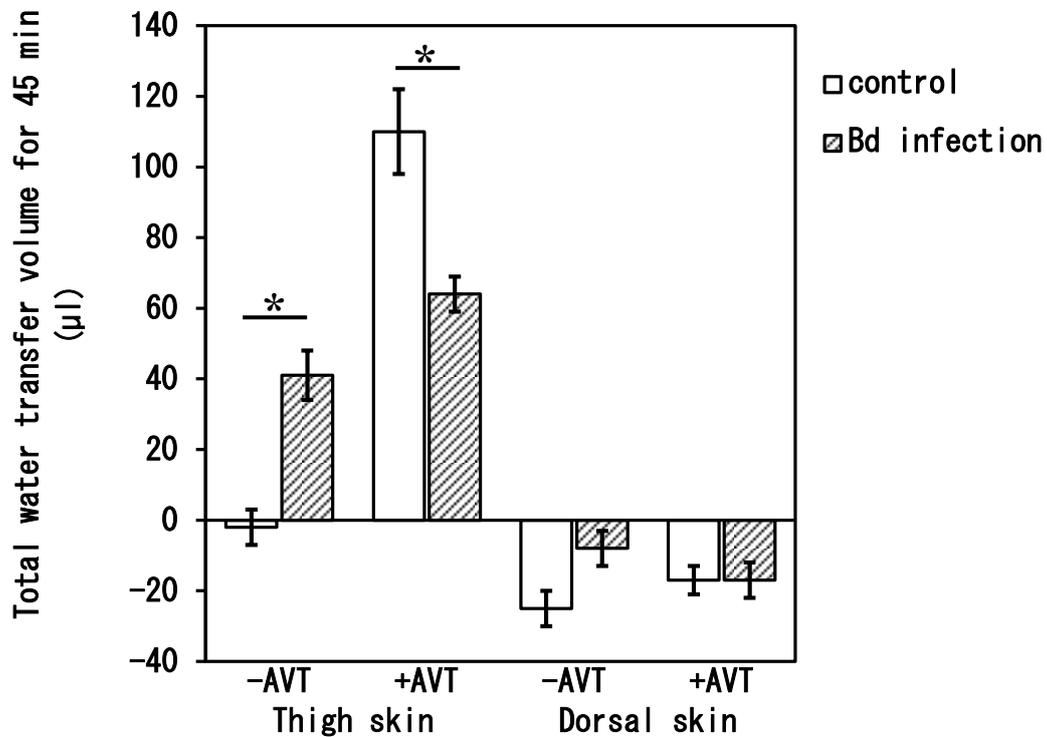


Fig 4-1. Comparison of water permeability across thigh skin and dorsal skin in with or without Arginine vasotocin (AVT) stimulation in *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) uninfected and Bd infected *Litoria caerulea*. In thigh skin, the water permeability with AVT stimulation of Bd infection was significantly higher than that of control, but without AVT, water permeability of Bd infection was significantly lower than that of control ($P < 0.05$, $N = 5$). Water permeability of dorsal skin of both Bd infection and control was not confirmed with both AVT stimulated and unstimulated.

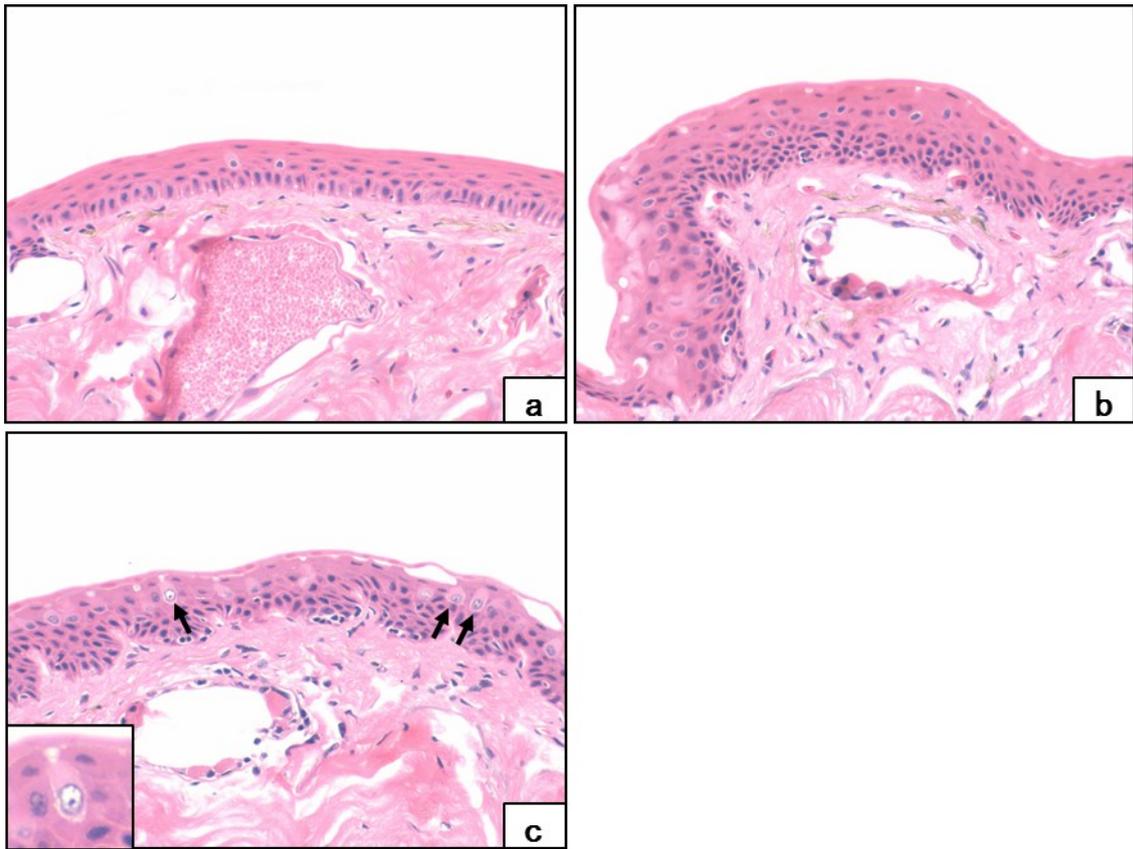


Fig 4-2. The thigh skins of normal (a) and *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) infected (b, c) frogs. (a) The normal epithelium is composed of 4 to 5 layered structure; from deep to surface, stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum and stratum corneum. Epithelial cells differentiate from cuboidal basal cell to flattened granular cell and cornification in differentiation process. (b) Hyperkeratosis with edema and hyperplasia of epithelial cells is confirmed in Bd infected frog. (c) Clear nucleus and cytoplasm cells diffuse in stratum spinosum (arrows). Insertion is magnified figure.

