

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：35302

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05639

研究課題名（和文）第3の新興真菌症は在来ヘビへの脅威となるか？

研究課題名（英文）Is the third emerging mycosis a threat to native snakes?

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） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：アジア初の第3の新興病原体*Ophidiomyces ophiodiicola*を発見して、在来ヘビへの影響を評価した。国内流通過程にある外来種に*Ophidiomycosis*が発生しているものの、在来種には自然発生例はなく感染実験も成立しなかったが、*in vitro*実験では在来種への感染性を確認した。また、*Oo*近縁の病原真菌 *Nanniziopsis guarroi*と*Parananniziopsis spp (Pn)*を発見し、各真菌の特異的検出法を確立して、国内浸淫状況を把握した。その結果、天然記念物シロヘビにおける*Pn*発症を確認した。病原真菌の在来種への負の影響を明らかにし、対策の必要性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生態系の保全及び種の保存の脅威となる病原真菌の在来種への影響を、自然死した動物の病性鑑定、感染実験および*in vitro*の実験と、多角的に評価したこと、併せて、病原真菌の特異的検出法を確立したことから、国内飼育下ヘビにおける各種真菌の浸淫状況の把握と、病原性の評価、治療の評価、予防対策などが可能となった。また、*Ophidiomyces ophiodiicola*の近縁真菌を株化できたことから、遺伝子解析、病原性決定因子などの解析が可能となり、生態系保存のみならず、病原体解析のための基盤を作ったこと。

研究成果の概要（英文）：A third emerging pathogen, *Ophidiomyces ophiodiicola*, was discovered for the first time in Asia and its impact on endemic snakes was evaluated. While *Ophidiomycosis* had occurred in exotic species distributed domestically, there were no natural outbreaks in endemic species and no infections in infection experiments. However, *in vitro* experiments showed that *Oo* infected endemic species. We also discovered the pathogenic fungi *Nanniziopsis guarroi* and *Parananniziopsis spp (Pn)*, which are closely related to *Oo*, and established a specific detection method for each fungus to determine the status of domestic invasion. As a result, we confirmed the occurrence of *Pn* in the Shirohebe, a protected species. The negative impact of pathogenic fungi on endemic species was clarified, indicating the need for countermeasures.

研究分野：獣医病理学

キーワード：新興感染症 真菌 生態系の保全 ヘビ *Ophidiomycosis* snake fungal disease

1. 研究開始当初の背景

真菌 *Ophidiomyces ophiodiicola* によって引き起こされるヘビ真菌症(Snake Fungal Disease; SFD)は、米国東部の野生のガラガラヘビの個体数の減少によって 2006 年に初めて発見された感染症で、両生類のカエルツボカビ、コウモリの白鼻病に、次ぐ、生態系に悪影響を与える第 3 の新興真菌症として注目されている。その存在は 2017 年ヨーロッパの野生ヘビで、2019 年には北米 38 の州と広域で確認されるようになり、オーストラリアを含めて、野生および飼育下の 30 種以上のヘビで記録される新興感染症である。我々は 2019 ~ 2020 年、アジア初の SFD の流行事例を発見して、2021 年に報告した。アジアには日本を含めていくつもの生物多様性のホットスポットがあり、非常に高い爬虫類の多様性を維持している。よって、生態系・生物多様性保全のために、これらの地域への *O. ophiodiicola* 拡散の阻止は喫緊の課題である。また、真菌の生物学的側面から、ツボカビ症の原因 *Batrachochytrium dendrobatidis* も、コウモリの白鼻病の原因 *Pseudogymnoascus destructans* もいずれも腐生菌で、今まで注目されることがなかった真菌であったが、近年、脊椎動物へと Host switch を引き起こし、強毒化している。これらの新興真菌に共通して、どのようにして生きている脊椎動物を栄養源とするようになったのか？この機序を解明することで、将来、出現するかもしれない第 4 の新興病原体への対策の確立に貢献できるかもしれないと考えた。

