

学的にはクラスターもしくはクレードと表現する)、*H. capsulatum* var. *capsulatum* 由来配列からなるグループ、*H. capsulatum* var. *duboisii* 由来配列からなるグループに大別できることがわかってきた⁷。

さらに2008年末のGenBankに登録されている*Ajellomyces capsulatus* (*H. capsulatum*の有性型の名称で分類学的にこちらが優先される)のリボゾームRNA遺伝子のITS 1-5.8S-ITS 2領域配列データに基づいて樹系解析を行うと*H. capsulatum* var. *farciminosum*と*H. capsulatum* var. *capsulatum*の混在するグループが1つ、*H. capsulatum* var. *capsulatum*由来の配列からなるグループが2つ、*H. capsulatum* var. *duboisii*からなるグループが1つの計4グループに収束しつつある(図1)。

リボゾームRNA遺伝子のITS 1-5.8S-ITS 2領域配列に基づく分子疫学的解析から、わが国で海外渡航歴の無いヒト症例由来の配列およびイス症例由来の配列は、ウマ由来の*H. capsulatum* var. *farciminosum*と*H. capsulatum* var. *capsulatum*の混在するグループに属することが示唆されている。また、この遺伝子型グループには海外症例も含めて、ヒトでの全身播種性症例、わが国のイスでの肺病巣を伴った症例の配列が位置している。このような症状の違いは、基礎疾患による免疫状態や宿主に

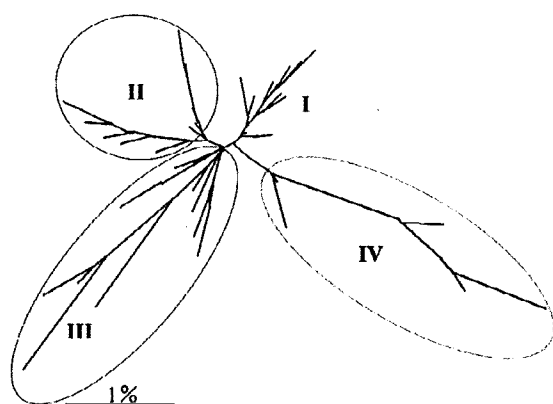


図1 *H. capsulatum*のinternal transcribed spacer (ITS) 1-5.8S-ITS 2領域の配列に基づいた樹系図。*H. capsulatum* var. *farciminosum*と*H. capsulatum* var. *capsulatum*の混在するグループ(I)、*H. capsulatum* var. *capsulatum*由来の配列からなるグループ(IIとIII)、*H. capsulatum* var. *duboisii*からなるグループ(IV)にわけられた。わが国で海外渡航歴の無いヒト症例由来の配列およびイス症例由来の配列はIに含まれた。バーは1%置換率を示す。

よる感受性の違いによるものと推測している。よって、ヒトもイスもわが国土着のヒストプラズマ症の原因菌の遺伝子型は、ウマの仮性皮疽の原因菌に近いことから、これらはウマの仮性皮疽の異種寄生と考えている^{4,7}。

X. 治療方法

抗真菌薬の長期投与が必要である³²。外科的切除も有効である場合もある^{16,30}。しかし、イスでは再手術が行われた症例もある³¹。詳細は専門書等を参考にしてほしい¹⁰。

XI. ヒストプラズマ症に感染した愛玩動物の飼育管理

現在、愛玩動物からヒストプラズマ症に感染した症例は報告されていないが、原因菌の遺伝子型が接触感染を起こす*H. capsulatum* var. *farciminosum*に近縁であることから、安全性を重要視し、特に、家族に免疫低下を伴う疾患の方が同居している場合は、感染動物の入院施設を備えた動物病院にゆだねることを推奨する。

また、動物が使用していたタオル、寝具などの滅菌(オートクレーブをかける、消毒液に漬け込むなど)、生活環境の消毒などは飼育家族に任せるのではなく、感染症予防の専門家(医師・獣医師)の指導のもとに行われることが望ましい。