Table 4-2. Comparison of histopathological evaluation of thigh and dorsal skins in infection and control groups. Skins were examined for 5.22 mm. The areas of epidermis and of stratum corneum, and the number of epithelial cell of infection group were higher than that of control group. But there were not significantly differences (P = 0.05).

Thigh skin

| Measured variables | Control group | | | | Infection group | | | | | | Mann-Whitney |
|-------------------------------------|---------------|--------|---------|-----------|-----------------|--------|--------|--------|---------|-----------|---------------|
| | AP56 | AP59 | average | Std error | AP7 | AP57 | AP58 | AP60 | average | Std error | <i>U</i> test |
| Epidermis (μm^2) | 217426 | 149661 | 183544 | 33883 | 145123 | 223098 | 259674 | 219009 | 211726 | 24009 | P>0.05 |
| Stratum corneum (μm^2) | 25655 | 22926 | 24291 | 1365 | 50160 | 37937 | 53643 | 75179 | 54230 | 7753 | P>0.05 |
| Number of epithelial cell | 2209 | 1692 | 1951 | 259 | 1594 | 1855 | 2745 | 2156 | 2088 | 247 | P>0.05 |

Dorsal skin

| Measured variables | Control group | | | | Infection group | | | | | | Mann-Whitney |
|-------------------------------------|---------------|--------|---------|-----------|-----------------|--------|--------|--------|---------|-----------|---------------|
| | AP56 | AP59 | average | Std error | AP7 | AP57 | AP58 | AP60 | average | Std error | <i>U</i> test |
| Epidermis (μm^2) | 143413 | 123772 | 133593 | 9821 | 211857 | 165810 | 134453 | 149159 | 165320 | 16783 | P>0.05 |
| Stratum corneum (μm^2) | 21022 | 19906 | 20464 | 558 | 27370 | 27430 | 30778 | 62601 | 37045 | 8556 | P>0.05 |
| Number of epithelial cell | 1318 | 1108 | 1213 | 105 | 1164 | 1217 | 1354 | 1414 | 1287 | 58 | P>0.05 |

Table 4-3. Blood biochemical parameters of *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) infected and uninfected *Litoria caerulea*.

| Factor | Control group (n=5) | | Bd infection group (n=5) | | t-test |
|----------------------|---------------------|-----------|--------------------------|-----------|--------|
| | Average | Std error | Average | Std error | |
| Osmolarity (mOsm/kg) | 242.90 | 8.67 | 229.40 | 2.23 | P>0.05 |
| Na (mM) | 120.99 | 5.93 | 110.15 | 4.40 | P>0.05 |
| K (mM) | 17.85 | 2.02 | 22.33 | 5.34 | P>0.05 |
| Mg (mM) | 1.76 | 0.14 | 1.31 | 0.10 | P<0.05 |
| Ca (mM) | 2.58 | 0.14 | 2.07 | 0.13 | P<0.05 |
| Cl (mM) | 83.22 | 2.62 | 79.40 | 1.41 | P>0.05 |

総括

本研究は、カエルツボカビ (*Batrachochytrium dendrobatidis*) の起源およびツボカビ症の病理発生の解明を目的とした。

第1章では、効率的なカエルツボカビの国内実態調査を行うために、有効な手法として、ウシガエル幼生をモニター動物として、その口器を被検材料とする nested PCR を行うことを確立した。第2章では、カエルツボカビの季節変動を調べ、2~6月が国内実態調査の最適時期であると決定した。第3章では、1~2章で確立した手法を用いて、国内実態調査を行った結果、カエルツボカビは日本およびアジアを起源としている可能性が推察された。第4章では、実験感染させたカエルの皮膚における生理学的、病理学的検索および血液生化学的検索によって、カエルツボカビ感染から心不全に至る機序において、皮膚 AQP を介する水吸収調節機能の障害が関与することを解明した。

1 カエルツボカビ国内実態調査におけるウシガエル幼生の口器を用いた nested PCR の有用性

カエルツボカビ国内実態調査における有効なモニター動物および検査法を検討した結果、ウシガエル幼生の口器を検査材料とした nested PCR 法が有効であると結論づけた。

我々はウシガエル幼生において、カエルツボカビ感染に関連する口器ツボカビ症を認めた。その特徴は肉眼的に嘴の色素消失・色素沈着層の菲薄化および歯列の淡明化であった。組織学的には、嘴の色素上皮層における色素の減少または消失、角質層の肥厚（角化亢進または不全角化）、上皮細胞過形成、角質層にカエルツボカビ遊走子嚢の感染を特徴としていた。ウシガエル幼生の口器を拭った滅菌綿棒 (swab) および切除した口器を材料とする nested PCR 法ならびに切除した口器を組織学的に観察する病理組織検査における感度を比較した。各検査法において、それぞれ 60 匹のウシガエル幼生を検査した結果、検出率は swab PCR 法 (67%)、組織 PCR 法 (63%) および病理組織検査 (33%) の順に高かった。Swab PCR 法の検出率が最も高かったが、swab の採取には採取者の手技に影響されること、ウシガエル幼生は捕獲圧を考慮する必要が無いことから、組織 PCR 法が有効な検査法であると結論づけた。

ウシガエルはほぼ全国に分布しており、過去の研究から本種が保有するカエルツボカビの haplotype の種類が多いことが確認されている。さらにウシガエルは、特定外来種であり、捕獲圧を考慮する必要が無い。また、ウシガエルは日本のみならず、北米、中米、ヨーロッパ、タイ、台湾など世界的に分布域が広