2. 研究の目的

O. ophiodiicola の国内飼育下および野生ヘビにおける浸淫状況および SFD 流行状況の調査、在来ヘビへの影響の評価によって、国内拡散阻止のための有効な対策を検討することを目的とする。本研究の成果は日本を含めて生物多様性ホットスポットが多いアジアでの対策にも資する。併せて、*O. ophiodiicola* の生物学的性状(生産物を含む)の分析、病原性決定因子および病理発生を検討して、Host switch の機序を解明することによって、新興感染症への理解を深め、現在から将来につながる生態系および生物多様性の保全への貢献を目指す。

3. 研究の方法

1) 飼育下および野生下ヘビにおける *O. ophiodiicola* 感染状況調査および SFD (Ophidiomycosis) 発生状況の把握

見かけ上健康な野生下在来ヘビ 4 種(アオダイショウ *Elaphe climacophora* 8 匹、シマヘビ *Elaphe quadrivirgata* 3 匹、ジムグリ *Elaphe conspicillata* 1 匹、ヒバカリ *Hebius vibakari* 3 匹)の体表ぬぐい物および皮膚を材料として PCR 法を用いて *O. ophiodiicola* の検出を試みた。ペットとして流通しているヘビおよび希少動物として維持されているヘビ(岩国のシロヘビ、*Elaphe climacophora* 白変種)を対象として、皮膚病を有している個体の生検材料、あるいは死亡した個体の皮膚病変を病理組織学的、微生物学的および分子生物学的に検索した。分子生物学的検査には、皮膚病変部より培養分離された真菌株を用いて、ITS 領域を増幅し、ダイレクトシーケンシング法により菌種を同定した。

Snake Fungal Disease ; SFD は *O. ophiodiicola* を原因とする感染症のみに限定して用いられ、Ophidiomycosis と称せられる。しかしながら、近縁の他の種類の真菌によっても類似の病変が形成されることが知られており、臨床症状および病理学的所見のみでは Ophidiomycosis と診断できない。また、混合感染もみられることから、成果報告では、真菌種を問わず、ヘビの真菌性皮膚炎を SFD と表現し、*O. ophiodiicola* が原因として証明できたものを Ophidiomycosis と記述した。

2) Ophidiomycosis の診断基準の検討および *O. ophiodiicola* 検出法の改良

Ophidiomycosis と他真菌による皮膚病変を病理学的に比較検討した。また、*O. ophiodiicola* と、本研究においてヘビの皮膚病変より、分離株化された *O. ophiodiicola* 近縁種の *Nannizopsis guarroi* と *Paranannizopsis spp.* の塩基配列を解析し、識別のための部位を特定し、それぞれの真菌を検出する特異的プライマーの設計を行った。株化樹立株および自然発症例を用いて、その特異性を検証した。免疫染色により *O. ophiodiicola* の検出を可能とするために、培養 *O. ophiodiicola* を抗原として、ウサギに接種して、抗 *O. ophiodiicola* 一次抗体の作成を試みた。

3) *O. ophiodiicola* の在来ヘビへの病原性

アオダイショウとシマヘビ各 3 匹、ジムグリ 1 匹、ヒバカリ 3 匹 計 10 匹に既報の感染方法に倣って *O. ophiodiicola* 孢子懸濁液を頭部(皮膚、眼、鼻、口)に滴下して、発症の有無を観察した。

4) ヘビ皮を用いた *O. ophiodiicola* の感染性評価

各種ヘビの脱皮皮を用いて、*O. ophiodiicola* のヘビへの感染性(皮利用能)を、他の真菌を対象として、評価した。在来ヘビおよび外来ヘビ 5 科 16 種類のヘビの主として脱皮皮を、洗浄、乾燥し、一定の大きさに細切して(約 3 ~ 7 mm) ガス滅菌してヘビ皮チップを作成した。これを普通寒天培地に静置して、孢子数を 10 の 2 乗ないしは 10 の 3 乗個 / μL に調整した孢子懸濁液 30 μL を滴下し、25 °C で 1 週間培養し、真菌の増殖状況を肉眼的および組織学的に、増殖なしを