しかし、長期入院はもちろん、安全な飼育管理が可能な場合でも愛玩動物では治療費の問題が深刻となることが想定される。現在までに完治したイス症例は2例であることから、必ずしも治癒できる保証はない。通院治療し、各種検査と薬剤投与だけを受けた場合、体重5キロ程度のイスで数十万円以上と推定される。飼育者を経済的に圧迫することになるため、安全と経済の両面から海外では安楽死も選択肢の1つである。

おわりに

ヒストプラズマ症は感染症法で規制されている真菌感染症ではないが、日本に存在する最も危険な真菌感染症として取り扱うことが望ましい。

文 献

- 1) Kamei K, Sano A, Kiuchi K, et al.: The trend of imported mycoses in Japan. *J Infect Chemotherap* **9** : 16-20, 2003.
- 2) 佐野文子, 宮治 誠: 本邦におけるイヌのヒストプラズマ症. *日本医真菌学会雑誌*, **44** : 239-244, 2003.
- 3) Kagawa Y, Aoki S, Iwatomi T, et al.: Histoplasmosis in the skin and gingiva in a dog. *J Vet Med Sci* 1998 ; **60** : 863-865. *J Vet Med Sci*. **60** : 863-865, 1998.
- 4) 佐野文子, 上田八千代, 猪股智夫他: 本邦で発症したイヌのヒストプラズマ症2例について. *日本医真菌学会雑誌*. **42** : 217-223, 2001.
- 5) Ueda Y, Sano A, Tamura M, et al.: Diagnosis of histoplasmosis by detection of the internal transcribed spacer region of fungal rRNA gene from a paraffin-embedded skin sample from a dog in Japan. *Vet Microbiol*, **94** : 219-224, 2003.
- 6) Nishifuji K, Ueda Y, Sano A, et al.: Interdigital involvement in a case of primary cutaneous canine histoplasmosis in Japan. *J Vet Med A* **52** : 472-480, 2005.
- 7) Murata Y, Sano A, Ueda Y, et al.: Molecular epidemiology of canine histoplasmosis in Japan. *Med Mycol*. **45** : 233-247, 2007.
- 8) Katayama Y, Kuwano A, Yoshihara T.: Histoplasmosis in the lung of a race horse with yersiniosis. *J Vet. Med Sci* **63** : 1229-1231, 2001.
- 9) Morita T, Kishimoto M, Shimada A, et al.: Disseminated histoplasmosis in a sea otter (*Enhydra lutris*). *J Comp Pathol* **125** : 219-223, 2001.
- 10) Oshima KI, Miura S.: A histopathological report on a case of histoplasmosis in a heifer with Fallot's tetralogy. *Nippon Juigaku Zasshi* **34** : 333-339, 1972.
- 11) 故時重獣医学博士記念会: 時重獣医学博士論文集 20. 仮性皮膚. 凸版印刷, 東京, (1918), pp152-222.
- 12) Yamato H, Hitomi H, Maekawa S, Mimura K.: A case of histoplasmosis. *Acta Med Okayama* **11** : 347-364, 1957.
- 13) 鴨川武彦, 桑野直迪, 毛利之男他: 肺結核と誤診されたヒストプラズマ症と思われる一例について. *結核* **36** : 194, 1961.
- 14) 三間孝雄, 山本 保, 荻間勇他: 慢性肺気腫, 肺がん例にみられたヒストプラズマ症. *結核* **59** : 256-257, 1984.
- 15) Ohnishi K, Nagai Y, Okada K, et al.: Primary cutaneous histoplasmosis in papuloerythroderma (Ofuji). *J Dermatol* **21** : 586-589, 1994.
- 16) Takakura S.: A case of chronic disseminated histoplasmosis emerged during steroid maintenance therapy for rheumatoid arthritis with secondary amyloidosis and nephrotic syndrome. *Tropical Medicine and Health* **33** : 40, 2005.
- 17) 筑後孝章, 木村雅友, 伊藤浩行: 病理解剖後に同定された国内ヒストプラズマ症の1例. *日本病理学会会誌* **93** : 387, 2004.