い。このことから、我々が確立した検査法は、過去にオーストラリア、ニューギニア、カリフォルニアなどにおける地域固有の無尾類幼生を用いた調査法よりも汎用性に優れている。

また、口器ツボカビ症は肉眼で確認できることから、採集池におけるカエルツボカビの感染状況を簡易的に推測することが可能である。

2 ウシガエル幼生におけるカエルツボカビ感染の季節変動

国内野生下のカエルツボカビ感染率は気温の上昇はじめる4～6月に高く、気温の高い8月および気温が低下して間もない10月には感染個体が確認できないという季節変動があった。よって、カエルツボカビ国内実態調査には、カエルツボカビの感染を認めた2～6月に行うことが適切であると結論づけた。

なお、カエルツボカビ感染率の季節変動が認められる理由として、カエルツボカビは17～25℃を至適発育温度とし、高温環境に非常に弱いという至適発育温度との関連が示唆された。このことから、国内自然界におけるカエルツボカビ感染動態の年間サイクルは、冬～春にかけて増殖・拡大し、気温が発育至適温度を上回る夏季に大きく減少した後、晩秋～冬にかけて再び拡大するというサイクルがあることを明らかにした。オーストラリアやカナダの一部でも同様の季節変動が認められることから、類似した気候を有する温帯地方では、本研究で認めた感染動態と同様のカエルツボカビ感染率の季節変動性が認められるものと思われる。

3 野生下ウシガエル幼生を対象としたカエルツボカビの国内分布と遺伝子型

日本におけるカエルツボカビ分布状況を明らかにした結果、カエルツボカビは日本およびアジアを起源とし、世界中に拡散した可能性がある」と結論づけた。本研究では、次の5点を明らかにした。①カエルツボカビは国内に広く分布しており、総感染率32%と感染率が高い。②ITS領域を指標とするhaplotype解析において、カエルツボカビは、国内には少なくとも91種類ものhaplotypeが存在しており、中でも世界レベルの両生類の減少に関与する世界流行系統

(Bd-GPL)に属するA typeが広域かつ高率に存在している。③A typeと同じくBd-GPLに属するCD34 Clone Nや、中国で検出されたCN3およびCN10と同じhaplotypeが存在している。④一地方に複数のhaplotypeが混在しており、また、少なくとも3種類(A type、Z type、No.7)は複数地方に分布している。⑤分子系統解析においてBd-GPL、中国、ブラジル、アフリカなどから検出されたhaplotypeとのclade形成に明瞭な地域差は認められない。調査報告されているアジア諸外国と共通する疫学的特徴：カエルツボカビによる大量死が認められな

い、カエルツボカビは広域に分布し、その haplotype の多様性が高いことから、アジア起源説を支持するものである。

4 カエルツボカビ感染が皮膚水吸収に与える影響

カエルの皮膚 AQP を介する水透過性に着目し、実験感染させた高感受性動物イエアメガエルにおける水透過性試験、生理学的および病理組織学的検索を行った結果、カエルの皮膚透過性における水調節機能の障害を確認した。すなわち、抗利尿ホルモン反応性 AQP_{a2S}(AQP_{6vs})を介する水透過性は減少し、抗利尿ホルモンの刺激に関わらず水を透過させる AQP₃ を介する水透過性が上昇した。血液生化学検査では、血漿膠質浸透圧、Na、Mg、Ca、Cl の減少を認めたが、有意差を認めたのは、Mg および Ca のみであった。病理組織検査では、軽度であったが、表皮細胞層および表皮角質層の面積の拡大ならびに表皮細胞数の増数を認めた。その他、表皮細胞の変性などを観察した。これらの結果から、病理発生機序において、皮膚ツボカビ症によって、皮膚を介する水調節機能が障害され、血漿膠質浸透圧および血中電解質成分の減少、心不全に至ると考えた。

参考論文

本論文の一部は、以下の論文に公表した。

1. Kadekaru, S., Tamukai, K., Tominaga, A., Goka, K., Une, Y.: Spontaneous oral chytridiomycosis in wild bullfrog tadpoles in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 78 (4): 573-577, 2016.

引用文献

Akabane, G., Ogushi, Y., Hasegawa, T., Suzuki, M., Tanaka, S. (2007) Gene cloning and expression of an aquaporin (AQP-h3BL) in the basolateral membrane of water-permeable epithelial cells in osmoregulatory organs of the tree frog. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 292, R2340-R2351.

Bai, C., Liu, X., Fisher, M. C., Garner, T. W., and Li, Y. (2012) Global and endemic Asian lineages of the emerging pathogenic fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* widely infect amphibians in China. *Diversity and Distributions*. 18: 307-318.

Bataille, A., Fong, J. J., Cha, M., Wogan, G. O., Baek, H. J., Lee, H., Min M., and 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 D. E., Cunningham A. A., Goggin C. L., Slocombe R., Ragan M. A., Hyatt A. D., McDonald K. R., Hines H. B., Lips K. R., Marantelli G., Parkes H. (1998) Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95: 9031-9036.

Berger L, Speare R, Hyatt A. (1999) Chytrid fungi and amphibian declines: Overview, implications and future directions In: Campbell, A, editor. *Declines and disappearances of Australian frogs*. Canberra (Australia): Environment Australia.

Berger L., Speare R., Hines H. B., Marantelli G., Hyatt A. D., McDonald K. R., Skerratt L. F., Olsen V., Clarke J. M., Gillespie G., Mahony M., Sheppard N., Williams C., Tyler M. J. (2004) Effect of season and temperature on mortality in amphibians due to chytridiomycosis. *Aust. Vet. J.* 82: 434-439.

Berger, L., Marantelli, G., Skerratt, L. F., Speare, R. (2005a) Virulence of the amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* varies with the strain. *Diseases of aquatic organisms*, 68: 47-50.

Berger, L., Speare, R., Skerratt, L. F. (2005b) Distribution of *Batrachochytrium dendrobatidis* and pathology in the skin of green tree frogs *Litoria caerulea* with severe chytridiomycosis. *Dis. Aquat. Org.* 68: 65-70.