0として、顕著な増殖を3として、4段階でスコア化して、一部のヘビ種を除いて、この実験を4回実施して、平均スコアを算出、評価した。孢子懸濁液は、国立科学博物館細矢剛先生が皮膚真菌症を発症したヘビより分離株化した *O. ophioidicola*、*N. guarroi* と *Parananniziopsis* spp.より作成した。

5) *O. ophioidicola* の生物学的特性と病原因子の分析

上記の研究によって得られた真菌の病原性や特性を明らかにするために、分離菌株65株について、培養抽出物の抗生物活性評価(細胞評価系、細菌評価系、真菌評価系)を行い、二次代謝産物の生産性を、超高速液体クロマトグラフを用いて解析した。

4. 研究成果

1) 飼育下および野生下ヘビにおける *O. ophioidicola* 感染状況調査および SFD 発生状況の把握

野生下在来ヘビ4種15匹から *O. ophioidicola*、*N. guarroi* および *Parananniziopsis* 属真菌は検出されなかった。

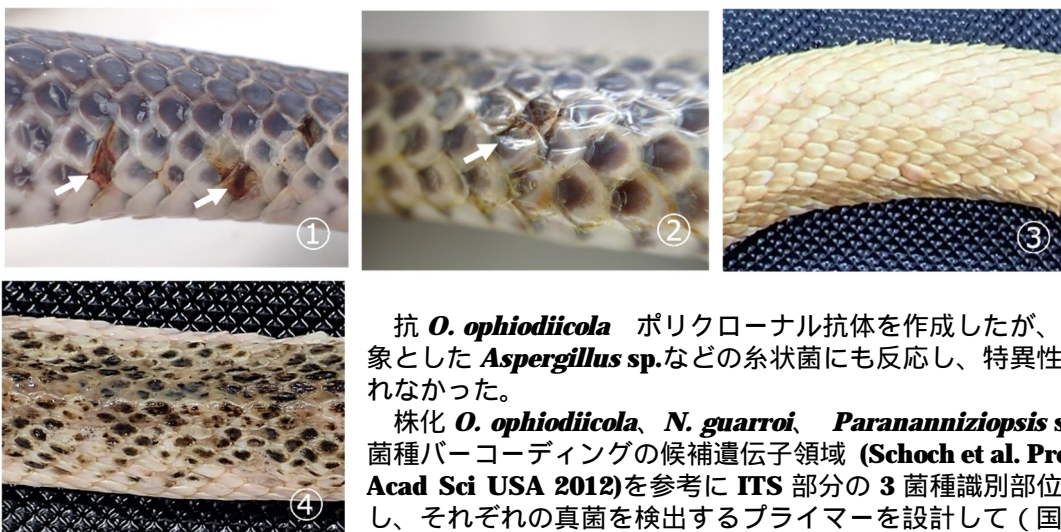
2021~2023年の3年間に4科12属15種(1匹種不明)、延べ82匹を対象として病理学および微生物学的に検索した。その結果、病理組織学的に37検体に真菌感染を確認し、*O. ophioidicola*、本種に近縁の *N. guarroi* (アジアでの確認は2報目)、*Parananniziopsis* spp.、および *Alternaria* など複数種の真菌を分離した。このうち、*O. ophioidicola* はサンビームヘビ *Xenopeltis unicolor* (図1)、ボールパイソン *Python regius*、カーペットパイソン *Morelia spilota* から、*N. guarroi* はサンビームヘビ(図2)と、いずれも飼育下外来ヘビのみから検出された。岩国のシロヘビは延べ45匹(生検および剖検)を検査して、26検体に真菌感染を認め、*Parananniziopsis* spp.を主体として、*Alternaria* sp.、*Chyso sporium-like organism*、*Acremonium* sp.、*Aspergillus* sp.、*Paecilomyces* sp.、*Mucor* sp.が検出され、混合感染もしばしばみられた。