- 18) 西川敏雄, 村松友義, 松三 彰, 井上文之: 肺癌との鑑別が困難であった肺ヒストプラズマ症の1手術例. *日本呼吸器外科学会雑誌* **22** : 92-96, 2008.
- 19) 橋本 修, 石丸裕康: 海外渡航歴のないヒストプラズマ感染症の1例. *感染症学会雑誌* **82** : 588, 2008.
- 20) Kwon-Chung KJ, Bennett JE.: 18. Histoplasmosis. In : Kwon-Chung KJ, Bennett JE, eds. *Medical Mycology*. Lea and Febiger, Philadelphia, PA, USA 464-513, 1992.
- 21) Chandler FW, Kaplan W, Ajello L.: 13. Histoplasmosis capsulati. In : Carruthers GB ed. *A Colour Atlas and Textbook of the Histopathology of Mycotic Diseases*. Wolfe Medical Publications Ltd., Weert, The Netherlands, 63-66, 1980.
- 22) Chandler FW, Kaplan W, Ajello L.: 14. Histoplasmosis duboisii. In : Carruthers GB ed. *A Colour Atlas and Textbook of the Histopathology of Mycotic Diseases*. Wolfe Medical Publications Ltd., Weert, The Netherlands, 67-69, 1980.
- 23) Chandler FW, Kaplan W, Ajello L.: 15. Histoplasmosis farciminosi. In : Carruthers GB ed. *A Colour Atlas and Textbook of the Histopathology of Mycotic Diseases*. Wolfe Medical Publications Ltd., Weert, The Netherlands, 70-72, 1980.
- 24) Kasuga T, Taylor JW, White TJ.: Phylogenetic relationships of varieties and geographical groups of the human pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum* Darling. *J Clin Microbiol* **37** : 653-663, 1999.
- 25) Tamura M, Kasuga T, Watanabe K, et al.: Phylogenetic characterization of *Histoplasma capsulatum* strains based on ITS region sequences, including two new strains from Thai and Chinese patients in Japan. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* **43** : 11-19, 2002.
- 26) Kasuga T, White TJ, Koenig G, et al.: Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. *Mol Ecol* **12** : 3383-3401, 2003.
- 27) 宮治 誠, 西村和子, 佐野文子: 新・土の微生物(8)土のヒト病原菌類. *日本土壌微生物学会編*. 株式会社 博友社, 東京, 2002.
- 28) 宮治 誠, 佐野文子: 病原真菌の寄生形態と組織反応 6 真菌症の疫学と原因菌の生態(2)ーヒストプラズマ症の疫学と原因菌の生態ー. *医薬の門* **42** : 896-900, 2002.
- 29) Kikuchi K, Sugita T, Makimura K, et al.: Is *Histoplasma capsulatum* a native inhabitant of Japan? *Microbiol Immunol. Sep* ; **52** (9) : 455-459, 2008.
- 30) 岡部隊獣医部: 南方獣疫概況. *陸軍獣医団報* **49** : 915-935, 1943.
- 31) Smith JD : Histoplasmosis : Macintire DK ed.: In *Ettiene Cote : CLINICAL VETERINARY ADVISOR-Dogs and Cats*. (Mosby Elsevier. Amsterdam, The Netherlands, pp. 525-527, 2006.
- 32) Kauffman CA : Histoplasmosis : a Clinical and Laboratory Update, *Clinical Microbiology Reviews*, **20** : 115-132, 2007.
- 33) World Organization for Animal Health (http://www.oie.int/eng/en_index.htm): Chapter 2.5.4. Epizootic lymphangitis. (http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.05.04_EPIZ_LYMPHANGITIS.pdf), in OIE