Farrer, R. A., Weinert, L. A., Bielby, J., Garner, T. W., Balloux, F., Clare, F., Anderson, L. (2011) Multiple emergences of genetically diverse amphibian-infecting chytrids include a globalized hypervirulent recombinant lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108: 18732-18736.

Fellers G. M., Green D. E., Longcore J. E. (2001) Oral chytridiomycosis in mountain yellow-legged frogs (*Rana muscosa*). *Copeia* 2001: 945-953.

Fisher, M. C., Garner, T. W., Walker, S. F. (2009). Global emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and amphibian chytridiomycosis in space, time, and host. *Annual review of microbiology.* 63: 291-310.

Goka K., Yokoyama J., Une Y., Kuroki T., Suzuki K., Nakahara M., Kobayashi A., Inaba S., Mizutani T., Hyatt A. D. (2009) Amphibian chytridiomycosis in Japan: distribution, haplotypes and possible route of entry into Japan. *Mol. Ecol.* 18: 4757-4774.

Goka K., (2010) Biosecurity measures to prevent the incursion of invasive alien species into Japan and to mitigate their impact. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 29: 299-310.

Gosner K. L. (1960) A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica* 16: 183-190.

"Hasegawa T, Tanii H, Suzuki M, Tanaka S (2003) Regulation of water absorption in the frog skins by two vasotocindependent vasotocindependent water channel aquaporins, AQP-h2 and AQP-h3. *Endocrinology* 144: 4087-4096."

Hayes T. B., Wu T. H., Gill T. N. (1997) DDT-like effects as a result of corticosterone treatment in an anuran amphibian: is DDT a corticoid mimic or a stressor? *Environment. Toxicol. Chemist.* 16: 1948-1953.

Hillman, S. S., Withers, P. C., Drewes, R. C., Hillyard, S. D. (2009) Ecological and

environmental physiology of amphibians. Oxford University Press.

Holden, W. M., Reinert, L. K., Hanlon, S. M., Parris, M. J., Rollins-Smith, L. A. (2015) Development of antimicrobial peptide defenses of southern leopard frogs, *Rana sphenoccephala*, against the pathogenic chytrid fungus, *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Developmental & Comparative Immunology*. 48: 65-75.

Hyatt A. D., Boyle D. G., Olsen V., Boyle D. B., Berger L., Obendorf D., Dalton A., Kriger K., Heros M, Hines H., Phillott R., Campbell R., Marantelli G., Gleason F., Coiling A. (2007) Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Dis. Aquat. Organ.* 73: 175-192.

Kruger K. M., Hero J. -M. (2007) Large-scale seasonal variation in the prevalence and severity of chytridiomycosis. *J. Zool.* 271: 352-359. doi:10.1111/j.1469-7998.2006.00220.x

Lips, K. R., Brem, F., Brenes, R., Reeve, J. D., Alford, R. A., Voyles, J., Carey, C., Livo, L., Pessier, A. P., Collins, J. P. (2006) Emerging infectious disease and the loss of biodiversity in a Neotropical amphibian community. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103: 3165-3170.

Longcore J. E., Pessier A. P., Nichols D. K. (1999) *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia* 91:219–227.

Marantelli G., Berger L., Speare R., Keegan L. (2004) Distribution of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* and keratin during tadpole development. *Pac. Conserv. Biol.* 10: 173-179.

Mattison C., Matsui M. (2008) Bullfrog. pp. 326-329. In: 300 frogs and toads. (Mattison C., Matsui M. eds.), Neko Publishing Co., Ltd. Tokyo. (In Japanese)

Ministry of the Environment. (2011) List of designated IAS, UAS and LORCA [cited 2015 June 29]. Available from http://www.env.go.jp/nature/intro/1outline/files/siteisyu_list_e.pdf.

Monastersky, R. (2014) Biodiversity: Life--a status report. *Nature*. 516: 158-161.

Nichols, D. K., Lamirande, E. W., Pessier, A. P., Longcore, J. E. (2001) Experimental transmission of cutaneous chytridiomycosis in dendrobatid frogs. *J. Wildli. Dis.* 37: 1-11.

Obendorf D. (2005) Application of field & diagnostic methods to survey for chytridiomycosis in Tasmanian frogs. Central North Field Naturalists Inc. Tasmania, Australia.

Ogushi, Y., Tsuzuki, A., Sato, M., Mochida, H., Okada, R., Suzuki, M., Hillyard S. D., Tanaka, S. (2010) The water-absorption region of ventral skin of several semiterrestrial and aquatic anuran amphibians identified by aquaporins. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 299: R1150-R1162.

OIE - World Organisation for Animal Health. NB: Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2011. Chapter 2. 1. 1. Infection with *Batrachochytrium dendrobatidis* [cited 2015 June 29]. Available from http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/2.1.01_INF_BATRACHOCHYRIUM.pdf.

OIE (2015) OIE-Listed diseases, infections and infestations in force in 2015. <http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2015/>

Osborn D., Cooke A. S., Freestone S. (1981) Histology of a teratogenic effect of DDT on *Rana temporaria* tadpoles. *Environmental Pollution* 25: 305-319.

Oullet M., Mikaelian I., Pauli B. D., Rodrigue J., Green D. M. (2005) Historical evidence of widespread chytrid infection in North American amphibian populations. *Conserv. Biol.* 19: 1431–1440.

Pessier, A. P., Nichols, D. K., Longcore, J. E., Fuller, M. S. (1999) Cutaneous chytridiomycosis in poison dart frogs (*Dendrobates* spp.) and White's tree frogs (*Litoria caerulea*). *J. Vet. Diagn. Invest.* 11:194–199.

Pitrowski J. S., Annis S. L., Longcore J. E. (2004) Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia.* 96: 9-15.

Puschendorf, R., and Bolanos, F. (2006) Detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* in *Eleutherodactylus fitzingeri*: effects of skin sample location and histologic stain. *J. Wildli. Dis.* 42: 301-306.

Rachowicz L. J. (2002) Mouthpart pigmentation in *Rana muscosa* tadpoles: seasonal changes without chytridiomycosis. *Herpetol. Review.* 33: 263-265.

Rachowicz L. J., Vredenburg V. T. (2004) Transmission of *Batrachochytrium dendrobatidis* within and between amphibian life stages. *Dis. Aquat. Organ.* 61: 75-83.