現時点で、国内野生下ヘビにおいて SFD の流行は確認されていない。また、少数の検査数ではあるが SFD に関連する真菌の感染は認められず、野外への *O. ophioidicola* の拡散は生じていない可能性があった。しかしながら、新たに、ムカシヘビ科などの、ナミヘビ科以外のペット用ヘビ3種に *Ophiidiomycosis* を確認されたことから、流通過程にあるヘビにおける拡散には注意が必要である。また、岩国のシロヘビのみに確認された *Parananniziopsis* spp.の塩基配列に一致する菌種は見当たらず、新規の *Parananniziopsis* の可能性があり、特定地域で長年にわたり維持された個体群での発見は、宿主と病原体との関係を解析するために重要な事象と考えられる。

2) *Ophiidiomycosis* の診断基準の検討および *O. ophioidicola* 検出法の改良

SFD は、肉眼的に3つのタイプに分けられた。タイプ1は多病巣性の痂皮形成あるいは皮膚壊死を主体とする(図1, 2)。タイプ2と3はシロヘビに観察された病変で、前者は全身性に鱗が腫脹・肥厚する(図3)。後者は皮膚が黒変し、壊死脱落する(図4)。特にタイプ3は黒色真菌を主体として、ほとんどの例で混合感染していた。タイプ1は、*O. ophioidicola* と *N. guarroi* の感染例で観察された。よって、病理学的検査のみで *Ophiidiomycosis* と診断できなかった。そして、2021年に報告したナミヘビ科ヘビの *Ophiidiomycosis* の肉眼所見とも異なる症例もあり、ヘビの種類によって肉眼所見が異なることから、*Ophiidiomycosis* の確定診断には、病理学的、分子生物学的検査および微生物学的検査が必要である。

なお、海外で確認されている頭部の変形、眼真菌症と診断される肉眼所見を示すものはなかった。



抗 *O. ophioidicola* ポリクローナル抗体を作成したが、陰性対象とした *Aspergillus* sp.などの糸状菌にも反応し、特異性が得られなかった。

株化 *O. ophioidicola*、*N. guarroi*、*Parananniziopsis* sp.の真菌種バーコーディングの候補遺伝子領域 (Schoch et al. Proc Natl Acad Sci USA 2012)を参考に ITS 部分の3菌種識別部位を特定し、それぞれの真菌を検出するプライマーを設計して(国立科学博物館細矢剛先生、国立環境研究所五箇公一先生および鈴木亮彦先生担当) 株化真菌および自然発症例について検討したところ、的確にそれぞれの真菌を検出することができ、その有効性が検証できた。

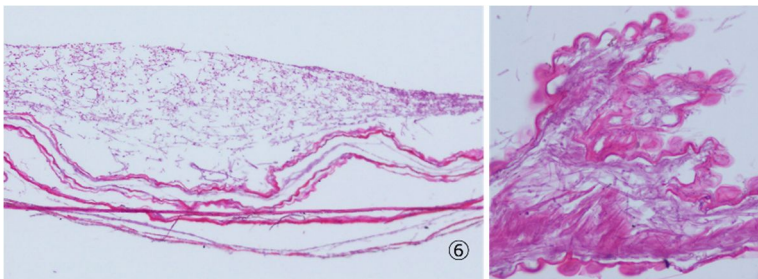
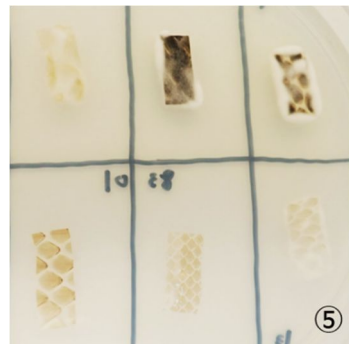
3) *O. ophioidicola* の在来ヘビへの病原性

アオダイショウとシマヘビ各 3 匹、ジムグリ 1 匹、ヒバカリ計 10 匹に既報の感染方法に従って *O. ophioidicola* を頭部（皮膚、眼、鼻、口）に接種して、アオダイショウ、シマヘビ、ジムグリは 270 日間、ヒバカリは 40 日間観察したが、発症しなかった。

