

令和 3 年 6 月 25 日現在

機関番号：35302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05692

研究課題名(和文)両生類の新興病原体「ラナウイルス」はどのように拡散するのか？

研究課題名(英文)How does Rana virus as emerging pathogens in amphibians spread?

研究代表者

宇根 ユミ (UNE, YUMI)

岡山理科大学・獣医学部・教授

研究者番号：40160303

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：国内野生下両生類におけるラナウイルス(RV)保有状況の経時的調査によって、離島ヒキガエル、本州ヌマガエルにおける劇的検出率の低下と新たにトウキョウダルマガエルRV保有が明らかになり、自然界において比較的短期間に、RVの維持形態が変化することが確認できた。さらに、長期飼育下ヌマガエルで経時的に検出率が低下し、RV維持動物ではないと判断した。また、野生の肉食鳥類から高率にRVが検出されることから、キャリアーおよび自然界でのRV維持に鳥類が深くかかわっている可能性を示唆した。RVへの感受性に種差があることが明らかにされた。自然界におけるRV動態は刻々変化し、これには鳥類の役割に注目する必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

国内野生下両生類におけるラナウイルスの保有状況を経時的に検索した研究は、他に見当たらない。本研究によって野生下両生類において、ラナウイルスの検出率が一定しておらず、一方で検出される動物種が変わること、さらに、鳥類への感染が確認されたことから、自然界における各種動物の役割の一部が明らかにされた。これらの成果は、今後のラナウイルス対策(ラナウイルス拡散の阻止、両生類の保全など)に関して有用な情報となると考えられる。なお、本研究によって高体温の鳥類へのラナウイルス感染が初めて証明されたことは学術的意義が高い。

研究成果の概要(英文)：As a result of investigating the prevalence of ranavirus in domestic wild amphibians over time, the prevalence of toad and Indian rice frog decreased dramatically, and it was detected in Rana porosa porosa. Therefore, it was clarified that the status of RV changes in a relatively short period of time in the field. Indian rice frogs are not maintenance animals. This is because the prevalence of captive animals has decreased over time. In addition, the high rate of RV detected in carnivorous birds suggests that birds are carriers and may be deeply involved in maintaining RV in nature. It was revealed that there are species differences in susceptibility to RV. RV dynamics in nature change from moment to moment, which requires close attention to birds.

研究分野：獣医病理学

キーワード：新興感染症 ラナウイルス 両生類 生態系保全 鳥類

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 海外事情 国際自然保護連合(IUCN)は、世界には約 6,800 種類の両生類が生息し、そのうち、解析の終わった 6,260 種のうち 32.4%が絶滅あるいは絶滅に瀕しているとし、両生類は地球上で最も絶滅の危機に瀕している脊椎動物群と位置づけている。減少の原因の 1 つとして感染症が重要視されており、世界動物保健機関(OIE)は感染症による生態系および生物多様性の破壊を危惧し、2008 年に初めて両生類の病原体であるカエルツボカビとイリドウイルス(ラノウイルス)を監視すべき病原体に指定した。ラノウイルスは、イリドウイルス科に属する大型の DNA ウイルスで、他のイリドウイルス科のウイルスと異なり広範な宿主域をもち、両生類(11 科の両生類に感染)、爬虫類、魚類に感染し、致命的流行を引き起こす。ラノウイルスが注目されるようになったのは 1990 年後半になってからである。これは 1980 年代以降、世界各地で見られるようになった劇的な両生類の減少の一要因として注目されたことによる。実際、北米では、National Amphibian Research and Monitoring Initiative が調査を実施し、2006 年 34 の州 110 例の両生類の病性鑑定で、死因の 43%がラノウイルス、16%がカエルツボカビであったと報告している。ラノウイルスの両生類への影響は、ヨーロッパ、オーストラリアでも確認されており、中国では、養殖チュウゴクサンショウウオが大量死したのみならず、野生の動物にも影響が及んでいるとされている。これらの大量死発生の機序としてイギリス事例では、北米から輸入された水生生物(ウシガエルや淡水魚など)とともにラノウイルスが持ち込まれたと推測されている。また、北米およびオーストラリアのラノウイルスは endemic pathogen として捉えられており、これらが、何らかの機序により流行したと推察されている。その機序としては、農薬、肥料、生息環境の変化および動物の生息密度などを指摘する研究もあるが、依然不明のままである。