Retallick R. W. R., McCallum H., Speare R. (2004) Endemic Infection of the Amphibian Chytrid Fungus in a Frog Community Post-Decline. *PLoS Biol* 2: e351. doi:10.1371/journal.pbio.0020351

Retallick R. W. R., Miera V., Richards K. L., Field K. J., Collins J. P. (2006) A non-lethal technique for detecting the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* on tadpoles. *Dis. Aquat. Org.* 72: 77-85.

Rollins-Smith, L. A., Doersam, J. K., Longcore, J. E., Taylor, S. K., Shamblin, J. C., Carey, C., Zasloff, M. A. (2002) Antimicrobial peptide defenses against pathogens associated with global amphibian declines. *Developmental & Comparative Immunology.* 26: 63-72.

Rosenblum, E. B., Voyles, J., Poorten, T. J., Stajich, J. E. (2010) The deadly chytrid fungus: a story of an emerging pathogen. *PLoS Pathogens*, 6(1), e1000550.

Rowe C., Kinney O. M., Fiori A. P., Congdon J. D. (1996) Oral deformities in tadpoles (*Rana catesbeiana*) associated with coal ash deposition: effects on grazing ability and growth. *Freshwater Biol.* 36: 723-730.

Rowe C., Kinney O. M., Congdon J. D. (1998) Oral deformities in tadpoles of the Bullfrog (*Rana catesbeiana*) caused by conditions in a polluted habitat. *Copeia* 1998: 244-246.

Stuart, S. N., Chanson, J. S., Cox, N. A., Young, B. E., Rodrigues, A. S., Fischman, D. L., Waller, R. W. (2004) Status and trends of amphibian declines and extinctions

worldwide. *Science*, 306: 1783-1786.

Swei, A., Rowley, J. J., Rödder, D., Diesmos, M. L., Diesmos, A. C., Briggs, C. J., Brown, R., Cao, T. T., Cheng, T. L., Chong, R. A., Han, B., Hero, J. M., Hoang, H. D., Kusriani, M. D., Le, D. T., McGuire, J. A., Meegaskumbura, M., Min, M. S., Mulcahy, D. G., Neang, T., Phimmachak, S., Rao, D. Q., Reeder, N. M., Schoville, S. D., Sivongxay, N., Srei, N., Stöck, M., Stuart, B. L., Torres, L. S., Tran, D. T., Tunstall, T. S., Vieites, D., Vredenburg, V. T. (2011) Is chytridiomycosis an emerging infectious disease in Asia?. *e23179*.

Symonds E. P., Hines H. B., Bird P. S., Morton J. M., Mills P. C. (2007) Surveillance for *Batrachochytrium dendrobatidis* using Mixophyes (Anura: Myobatrachidae) larvae. *J. Wildl. Dis.* 43: 48-60.

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.

Voyles, J., Berger, L., Young, S., Speare, R., Webb, R., Warner, J., Rudd, D., Campbell, R., Skerratt, L. F. (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, W. F., Dinudom, A., Cook, D., Webb, R., Alford, R. A., Skerratt, L. F., Speare, R. (2009). Pathogenesis of chytridiomycosis, a cause of catastrophic amphibian declines. *Science*, 326: 582-585.

Weldon, C., Du Preez, L. H., Hyatt, A. D., Muller, R., Speare, R. (2004) Origin of the amphibian chytrid fungus. *Emerg. Infect. Dis.* 10: 2100.

Woodhams D. C., Alford R. A. (2005) Ecology of chytridiomycosis in rainforest stream frog assemblages of tropical Queensland. *Conserv. Biol.* 19: 1449–1459."

長谷川 雅美 (2000) 海を渡ってきたカエル. pp80-85. カエルのきもち. 千葉県立中央博物館 (監修) . 晶文社.

気象庁, (2002) 20 世紀の日本の気候. pp2-10. 20 世紀の日本の気候. 気象庁 編. 財務省印刷局

工藤 朝雄, 中島 康太, 嘉手苺 将, 加藤 眞理子, 村上 賢, 五箇 公一, 宇根 有美 (2011) 国内両生類大量死事例におけるツボカビ症とラナウイルス感染症に関する遡及的検索. 第 152 回日本獣医学会学術集会.

前田憲男, 松井正文 (1989) ウシガエル. pp. 100-107, 日本カエル図鑑, 前田憲男, 松井正文 編, (株) 文一総合出版, 東京.

鈴木 雅一, 田中 滋康 (2014) アクアポリンの構造, 機能, およびその多様性—脊椎動物を中心として. 生化学. 86: 41-53.

田向 健一 (2014) 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, 麻布大学大学院獣医学研究科獣医学専攻学位論文,

要旨

緒言

カエルツボカビ (*Batrachochytrium dendrobatidis*: Bd) は世界的な両生類の種類および個体数の減少に関与する新興病原体である。2006年、我々はアジアおよび国内で初めてツボカビ症を発見した。その後、全国調査や病性鑑定を行った結果、流行が起きている諸外国と異なる次の2点が明らかになった。①国内野生下両生類に Bd による大量死が認められない。②Bd の haplotype の多様性は、被害が大きい諸外国では低い、日本は非常に高い。この状況は、Bd の被害が認められないアジア諸外国でも同様であった。このことから、Bd はアジアおよび日本を起源とし、世界中に拡散したという「アジア起源説」が提唱されている。しかし、アジア地域においては Bd が発見されて間もなく、感染率が低いため、未だ結論に至っていない。一方、ツボカビ症の病理発生機序には、Bd 感染により皮膚ツボカビ症を発症した後、電解質異常をきたし、心不全によって死亡することが知られている。しかし、これは死因を特定したのみで、その機序は不明である。カエルの皮膚はガス交換、電解質輸送、水吸収などを行っており、生命維持に大きく関わっていることから、ツボカビ症の病理発生機序を解明するためには、カエルに特徴的な生理学的機能の破綻を解明する必要がある。

本研究の目的は、アジア起源説を念頭に入れて、Bd の国内分布および遺伝子型解析から Bd の由来を解明すること。そして、両生類の皮膚の生理学的特徴である皮膚に分布する水チャネル aquaporin (AQP) に注目して、皮膚ツボカビ症の病理発生機序を解明することである。

