

## 2023 年度 若手・女性研究者奨励金 レポート

研究課題	<b>天然記念物「岩国のシロヘビ」保全のための病理学的解析</b> ーシロヘビの感染症コントロールのための病理学的研究ー
キーワード	①岩国のシロヘビ、②皮膚真菌症、③獣医病理学

### 研究者の所属・氏名等

フリガナ 氏名	カデカル ショウ 嘉手苺 将
配付時の所属先・職位等 (令和5年4月1日現在)	岡山理科大学 獣医学部獣医学科 助教
現在の所属先・職位等	岡山理科大学 獣医学部獣医学科 助教
プロフィール	学歴：2009年麻布大学獣医学部獣医学科卒業。2016年麻布大学大学院獣医学研究科修了（社会人入学）。履歴：2009年都内動物病院勤務。2010年神奈川県入庁（食肉衛生検査所で食肉衛生検査、衛生研究所でヒトの細菌性食中毒やウイルス性感染症の検査に従事）。2020年より、岡山理科大学獣医学部に就職。獣医病理学を専攻し、大学院では「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」を行っていた。現在は、シロヘビ保全を目的とした病理学的研究およびミーアキャットの心腔拡張の原因究明を主に、様々な動物の病気を対象として病理学的検索を行っている。

### 1. 研究の概要

「岩国のシロヘビ」は国内在来種アオダイショウ *Elaphe climacophora* の白変個体であり、自然界では珍しいことから「岩国のシロヘビ」(以下シロヘビ)として天然記念物に指定され、また、岩国市民からも崇拜の対象として大切にされている。岩国市はシロヘビを半自然下で継代飼育し、その数 1,000 頭を目指しているが、種々の疾病により未だ目標を達成できていない。本研究では、シロヘビの保護を目的とし、病理学的解析、特に、世界的に野生下ヘビに甚大な影響を与えている皮膚真菌症に焦点を当てて検索することを試み、次の結果を得た。①ヘビの重大な皮膚真菌症 2 疾患 3 菌種（ヘビ真菌症の原因：*Ophidiomyces ophidicola*、CANV の原因：*Nannizziopsis* sp.、*Paranannizziopsis* sp.）を鑑別する PCR 検査法を確立した。②病理学的解析では、シロヘビ 12 頭を検索したところ、シロヘビの死因として重要な疾病は壊死性腸炎であり、皮膚真菌症では無いことが明らかとなった。また、シロヘビには鉤虫 *Kalicephalus* sp. が高率に寄生していたことから、本鉤虫は壊死性腸炎の誘因または増悪因子の可能性がある。そして経験上、野生下ヘビに本鉤虫の寄生はほとんど認められない。その他、小腸と膵臓に、過去に報告の無いアデノウイルス (AdV) の感染を認めた。本研究において、ヘビの重要な真菌症 2 疾患 3 菌種の鑑別を可能にしたことは、今後これらの疾病の診療と対策に有効である。また、野生下であまり寄生のみられない鉤虫がシロヘビに高率に寄生していたこと、過去に報告のない AdV 感染を認めたことは、シロヘビの保護を目的に、複数頭を累代飼育することが副次的に特定の病原体の継代感染/寄生の温床になる可能性、AdV に関してはその集団のなかでウイルスが変異している可能性を示唆している。今後、駆虫などシロヘ

ビの保護活動を継続すると共に、シロヘビに感染している AdV の遺伝子解析などを行うことで、宿主-ウイルス間の相互関係の解明などを行う。

## 2. 研究の動機、目的

「岩国のシロヘビ」は日本固有種であるアオダイショウ *Elaphe climacophora* の白変個体（アルビノ）であり、岩国市内で少数ながら何世代にもわたって生息している。その希少性から、シロヘビは岩国市民から崇拝の対象として大切にされ、そして「岩国のシロヘビ」として天然記念物に指定されている。しかし、元々珍しいシロヘビの野生個体はほとんど見ることができなくなり、域外飼育として保護施設での個体数の維持が主体となっている。現在、岩国市と保存団体が共同して、主に放飼場でシロヘビを飼育し、その数 1,000 頭を目指している。しかしながら、死亡が相次ぎ、未だ目標数に満たない現状がある。