(2) 国内事情 2008 年に国内初のラノウイルス感染症による両生類の大量死を発見し、以降、現在までラノウイルスの研究を継続している。その結果、野生下ウシガエルでしばしば大量死が起きるが、流行期以外で、見かけ上健康な動物からラノウイルスが検出されることはほとんどない。国内移入種であるヌマガエルは高率にラノウイルスを保菌しているが、発症することはない。そのヌマガエルを対象として 2011 年から 2014 年まで調査したところ、検出される地域が増加し、最終的には調査地すべてでラノウイルスが検出され、その検出率も段階的に上昇した。加えて、伊豆大島(海洋島)の国内移入種アズマヒキガエルにおける感染率も 2010 年と 2015 年で 0%から 53.3%に急上昇したが、いずれも、その機序は明らかにされておらず、不明のままである。日本は中緯度に位置する国として稀にみる多様な両生類相を有し、さらに特徴的なことはサンショウウオの多様性が高く、日本の両生類の 32.8%を占め、世界最大の現生両生類といわれるオオサンショウウオをはじめとし、地域ごとでの固有の分化が著しい。このため、ラノウイルスなどの新興病原体が一旦、サンショウウオ生息地や保護施設に拡散・侵入すると、直ちにこれらの動物の絶滅に結びつく危険性をはらんでいる。

2. 研究の目的

両生類の新興病原体として重要なラノウイルスの国内における起源、自然界における維持状況(自然宿主、待機宿主および増幅動物の特定、感染サイクルの解明)および拡散方法を明らかにし、併せて、在来両生類への影響を評価し、生態系や生物多様性の保全のための有効な対策を検討することである。

3. 研究の方法

(1) 自然界のラノウイルス分布と感染状況の把握

野生両生類におけるラノウイルス検出率の把握

今までの研究によって、野生両生類において、ラノウイルスの検出率が上昇していることから、その推移を把握するために、定点地域より動物を採取して、以下のような検査を行った。調査地、調査時期、動物種は表 1 のとおりである。なお、2020 年は COVID-19 の流行のため採取できなかった。採取した両生類より、PCR 検査用に肝、腎、脾を、ウイルス分離用に腎臓を採取した。臓器より DNA 抽出キット(NucleoSpin Tissue、TAKARA)で DNA を抽出し、3 つのプライマーセットを用いて(DOI: 10.3201/eid1507.081636) 2 セット以上でラノウイルス特異的遺伝子の増幅を認めた検体を陽性として、過去の検出データと比較した。対象とした両生類は、ヒキガエル(アズマヒキガエル *Bufo japonicus formosus*、国内移入種、駆除個体を対象とした <https://www.nies.go.jp/biodiversity/invasive/DB/detail/40240.html>)、ヌマガエル *Fejervarya kawamurae*、国内移入種 <https://www.nies.go.jp/biodiversity/invasive/DB/detail/40090.html>) トウキョウダルマガエル *Rana porosa porosa*、ツチガエル *Glandirana rugosa* の 4 種である。

表1 在来両生類におけるラナウイルス検出率

種	ヒキガエル					ヌマガエル							
	伊豆大島					八丈島	神奈川		長崎	愛媛 (A,B)		東京	高知
調査年	2010	2015	2017	2018	2020	2018	2019	2019	2019	2019	2019	2019	2019
数	59	30	62	14	22	15	34	42	22	20	17	27	
陽性	0	16	7	0	0	4	0	5	15	0	0	1	
%	0	53.3	11.3	0	0	26.7	0	11.9	68.2	0	0	3.7	

種	ダルマガエル	ツチガエル
調査地	静岡	
調査年	2018	2019
数	22	18
陽性	9	4
%	40.9	22.2

② 長期飼育下ヌマガエルにおけるラナウイルス感染状況の推移

今までの調査研究によって、各地でヌマガエルにおけるラナウイルス検出率の上昇と季節変動が明らかになったことから、ヌマガエルの自然界での役割を明らかにするために、人工飼育下でヌマガエルを長期飼育して、ラナウイルス検出率の推移を検討した。九州地区2か所の田畑でヌマガエル17匹を採取し、飼育温度25℃、12時間間隔の自動照明下で、個別に24ヵ月間飼育し、この間3ヵ月に1度(1月、3月、5月、11月)に後肢指端を採材した。指端よりDNAを抽出し、前述のPCR法でラナウイルスの検出状況を確認し、PCR産物の塩基配列解析を行い、ウイルス検出率の推移、ウイルスタイプの同定を行った。

(2) 自然宿主および増幅動物の特定

海洋島に生息するヒキガエルにおいて、突然ラナウイルスの感染が確認され、3年後には検出できなくなったこと、長期飼育下ヌマガエルにおける検出状況の推移から、自然宿主を特定するために鳥類を対象としてラナウイルス検出調査を実施した。