第1章 ウシガエル幼生における口器ツボカビ症および検査法の確立

Bd の国内実態を的確に調べるために、後述する理由から、ウシガエル (*Lithobates catesbeina*) 幼生の好適モニター動物としての検証を行った。ウシガエルは国内に広く分布しており、過去の調査によって Bd 感染率が高く、保菌する haplotype の種類も多いことが確認されている。また、幼生個体は採集が容易であり、かつ、Bd の感染部位である角質層が口器に限局していることから、口器のみを検査対象とすることができる。さらに本章では、的確に Bd を検出する検査法についても検討した。

一生息池からウシガエル幼生 59 匹を採集し、これらの口器を病理検査(肉眼検査と組織検査)および口器から採取した swab を用いた PCR

検査（nested PCR 法）を行った。その結果、21 匹の口器に肉眼的変化を認め、その内 20 匹に PCR 検査または病理組織検査で Bd 感染を確認した。肉眼的変化がなかった 38 匹のうち 17 匹から PCR 検査、病理組織検査のいずれか、または両方で Bd を検出した。よって、62.7%の感染率であった。Bd 感染による口器肉眼的変化の特徴は、嘴の①色素消失、②色素沈着層の菲薄化、③変形および④歯列の淡明化であった。

以上より、ウシガエル幼生は Bd を高率に保菌し、目視によって容易に感染を確認できることから、Bd モニター動物として有効であると結論づけた。

ウシガエル幼生の口器の Bd を的確に検出する検査法を確立するために、nested PCR 法（swab、口器）および口器病理組織検査を比較した。2 ヶ所の生息池から各 60 匹、合計 120 匹を採集した。1 検体ですべての検査を実施できないため、目視検査によって口器異常を有する個体が同程度に含まれるように 2 群に分け、1 群は swab および口器を材料とする nested PCR 法、2 群は口器病理組織検査を行った。各種検査の検出率は、swab nested PCR 法（67%）、口器 nested PCR 法（65%）および口器病理組織検査（33%）の順に高かった。感度は口器よりも swab を材料とする nested PCR 法の方が高かったが、統計学的に有意差を認めないこと、swab の採取は採取者の手技習熟度の影響を受けることから、口器を材料とする nested PCR 法が推奨された。

以上より、ウシガエル幼生の口器を採材し、nested PCR 法を行うことで、的確な Bd 感染状況を把握できると結論づけた。

第 2 章 ウシガエル幼生における Bd 感染の季節変動の把握

Bd 調査適期を決定するために、ウシガエル幼生の Bd 感染率の季節変動を検討した。2011 年 12 月～2014 年 6 月の 31 ヶ月間のうち、2012 年 12 月を除く偶数月に長崎県の一生息池から 15 回にわたって、各回ウシガエル幼生を 15 匹または 30 匹、計 345 匹を採集した。これらの口器を nested PCR 法に供し、感染率の推移を調べた。

その結果、日本における Bd の感染率に明らかな季節変動があった。最も感染率が高かったのは 4～6 月で、平均 79%であった。感染率が最も低かったのは 8～10 月で、感染を認めなかった。2 月、12 月は 7～63%と、採集年によって感染率が異なっていた。

以上より、国内自然界における Bd 感染動態の年間サイクルは、冬～春にかけて増殖し、気温が発育至適温度を上回る夏季に大きく減少した後、晩秋～冬にかけて再び増殖すると結論づけた。従って、Bd 国内実態調査の採集適期を 2～6 月とした。

第 3 章 野生下ウシガエル幼生を対象とした Bd の国内分布と遺伝子型

野生下ウシガエル幼生における Bd 感染率、保有 haplotype を解析し、Bd 国内実態を調べた。2012 年および 2013 年の各 1～6 月、26 都府県 44 地域から 835 匹のウシガエル幼生を採集し、その PCR 産物からダイレクトシーケンス法により Bd の ITS 領域の塩基配列を決定し、既存の haplotype と比較、各 haplotype の国内分布を調べた。

その結果、19 都府県、29 地域、266 匹（感染率 32%）に感染を認めた。検出地域における Bd 感染率は平均 51%（3～100%）であった。266 検体中 68 検体の塩基配列が決定され、これらは 41 種類の haplotype に型別された。その内、6 type は既存の haplotype と一致し、その内訳は世界流行系統（A type : 19、CW34 Clone N : 1 検体）、中国検出株（Bd50 : 1、Bd41 : 1 検体）、P type : 2、Z type : 2、検体であった。他 35 type は過去に報告のないものであった。なかでも A type の高率かつ広域分布を確認した。国内、中国、アフリカ、ブラジル、オーストラリア、エクアドルおよびテキサス検出株の遺伝子データとともに、系統解析（近隣結合法）を行った。Clade 形成に明瞭な地域差は無く、中国検出株と同じ clade を形成している検体も認められた。

以上より、Bd は日本およびアジアでは固有病原体（endemic）であり、長い歴史を経て宿主両生類と共に共進化している可能性があると考えた。

第 4 章 Bd 感染が皮膚水吸収に与える影響

ツボカビ症の病理発生を明らかにするために、次の実験を行った。Bd 高感受性動物イエアメガエル（*Litoria caerulea*）感染群 5 匹、対照群 5 匹、計 10 匹を用いた。感染群には、培養した Bd 遊走子 1×10^6 、5,000 または 6,000 個/ml の飼育水を 1 日浸漬させた後、7 日間、通常飼育し、軽度ツボカビ症を発症させた。対照群は 7 日間、通常飼育した。これらのカエルを安楽死させた後、Ussing chamber 改良装置を用いて大腿部と背部の皮膚の水透過性試験を行った。併せて、皮膚を病

理組織学的に、血液を血清生化学的に調べた。Bd 感染確認は全個体の皮膚を病理組織学的に観察した他、5 匹（感染群：3 匹、対照群：2 匹）の皮膚から nested PCR 法を行った。