このような状況下、岩国市は飼育施設の改修を行うとともに、科学的分析により現状を正確に把握するために、本学にシロヘビ保全の協力要請を行った。報告者はその要請を受けて、2021 年より、ヘビの寄生虫検査、駆虫などを行い、さらに皮膚病などの何らかの異常を示す個体や死亡個体などの病理学的検索を行ったところ、特定の線虫寄生および皮膚真菌症の罹患率が高いことを明らかにした。特に、予備調査で明らかになった皮膚真菌症については、早急に解析し、対策をとるべき重要な事案として捉えている。なぜならば近年、世界的なヘビの種類・個体数の減少に関与するとされ、また、2021 年に国内でも確認されたヘビ真菌症 Snake fungus disease: SFD の存在がある。本感染症は、*Ophidiomyces ophidiicola* (Op) という真菌の 1 種がヘビに致死性皮膚感染症を引き起こすもので、米国の野生下のある種のヘビの個体数を 90% 減少させたと報告されている。その被害の深刻さと生態系への影響の大きさから、1990 年代後半に認められた両生類、コウモリにそれぞれに甚大な被害を引き起こしたツボカビ症（原因真菌：*Batrachochytrium dendrobatidis*）およびコウモリの白鼻病（原因真菌：*Pseudogymnoascus destructans*）に次ぐ第 3 の新興感染症と称されている。

本研究では、天然記念物「岩国のシロヘビ」保護の喫緊の課題となる「シロヘビの皮膚真菌症」を獣医学領域、特に病理学的側面から解析して、効果的な対策立案に貢献することを目的とする。並行して、シロヘビの病性鑑定を通して、死因およびそれぞれの疾病の病理発生を明らかにする。

## 3. 研究の結果

(1) 分子生物学的検査法の確立：ヘビの皮膚真菌症には① Op 感染によって生じる SFD、② *Nannizziopsis* sp. (Nz) や③ *Paranannizziopsis* sp. (Pn) 感染を原因とし、ヘビやトカゲに皮膚感染のみならず全身感染する CANV の鑑別が重要である。しかし、これらの真菌は形態学的に識別が難しい。また、形態学的に判断するには病巣を含む皮膚の一部を切除する必要があるため実施し難い。そこで我々は感度、特異度ともに高く、容易に採取した材料から検査できる分子生物学的検査法（PCR 法）を確立することを試みた。まず、微生物の同定に用いられる ITS 領域において 3 菌種それぞれの塩基配列に特異的なプライマーを設計した。そして、過去に分離した 3 菌種の菌株からそれぞれ DNA を抽出した。これらのプライマーと DNA 抽出物および反応試薬を用いて PCR を行った。その結果、Op、Nz、Pn それぞれに特異的な結果（増幅産物）を得ることができた。このことから、PCR 法によって 3 菌種の識別を可能にした。PCR 法は、例えば綿棒で皮膚病巣を拭うといった容易な方法で採材でき、かつ検出感度と特異度が高いことから、今後、ヘビの皮膚真菌症における 2 疾病 3 菌種の鑑別と診断に非常に有用である。

(2) 病理学的解析：12 頭のシロヘビを定法に従い病理解剖および病理組織学的に検索した。剖検時、複数個体の腸管に寄生虫および壊死性腸炎を認めたこと、病理組織学的にアデノウイルス（AdV）感染が疑われる所見を認めたことから、それぞれ寄生虫の同定、細菌検査および AdV の遺伝子検査を並行した。その結果、壊死性腸炎（Fig. 1）が 8 頭と最も多く、その内 4 頭には実質臓器に細菌感染を伴う壊死を認め、敗血症によって死亡したと判断した。その他、全個体に肝臓、脾臓など諸臓器において 1 臓器または複数臓器に巣状壊死を認めた。細菌検査では、腸病変から有意な細菌は分離されなかった。複数個体の腸管にみられた寄生虫は

*Kalicephalus* sp. と同定された。同種と思われる虫体と虫卵は病理組織学的にも 9 頭に観察された (Fig. 1)。病理組織学的に 4 頭の小腸粘膜上皮、膵臓外分泌細胞のいずれかまたは両方に腫大、AdV 感染を疑う両染色核内封入体 (Fig. 2) を認め、その内 2 頭から PCR にて過去に報告されていない AdV 遺伝子が検出された。一方、皮膚真菌症は 2 頭しか確認されず、1 頭は黒色真菌の感染を含む日和見感染症であった (他 1 頭は検索中)。

