

| | |
|---------|--|
| 氏名(本籍) | 嘉手苺 将 (沖縄県) |
| 学位の種類 | 博士(獣医学) |
| 学位記番号 | 甲第 141 号 |
| 学位授与年月日 | 平成 28 年 3 月 15 日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 3 条第 2 項該当 |
| 学位論文題名 | カエルツボカビ (<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>) の起源および ツボカビ症の病理発生に関する研究 |
| 論文審査委員 | (主査) 宇 根 有 美 (副査) 代 田 欣 二 村 上 賢 |

論 文 内 容 の 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が、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、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、生命維持に重要な役割を担っていることから、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、そのうち 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。そのうち、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なく、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）の皮膚の nested PCR 検査を行った。

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、そのうち、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。

論文審査の結果の要旨

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、学位申請者が加わっている研究者グループによって、アジアおよび国内初のツボカビ症が発見された。その後、全国調査や病性鑑定が実施されたが、ツボカビ症が流行している諸外国と異なる国内状況が明らかにされた。すなわち、野生下の両生類が Bd を保有しているのにもかかわらず、国内では Bd による大量死が認められない。国内で確認される Bd の haplotype は 25 タイプ以上と非常に多い一方で、被害が大きい諸外国では数種である。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」仮説が提唱された。しかし、未だ結論に至っていない。さらに、ツボカビ症の病理発生機序に関して、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が、なぜ電解質異常は起こるのかその機序は明らかにされていない。

本研究は、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 の起源を解明すること。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を目的としている。本研究は日本の特異な Bd 状況を解析するといった独自性のある研究で、世界各地で猛威を振るう Bd の起源を探索すると同時に、Bd 流行あるいは拡散の機序解明に貢献する研究と考えられる。

本研究は 4 章からなっており、第 1 章と 2 章では、日本という国の自然界での Bd 分布を的確に把握するための基礎的研究として、好適モニター動物の選定、検査方法の確立、調査適期の決定を行った。第 3 章は第 1 章と 2 章の結果に基づいて全国から検体を入手して、Bd の国内分布を明らかにし haplotype を解析した。第 4 章は Bd 高感受性動物を用いて電解質異常の発生機序の解明を試みた。以下にその概要を記述する。

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

今までの Bd 研究グループの研究結果に基づいて Bd の国内実態を的確に調べるための好適モニター動物として、ウシガエル (*Lithobates catesbeina*) 幼生を選び、病理学および分子生物学的にその有用性を確定し、検査法の確立のため病理学的手法と材料による分子生物学的手法の特異度、感度について比較、高感度の検査法を確立した。この成果によって、ウシガエル幼生の口器を PCR 検査することで、北海道から沖縄まで広域で Bd 分布を調べることができること、採取しやすい動物のため、多数個体で評価できること、目視で Bd 感染が確認できることが確認された。そして、ウシガエル幼生が

成体にもまして、高率に Bd を保有していることが明らかにされた。

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

Bd は高温では増殖が停止し、不活化することから、春夏秋冬のある日本で、野生動物を対象として Bd 調査を行うためには、予め Bd の季節変動を把握し、調査適期を決定しなければならない。本章では、2011年12月～2014年6月ほぼ偶数月15回にわたって、一生息池からウシガエル幼生計346匹を採取して感染率の推移を調べた。その結果、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カエルツボカビの国内分布と遺伝子型

2012年および2013年の各1～6月、26都府県44地域のウシガエル幼生835匹のBd感染率を検討するとともに、BdのITS領域の塩基配列を決定し、各haplotypeの国内分布を調べた。その結果、19都県、29地域、266匹（感染率平均32%、0～100%）に感染を認めた。分布は広域で、自然界には広くBdが分布していることが明らかにされた。塩基配列解析が可能であった68検体は41種類のhaplotypeに型別された。この中には世界流行系統（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が含まれており、他35 typeは新規のhaplotypeで、系統解析（近隣結合法）では、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。

以上のように日本のBdには、他のいずれの国よりも多くのhaplotypeが存在し、世界流行株を含めて地域分布に偏向を示さず、国内に広く分布していることから、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 カエルツボカビ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、Bd高感受性動物イエアメガエル（*Litoria caerulea*）にBd遊走子を感染させて、皮膚の水透過性試験によって水分調節機能の障害を確認した。すなわち、Bd感染によって、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。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。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。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、血中電解質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。

Bd 検査法に関する知見は多いが、国、地域によって対象とする動物種や発育ステージが異なり、気候などによって採取時期も異なる。このため、Bd 研究を行うにあたって、日本という国の種々の因子を考慮した対象動物の選定および検査法の確立が重要である。本研究では、長期に亘る地道な研究により対象動物の選定や検査法が確立され、国内自然界における Bd の生態を的確に把握できるようになった。その結果、日本における Bd 分布の広さ、高感染率、そして、その haplotype の多様性が非常に高いことが明らかにされ、アジア起源説という仮説を支持する重要な知見を示すことに成功した。

さらに、獣医病理学を専攻する研究者として、ツボカビ症の死因とする心不全の機序を両生類特有の生理を理解した上で、病理学および生理学的に解明した。

以上のことから、本論文は博士(獣医学)を授与するのにふさわしい研究であると判定した。