4) ヘビ皮を用いた *O. ophioidicola* の感染性評価（図 5、6）

各種ヘビの皮における感染性（増殖性）は、3 菌種で異なり、*O. ophioidicola* と *Parananniziopsis sp.* は、サンビームヘビの皮では増殖しなかったが（#）、*N. guarroi* はすべての種類の皮で増殖し、平均スコア合計 25.58 と *O. ophioidicola* 24.88、*Parananniziopsis sp.* 20.5 と 2 つの菌種より旺盛に増殖した。

O. ophioidicola の増殖性が高かったヘビの種類はラットスネークおよびコーンスネークで、一方、低かったのはハブであったが、今回用いた在来ヘビ 6 種類（アオダイショウ、ヒバカリ、ヤマカガシ、リュウキュウアオヘビ、ニホンマムシ、ハブ）すべてで増殖した。特に国内に広く生息しているナミヘビ科ヘビで旺盛で、平均スコアは 1.52 で、*N. guarroi* 1.27 *Parananniziopsis sp.* 1.00 より高かった。



なお、3 種の真菌全般の増殖性が高かった種類はラットスネークであった。

病原体の感染、増殖、さらに発症に至るプロセスには、外因や内因を含めた宿主と病原体との関係を考慮する必要があるが、本実験は、過去、

Chrysosporium Anamorph Nannizziopsis vriesii ; CANV と呼ばれていたケラチン嗜好性（利用性）の高い真菌のヘビの皮膚に含まれるケラチンなどのタンパク利用性を検討して、その程度によって感染の可能性の有無を評価するものである。その結果、利用能の程度に差があるものの、3 菌種は、多くの種類のヘビに感染性を有していることが示唆され、特に *O. ophioidicola* は、在来ヘビへの潜在的な感染リスクは、他 2 菌種より高いといえる。# サンビームヘビの脱皮皮チップ作成に際して、個々の鱗が単離することが多く、1 回しか実験ができなかったため、参考資料とする。

5) *O. ophioidicola* の生物学的特性と病原因子の分析

本研究内容は、北里大学 供田洋先生、大城太一先生および小林啓介先生らが担当した。分離菌株 65 株の培養抽出物の二次代謝産物の生産性を、超高速液体クロマトグラフを用いて解析して、*Parananniziopsis sp.* UH-21 の培養抽出物中には DPN 検索で該当しない複数の物質があることを確認した。具体的には、*Parananniziopsis sp.* UH-21 の培養プロスから、C7-プレニル化トリプトファンを含む 2 種類の新規環状ジペプチド、パラナザミド A (1) と B (2) を単離した。MS や 1D/2D NMR などの様々な分光学的手法を用いて、1 と 2 の平面構造を明らかにした。1 の絶対配置は、合成した化合物と比較することにより決定した。化合物 1 および 2 は 128 $\mu\text{g ml}^{-1}$ の濃度でも抗真菌活性、抗菌活性および細胞毒性活性を示さなかったが、1 および 2 は併用処理で *Candida auris* に対してアムホテリシン B 増強活性を示した。また、生物活性評価を実施し、一部に細胞増殖阻害活性があった。病理学的に *Ophiidiomycosis* では、他の真菌性皮膚炎より皮膚の壊死傾向が強く、致死的であることが明らかである。その病原性に関連する因子として、ケラチナーゼやコラゲナーゼなどの酵素を含む種々の真菌生産物の関与が考えられる。今後、病理発生解明のためには、*O. ophioidicola* 特異の生産物あるいは、大量生産物の検索が必要と考える。