自然死した野鳥から糞便および臓器を採材して、上述の方法で、ラナウイルスを検出した。また、神奈川県生息する野生コサギ10羽から糞便を採取した。その総数は12種類51羽で、68検体(糞45、臓器23)である。鳥の種類と数は、コサギ *Egretta garzetta* 10、ダイサギ *Ardea alba* 8、アマサギ *Bubulcus ibis* 6、アカショウビン *Halcyon coromanda* 5、チュウサギ *Ardea intermedia* 4、アオバズク *Ninox scutulata* 4、カンムリワシ *Spilornis cheela* 3、ゴイサギ *Nycticorax nycticorax* 3、サシバ *Butastur indicus* 3、ミソゴイ *Gorsachus gorsagi* 2、アオサギ *Ardea cinerea* 2、ササゴイ *Butorides striatus* 1であった。

検索対象鳥種は、いずれも肉食鳥類で、魚、昆虫、爬虫類、両生類などの小動物を捕食する。そして、臓器を採取した23羽の鳥は、沖縄県で衰弱や事故により傷病鳥獣として獣医師に保護された。そして、これらの鳥は治療中に自然死し、その原因は外傷、寄生虫感染と極度の衰弱などであった。また、収容直後、収容中、野生復帰時あるいは死亡時に、適宜糞便を採取した。入院中の鳥にはワカサギ *Hypomesus nipponensis*、キビナゴ *Spratelloides gracilis* (海水魚)などの小魚が与えられた。なお、糞からのDNA抽出は、Power Fecal DNA isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc., Carlsbad, CA, USA)を用いて、マニュアルに従って実施した。また、ラナウイルス遺伝子が検出された鳥を病理組織学的に検索した。

(3) 国内両生類由来ラナウイルスの両生類への病原性の検討

在来種への病原性を評価するために、対照動物として、外来両生類を用いた感染モデルの作出を試みた(病原性評価モデルの作出)。分離樹立したRCV(ウシガエル由来、10×4.5乗、10^{-2.5}乗)とHNV(カスミサンショウウオ由来、10⁻⁵乗、10⁻³乗)を、それぞれ、*Ceratophrys* 属無尾類(ツノガエル)に接種して、観察期間を3ヵ月として、発症率、致死率および、ラナウイルス検出率を検討した。なお、観察期間中に死亡しなかった動物は、観察期間終了後は安楽死して、ラナウイルスを検出した。

4. 研究成果

(1) 自然界のラナウイルス分布と感染状況の把握

野生両生類におけるラナウイルス検出率の把握

2015年海洋島伊豆大島のヒキガエルにおける検出率は53.3%であったが、2018年には検出されなかった。また、神奈川県の新潟県における検出率は2018年26.7%であったが、2019年0%となった。一方で、愛媛県A地区(南予)で、検出率が68.2%と上昇し、かつウイルス保有量が多いと推定されるヌマガエルが高率にみられた。静岡では、過去、ラナウイルスが検出され

たことのなかったトウキョウダルマガエルでの検出率が上昇し、2018年40.9%、2019年22.2%となった。2年間という調査期間内に、対象とした両生類において、ラナウイルスの検出率は安定しておらず、自然界におけるラナウイルスの維持形態が短期間に変化していることが明らかにされた。

②長期飼育下ヌマガエルにおけるラナウイルス感染状況の推移

17匹のヌマガエルの導入時の感染率は陽性6匹、陰性11匹であった。観察期間中を通じて陰性は3匹で、一貫して陽性の個体はいなかった。陰転、陽転を繰り返した個体が8匹おり、徐々に陰性期間が延長し、陽性個体が減少し、かつ、反応の減弱化していった。観察期間内で最終的に陽性個体は1匹となった。十分量のPCR産物が回収できた24検体について塩基配列解析を行ったところ、2種類のウイルスタイプが検出されたが、採取時期、採取場所による違いはなく、さらに、時期によって1個体から検出されるウイルスタイプが異なった。なお、感染率に明らかな季節変動はなかった。また、この間、発症する個体はいなかった。

この研究によって、ヌマガエルがラナウイルスに長期に不顕性感染し、さらに個体によっては多種類のウイルスに感染していることが明らかになった。また、陰転陽転を繰り返し、検出されるウイルス種も変化し、外界から隔離された環境では、ウイルス量も減少して、最終的には陰転すると判断される。加えて、今までの調査で、野生個体では検出率に季節変動があり、秋に検出率が上昇したが、飼育下では、季節変動がみられなかったことから、自然界ではヌマガエルへのラナウイルス供給元(感染源)が存在するものと推察された。このため、ヌマガエルはラナウイルスの自然宿主や増幅動物である可能性は低い。