感染群 5 匹中、3 匹にツボカビ症の特徴である高度の脱皮を認め、その内、1 匹は食欲不振、元気消失を伴っていた。5 匹中 2 匹に病理組織検査または nested PCR 法により Bd 感染を認めた。水透過性試験において、大腿部皮膚の水透過性における水分調節機能の障害を確認した。すなわち、抗利尿ホルモン（arginine vasotocin: AVT）反応性に働く AQP2S(AQP6vs)を介する水透過性が有意に減少し、AVT 刺激の有無に関わらず水を透過させる AQP3 を介する水透過性が有意に上昇した。背部皮膚には、感染群、対照群ともに水透過性を認めなかった。病理組織学的検索では、大腿部、背部ともに表皮角質層・表皮細胞層の肥厚および表皮細胞数の増数を認めたが、有意差は得られなかった。その他、表皮細胞の変性などを観察した。血清生化学検査では、血漿膠質浸透圧、Na、Mg、Ca および Cl の減少を認めた。これらのうち、Mg と Ca の変化には有意差を認めたが、その他の成分の変化に有意差は認められなかった。

以上の結果より、ツボカビ症の病理発生機序において、Bd 感染から心不全に至る経路の 1 つに皮膚水透過性を介する水分調節機能の障害が関与し、電解質バランスの恒常性を維持できなくなり、心不全に至ると結論づけた。感染群の一部に Bd 感染が確認できなかったこと、電解質成分の減少と病理組織変化が軽度であったことは、発症の程度が軽症であったことによるものと考えた。

英文要旨

The study on origin of chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*) and of pathogenesis of chytridiomycosis

Introduction

Chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*: Bd) is emerging pathogen that associated with global decline of amphibian species and individuals. We detected chytridiomycosis at first in Japan and in Asia in 2006. The Japanese field survey and pathological examination detected 2 differences with large scale damaged foreign countries; the amphibian mass die-off from Bd epidemic has not detected and diversity of Bd haplotype of Japan were higher than that of damaged foreign countries. These situations were similar in the Asian foreign countries where have not damaged by Bd. Thus, the hypothesis: Bd originated from Asia and Japan (Bd originated Asia hypothesis) has occurred, but this hypothesis has not concluded because Bd prevalence in Asia is very low and it had passed only short term after Bd detected in Asia. On the other hand, pathogenesis of chytridiomycosis has not yet been completely clarified because it is only observed cause of death known that infected frog dead by osmotic imbalance through loss of electrolytes and cardiac arrest after effected skin chytridiomycosis. To clarify pathogenesis of chytridiomycosis, disruption of amphibian unique physiological function by chytridiomycosis must be observed because the integument of frog is a site of regulated transport for water, ions (electrolytes) and respiratory gases.

The aim of this study was to identify the origin of Bd by detecting distribution and genetic analysis of Bd in Japan with in mind that Bd originated Asia hypothesis. And to reveal pathogenesis of skin chytridiomycosis focused on the water channel, aquaporin (AQP) that amphibian unique physiological function.

Chapter 1. Confirming of oral chytridiomycosis in bullfrog (*Lithobates catesbeiana*) larvae and establishment of Bd examination method

We examined bullfrog (*Lithobates catesbeiana*) larvae (tadpole) usability

as monitor of Bd field survey, since the reasons as follows. Bullfrog distributed over Japan widely, and it is known that this animal harbor Bd highly and its variety of haplotype is widely. We can capture bullfrog tadpole easily, and only examine the larval mouthparts that only distributed keratinized layer that area of Bd infection. Additionally, we established the examination method which can detect Bd infection exactly in this chapter.

Fifty nine wild-captured bullfrog tadpole mouthparts underwent macroscopic, histopathological examination and nested PCR. Macroscopic lesions were observed in 21 of 59 tadpoles, and its 20 tadpoles were detected Bd infection by nested PCR and/or histopathological examination. Seventeen in 38 tadpoles that were not observed macroscopic lesions, were detected Bd infection. Total prevalence was 62.7% in these tadpoles. The macroscopic lesion characters were depigmentation, thinning of pigmented layer and partial defect of jaw sheaths and whitened tooth rows.

We concluded that bullfrog tadpole is usable for Bd field survey because the animal is compromised host for Bd infection and its mouthparts lesion is easily detected by macroscopic examination.

To establish the usable examination method, we compared nested PCR (materials: swab and mouthparts) and histopathological examination of mouthparts. One hundred twenty wild-captured bullfrogs from 2 habitats were divided into 2 groups, each group were 60 individuals, because we unable to conduct all examination methods to same one tadpole. The group 1 was sampled mouthparts swab and dissected mouthparts, and conducted nested PCR. Another group were conducted histopathological examination. Detection rate of each examination was high in order of swab nested PCR (67%), mouthparts nested PCR (65%) and histopathological examination (33%). The mouthparts nested PCR was recommended as Bd survey, however, sensitivity of swab nested PCR was higher than that of mouthparts nested PCR, because the sampling of swab was effected by sampling techniques. We concluded that collecting bullfrog tadpole mouthparts and conduct nested PCR can detect Bd infection situation in Japanese field.

Chapter 2. Seasonality of Bd infection of bullfrog tadpole

To decide term of Bd field survey, we detected seasonality of Bd

infection of bullfrog tadpole. We collected 15 or 30 tadpoles in even months without December 2012, and totally 345 tadpoles were collected in between December 2011 and June 2014. The prevalence rate at each collected month was detected by nested PCR of mouthparts of these tadpoles.

The seasonality of Bd prevalence in Japanese bullfrog was revealed: the highest prevalence was April and June that average prevalence was 79%, the lowest prevalence was August and October that has not detected Bd infection. February and December detected Bd infection, however, the prevalence of these months were different in collected year that 7 to 63%.

Bd infection dynamic cycle among the year is seems that Bd grows and diffuses in winter to next spring, and largely decreases in summer that temperature is higher than that of Bd growth optimal temperature, and grows in late autumn to winter. We decided that sampling Bd survey conduct between February and June as described above.

Chapter 3. Distribution and haplotype of Bd infected in bullfrog in Japanese field

We surveyed the Bd situation in Japan such as prevalence and Bd haplotype that infected in wild-captured bullfrog in Japan. 2012 and 2013, we collected 835 tadpoles from 44 areas of 26 counties, between February and June in each year. We conducted nested PCR from these samples, and determined the ITS gene region sequence from Bd positive samples, and conducted phylogenetic analysis with Bd that has been detected in previous studies.