以上の結果から、現時点で、国内野生下および飼育下の在来ヘビに *O. ophioidicola* の感染は確認されていないが、国内流過程にある外来ヘビ 3 種に *Ophiidiomycosis* の発生があり、さらに、ヘビ皮チップを用いた感染性評価実験で、*O. ophioidicola* は多くのヘビに感染性を有し、かつ在来ヘビ皮の利用能が高いことから、在来ヘビへの拡散に十分注意する必要がある。また、本研究により真菌の種類を的確に検出できるようになったことから、*O. ophioidicola* の 1) 国内浸淫状況の正確な把握、2) 感染ヘビの摘発、隔離、3) 臨床現場における適切な治療が可能となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 TAKAMI Yoshinori, NAM Kyung-Ok, TAKAKI Youki, KADEKARU Sho, HEMMI Chizuka, HOSOYA Tsuyoshi, UNE Yumi	4. 巻 83
2. 論文標題 First report of ophidiomycosis in Asia caused by <i>Ophidiomyces ophiodiicola</i> in captive snakes in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 1234 ~ 1239
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.21-0177	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 宇根有美、高見義紀、細矢剛	4. 巻 2
2. 論文標題 国内の飼育下ヘビにおけるヘビ真菌症 Snake Fungal Disease 「Ophidiomycosis」の確認	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 爬虫両棲類学会報	6. 最初と最後の頁 198 ~ 203
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi K, Tejima R, Nagai K, Seki R, Hosoya T, Une Y, Shigeno S, Tomoda H, Ohshiro T.	4. 巻 May 15
2. 論文標題 Paranazzamides A and B, new cyclic dipeptides containing a C7-prenylated tryptophan, produced by pathogenic reptile fungi <i>Paranannizziopsis</i> sp. UH-21.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 J Antibiot (Tokyo)	6. 最初と最後の頁 00-00
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41429-024-00725-3.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 宇根有美	4. 巻 3
2. 論文標題 ヘビ真菌症 (Snake Fungal Disease [Ophidiomycosis])	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本獣医エキゾチック動物学会誌	6. 最初と最後の頁 3-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宇根有美
2. 発表標題 特別講義 爬虫類の飼育と病気
3. 学会等名 岡山理科大学専門学校動物看護学科(招待講演) (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宇根有美、嘉手苅将、高見義紀、田向健一、細矢剛
2. 発表標題 天然記念物岩国のシロヘビの真菌性皮膚炎の解析
3. 学会等名 第165回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鎌田龍星、黒木俊郎、松井利康、石嶋慧多、立本完吾、小林大介、伊澤晴彦、高野愛、下田宙、藤井ひかる、畑明寿、宇根有美、森川茂、前田健2、吉川泰弘
2. 発表標題 アオダイショウ由来培養細胞の性状解析
3. 学会等名 第73回日本衛生動物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宇根有美、高見義紀、高木佑基、Kyong-Ok Nam、嘉手苅将、逸見千寿香、細矢 剛
2. 発表標題 国内飼育下ヘビにおける新興感染症Ophidiomycosisの流行
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鎌田 龍星、黒木 俊郎、松井 利康、石嶋 慧多、立本 完吾、小林 大介、伊澤 晴彦、高野 愛、下田 宙、藤井 ひかる、宇根有美、森川 茂、前田 健、吉川 泰弘
2. 発表標題 アオダイショウおよびシマヘビ由来培養細胞の性状解析
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宇根有美、高見義紀2、高木佑基、Kyong-Ok Nam、嘉手苅将、逸見千寿香、細矢 剛
2. 発表標題 国内飼育下ヘビにおける新興感染症Ophidiomycosisの流行
3. 学会等名 日本爬虫両棲類学会 第 60 回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宇根 有美
2. 発表標題 爬虫類 ~ 基本的飼養管理から最近の疾病まで ~
3. 学会等名 第42回動物臨床医学会年次大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宇根 有美
2. 発表標題 特別講義 爬虫類の飼育と病気
3. 学会等名 岡山理科大学専門学校動物看護学科（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宇根有美、嘉手苅将、高見義紀、田向健一、細矢剛
2. 発表標題 天然記念物岩国のシロヘビの真菌性皮膚炎の解析
3. 学会等名 第165回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>輸入飼育ヘビから重要病原体（ヘビ真菌症）を発見、国内侵入を確認 https://prtimes.jp/main/html/rd/p/000000268.000047048.html アジアで初確認の「ヘビ真菌症」、日本の輸入飼育ヘビが発症 https://univ-journal.jp/102854/ 2021年6月29日</p>

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
---------	---------