(2) 自然宿主および増幅動物の特定

対象とした鳥51羽のうち34羽からラナウイルス特異的遺伝子が増幅され、遺伝子配列が解析できたPCR産物すべてがラナウイルス遺伝子(以下RanaGene)と同定された。材料別の内訳は糞45検体中34検体(66.7%)および鳥23羽中17羽(73.9%)であった。この17羽すべてで腎臓、肝臓および小腸、あるいはそのいずれか1つの組織からRanaGeneが検出された。特に腎臓からの検出率は76.5%と高率であった。そして、アオバズクではRanaGeneは腎臓と肝臓のみから検出された。また、腸からRanaGeneが検出された9羽のうち6羽の糞からもRanaGeneが検出された。3日以上人工給餌をされていた鳥であっても臓器や糞からRanaGeneが検出された。最長では、海水魚キビナゴを22日間強制給餌されていたサギ(HER1)の臓器からもRanaGeneが検出された。解読できた塩基配列は、日本の両生類で検出されているRCV-JP(Une 2009, GenBank accession no. AB474588)、HNW(GenBank accession no. AB500273)とJP-3のウイルスのそれと一致し、一部では、他のウイルスとの部分的入れ替えが確認された。鳥の種類、検出される臓器や採取時期で検出されるウイルスタイプに違いはなかった。ラナウイルスが検出された鳥の臓器を病理組織学的に観察したところ、ラナウイルス感染に関連すると判断される病変はなかった。

(3) 国内両生類由来ラナウイルスの両生類への病原性の検討

外来両生類を用いて、病原性評価モデル作出を試みたが、2つのウイルス株および、接種雨量に関わらず、発症せず、ラナウイルスも検出されなかった。よって、両生類種によって感受性に明瞭な種差があることが明らかにされた。

以上の結果と今までの研究成果より、国内野生下両生類におけるラナウイルスの維持状況は、地域的にも、動物種においても、その検出率においても短い期間で刻々を変化していることが明らかになった。また、ヌマガエル1種ではあるが、長期飼育によって検出率が下がり、ウイルス量も減少していることが推察されることから、少なくともヌマガエルは自然宿主および増幅動物ではないと判断した。海洋島に生息する両生類において、突然、ラナウイルスが検出され、かつ、急激に検出されなくなった現象も同様に、自然宿主でないことを支持する現象と考えた。さらに、海洋島にも、多くの鳥が飛来していることなどから、ラナウイルス運搬動物として鳥に注目して、検索したところ、ラナウイルスが高率に検出され、ラナウイルス拡散の担い手として鳥類が重要であることが示された。そして、単なる運搬者ではなく、臓器から高率にラナウイルスが検出され、自然界におけるラナウイルスの維持動物であることが考えられた。

国内野生下では、ラナウイルスによる両生類の大量死が確認されており、飼育下では、小型サンショウウオを中心に、致死的な流行が起きていることから、これらの動物の保全について、今後、さらに、鳥類とラナウイルスの関係に関する研究、情報の蓄積が必要である。最後に、本研究によって高体温の鳥類へのラナウイルス感染が初めて証明されたことは学術的意義が高い。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tamukai K, Sugiyama J, Nagata Y, Tsutomu O, Katayama Y, Mizutani T, Kimura M, Une Y.	4. 巻 134
2. 論文標題 Epidemic nodular facial myxomatous dermatitis in juvenile Cranwell's horned frogs (<i>Ceratophrys cranwelli</i>).	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Dis Aqua Org	6. 最初と最後の頁 57-64
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3354/dao03358	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kamada T, Une Y, Matsui K, Fuma S, Ikeda T, Okamoto M.	4. 巻 21
2. 論文標題 Cloning of <i>Hynobius lichenatus</i> (Tohoku hynobiid salamander) p53 and analysis of its expression in response to radiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Genetics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12863-020-00856-0.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宇根有美、三井一鬼、逸見千寿香、藤井ひかる、赤羽良仁、田向健一
2. 発表標題 ボールバイソン <i>Python regius</i> におけるニドウイルス感染症の流行
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高見義紀、宇根有美
2. 発表標題 メキシコサンショウウオ (<i>Ambystoma mexicanum</i>) の体腔水腫症の病理学的検索
3. 学会等名 日本獣医病理学専門家協会第7回学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宇根有美
2. 発表標題 私たちがみているものとは
3. 学会等名 日本爬虫両棲類学会第57回相模原大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田向健一、杉山淳一、永田雄大、宇根有美
2. 発表標題 若齢クランウエルツノガエルにおける顔面粘液腫症様病変の流行
3. 学会等名 第17回爬虫類・両生類の臨床と病理に関するワークショップ
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宇根有美
2. 発表標題 飼育下野生動物やエキゾチックアニマルの食餌性代謝性疾患
3. 学会等名 第1回飼育動物栄養研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宇根有美
2. 発表標題 爬虫類の感染症の病理
3. 学会等名 エキゾチックペット研究会創立20周年記念セミナー（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 嘉手苅将、桑原一司、下田宙、宇根有美
2. 発表標題 オオサンショウウオの多発性皮膚混合腫瘍の病理学的特徴
3. 学会等名 第163回日本獣医学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------