今回、死亡したシロヘビを、より詳細に検索した結果、重視すべき疾病は最も多く認められた壊死性腸炎と判断した。爬虫類の壊死性腸炎は衰弱や免疫力が低下した個体にアメーバ原虫や腸内細菌を含む各種細菌によって生じる日和見感染症である。本病変を機に細菌感染が全身に波及すると、敗血症に至り種々の臓器に壊死などを引き起こし死亡する。なお、本事例の壊死性腸炎の誘因または増悪因子として、高率に寄生を認めた鉤虫 *Kalicephalus* sp. の寄生による腸粘膜の機械的損傷を疑っている。一方、経験上、野生下ヘビにおける本鉤虫の寄生はほとんど認められない。そして、複数個体にこれまで報告されていない AdV 感染を認めた。これらのことから、シロヘビの現状は、保護を目的に複数のシロヘビを継代飼育していることが副次的に特定の病原体の継代感染/寄生の温床になっている可能性、AdV に関してはその集団のなかでウイルスが変異している可能性が考えられた。

以上の結果から、今後はシロヘビの駆虫治療を行うとともに、AdV の遺伝子解析などを行い、宿主-ウイルス間の相互関係を調べるなどの研究に発展させることを計画している。

発表：本研究結果の一部を第 17 回 SCAPARA (爬虫類と両生類の臨床と病理のための研究会) ワーク・ショップで口頭発表した。

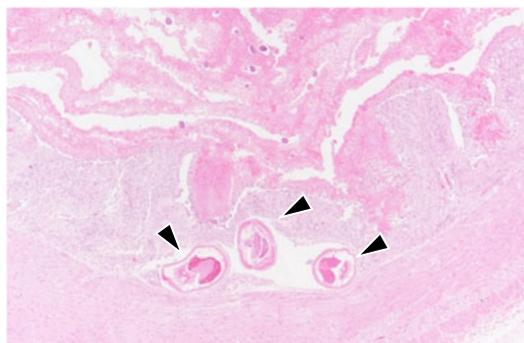


Fig. 1. 小腸粘膜が広範に壊死し、固有構造消失。粘膜深層に鉤虫寄生 (矢頭)。

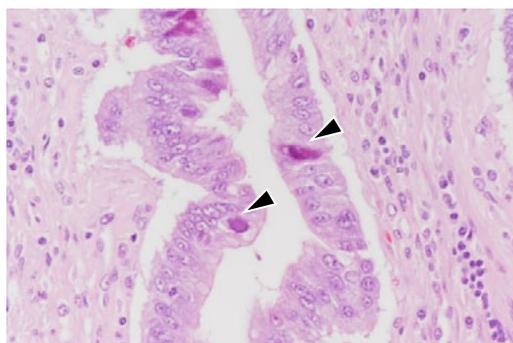


Fig. 2. 腫大した核内に両染色核内封入体(核内充満型)がみられる (矢頭)。

#### 4. 研究者としてのこれからの展望

近年、希少動物の保護活動や愛玩目的として野生動物を飼育することが増えています。これらの動物の病気に関する基礎知識が確立されていないなか手探りで獣医師や関係者が必死に保護活動や治療に取り組んでいることが少なくありません。私は、獣医師の使命である「ヒトと動物の健康を守る」を主軸とし、獣医師、関係者の皆様と協力して様々な動物の疾病に関する基礎的研究を学生と共に行っていきたいです。

#### 5. 支援者 (寄付企業等や社会一般) 等へのメッセージ

本研究を遂行するにあたり、研究者奨励金をご支援いただきました日本私立学校振興・共済事業団および検体を提供していただいた岩国市をはじめとする関係者の皆様に心より感謝申し上げます。私にとって本奨励金は初めて外部資金を獲得して研究する貴重な経験でした。そして、上述のとおり新たな研究の兆しを得ることもできました。

今後とも、若手研究者への継続的なご理解・ご支援を受け賜われますよう、よろしくお願い申し上げます。

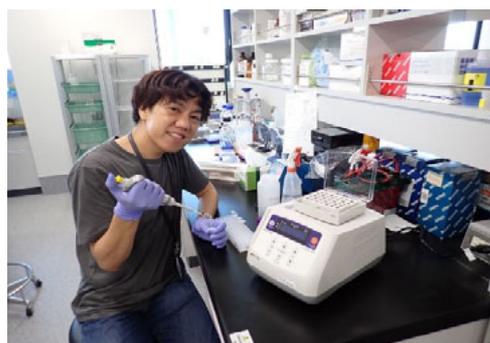


Fig. 3. アデノウイルスの遺伝子を抽出している様子。