Bd detected 266 individuals (32%) from 29 areas of 19 counties. The average prevalence was 51% (3 to 100%) in detected Bd areas. Sixty eight samples were detected sequence from 266 samples and were distinguished 41 haplotypes. Six types were already isolated haplotypes; Bd global pandemic lineage (A type: 19, CW34 Clone N: 1 sample), isolated in China (Bd50: 1, Bd41: 1 sample) and isolated in Japan (P type: 2, Z type: 2 samples). The other 35 types were newly identified haplotypes in this study. Interestingly, A type was detected highly and distributed widely in Japan. We conducted phylogenetic analysis by neighbor-joining method with Bd which isolated in previous study such as China, Africa, Brazil, Australia,

Ecuador and Texas. Distinguishable areal difference was not observed in clade of phylogenetic tree, and partial clade was included with Chinese haplotypes.

These result likely suggest that Bd is originated from Asia and Japan, and this pathogen seems to coevolved with host amphibians for long history.

Chapter 4. The effect on skin water absorption by Bd infection

To clarify the pathogenesis of chytridiomycosis, we performed skin water permeability test and histopathological examination of skin and biochemical test with animal experiment. Ten frogs, *Litoria caerulea* from commercial market were irradiated Bd because some were already infected, and randomly assigned to exposure and control groups (each group were 5 frogs). Infection group frogs were exposed Bd via shallow immersion in bath of diluted water containing 1×10^6 , 5,000 or 6,000 zoospores per 1ml. After 24 h frogs were moved to fresh container and keep 6 days. Control group were immersed in diluted water for 24 h, and keep 6 days similarly. Thigh and dorsal skins were sampled and conducted water mermeability test using a modified Ussing chamber. Ventral and dorsal skins were conducted histopathological examination. And collected blood was conducted biochemical test. To obtain Bd infection, we examined skin of all frogs, and conducted nested PCR of 5 frog skins (infection group:3, control group: 2).

Three of 5 frogs of infection group showed severe skin sloughing, and 1 frog was associated with anorexia and lethargy. Two of 5 frogs of infection group were obtained Bd infection by histopathological examination or nested PCR. Disruption of water regulatory function via thigh skin was observed: water absorption associated arginine vasotocin (AVT) reactive AQP2s(AQP6vs) significantly decreased, however, water absorption associated with AQP3 that permeable with or without AVT stimulation significantly increased. Dorsal skin water permeability was not observed in all animals. Histologically, thicknning of stratum corneum and skin epidermal hyperplasia of both thigh and dorsal skin were observed in infected frogs, but not detected significant differences. The osomorality, Na, K and Cl level decreased slightly, and Mg and Ca level significantly decreased in biochemical test.

We concluded that disruption of water regulatory system via water skin absorption is associated with pathogenesis of chytridiomycosis: Bd infection lead to unsustainable homeostasis of electrolyte balance, and to cardiac arrest. We thought that the reason of unidentifiable Bd infection in some frogs of infected group and mild histopathological changes were by Bd infected mildly.

謝 辞

本研究の遂行にあたり、多大なるご指導を賜りました麻布大学獣医学部 病理学研究室 教授 宇根 有美 先生に深く御礼申し上げます。

本学位論文の審査にあたり、貴重なご助言を頂きました麻布大学獣医学部 病理学研究室 教授 代田 欣二 先生および分子生物学研究室 教授 村上 賢 先生に厚く御礼申し上げます。

本研究、第4章 カエルツボカビ感染が皮膚水吸収における影響 の研究におけるご協力、ご助言を賜りました静岡大学大学創造科学技術大学院 教授 鈴木 雅一 先生および同 博士 柴田 侑毅 先生に深謝いたします。

本研究の全般にわたり、ご助言、ご協力を頂きました麻布大学獣医学部 病理学研究室 准教授 上家 潤一 先生、同特任助教 常盤 俊大 先生および同特任助教 工藤 朝雄 先生、長崎バイオパーク 伊藤 雅男 様、田園調布動物病院 田向 健一 先生ならびに(株) 栄養・病理学研究所 中村 進一 博士に心より感謝いたします。

本研究、第3章 野生下ウシガエル幼生を対象としたカエルツボカビの国内分布と遺伝子型 において、ウシガエル幼生の採集にご協力頂きました下記の皆様にご心より感謝の意を表します。
アクア・トトぎふ岐阜県世界淡水魚園水族館 様、石橋 友佳理 様 (到津の森公園)、伊藤 清明 様、伊藤 ふくお 様、内山 りゅう 様、宇根 昌広 様、嘉手苺 一 様、川内 一憲 様、河崎 将一 様、桑原 一司 様、古賀 晋 様 (福岡市動物園)、坂本真理子 様 (九州両生爬虫類研究会)、笹岡 康則 様、佐藤 方博 様 (認定NPO法人 生態工房)、佐藤 宏 先生 (山口大学)、柴田 千晶 先生 (日本歯科大学)、島田 知彦 先生 (愛知教育大学)、清水 善吉 様、高田 孝慈 様 (長野市茶臼山動物園)、磨田 孝二 様、外崎 史郎 様、外崎 るり 様、伊藤 蓮慈 様、吉川 貴臣 様 (わんぱくこうちアニマルランド)、玉井 済夫 様、桐原 真希 様、戸田 光彦 先生 (一般財団法人 自然環境研究センター)、高橋

克之 様（群馬県立自然史博物館）、高田 真理子 先生（福岡の海ノ中道動物の森）、佐藤 文保 様（久米島ホタルの会）、上林 千訓 様、新田 亘 様、清水 善吉 様、赤井 伸江 様、中野 康子 様（九州両生類爬虫類研究会）、長谷川 巖 様、渡部 孝 様（わんぱくこうちアニマルランド）

最後に、本研究の遂行にあたり、ご協力頂きました麻布大学獣医学部 病理学研究室の卒業生および在席生各位に厚く御礼申し上げます。

平成28年 2月
嘉手苺 将