- Terrestrial Manual 2008.
- 34) Rhoades JD.: Canine histoplasmosis: 1. Clinical histoplasmosis. *Am J Pub Health* **62** : 1512-1514, 1972.
 - 35) Nielsen SW.: Laboratory diagnosis of systemic mycoses in dogs. Part 1. *Modern Vet Prac* **60** : 210-216, 1979.
 - 36) Mackie JT, Kaufman L, Ellis D.: Confirmed histoplasmosis in an Australian dog. *Aust Vet J* **75** : 362-363, 1997.
 - 37) Lenhart, SW, Schafer MP, Singal M, Hajjeh RA : Histoplasmosis. *Protecting Workers at Risk*. (www.cdc.gov/niosh, <http://www.cdc.gov/niosh/docs/2005-109/>), 2004.
 - 38) Martagon-Villamil J, Shrestha N, Sholtis M, et al. : Identification of *Histoplasma capsulatum* from culture extracts by real-time PCR. *J Clin Microbiol.* **41** : 1295-1298, 2003.
 - 39) Summerbell RC, Moore MK, Starink-Willemsse M, Van Iperen A.: ITS barcodes for *Trichophyton tonsurans* and *T. equinum*. *Med Mycol* **45** : 193-200, 2007.
 - 40) 谷村繁雄, 友安 浩, 伴場次郎他 : 肺ヒストプラズマ症と考えられる2手術例. *日本胸部臨床* **50** : 250-254, 1991.
 - 41) Wheat IJ, Freifeld AG, Kleiman MB, et al.: Infectious Diseases Society of America. Clinical practice guidelines for the management of patients with histoplasmosis : 2007 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* **45** : 807-825, 2007.

—Original—

Indirect ELISA and Indirect Immunofluorescent Antibody Assay for Detecting the Antibody against Murine Norovirus S7 in Mice

Yota KITAGAWA¹⁾, Yukinobu TOHYA²⁾, Fumio IKE³⁾, Ayako KAJITA³⁾, Sang-Jin PARK¹⁾, Yoshiyuki ISHII¹⁾, Shigeru KYUWA¹⁾, and Yasuhiro YOSHIKAWA¹⁾

¹⁾Department of Biomedical Science, ²⁾Department of Veterinary Microbiology, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan, and ³⁾Experimental Animal Division, RIKEN BioResource Center, 3-1-1 Koyadai, Tsukuba, Ibaraki 305-0074, Japan

Abstract: To evaluate murine norovirus (MNV) infection in laboratory mice, we attempted to develop an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) system and an indirect immunofluorescent antibody (IFA) assay for detecting the anti-MNV-S7 antibody in mice. MNV-S7, which was isolated in Japan, was used in both assays. The antigen for ELISA was prepared by ultracentrifugation of culture supernatants of RAW 264 cells infected with MNV-S7. Positive sera were obtained from 6-week-old, female C57BL/6JJcl mice inoculated orally with MNV-S7. IFA against infected RAW 264 cells was able to discriminate positive sera from negative sera. Indirect ELISA was performed using 96-well ELISA plates coated with formalin-treated MNV-S7 antigen. In this ELISA system, mouse sera obtained 2 weeks after infection or later showed significantly high OD values and were judged positive. An equal level of anti-MNV-S7 antibody response was observed in BALB/cAJcl, C57BL/6JJcl, DBA/2JJcl, and Jcl:ICR mice; whereas, C3H/HeJJcl mice demonstrated slightly lower antibody production 4 weeks after infection. We also used this ELISA system to evaluate 77 murine serum samples obtained from 15 conventional mouse rooms in research facilities in Japan and found that approximately half of the serum samples contained antibody to MNV-S7. We found that some serum samples were negative for antibodies to mouse hepatitis virus and *Mycoplasma pulmonis* but positive for antibody to MNV-S7. The results suggest that the MNV infection is more prevalent than other infections such as mouse hepatitis virus and *Mycoplasma pulmonis* in conventional mouse colonies in Japan, as is the case in other areas of the world.

Key words: enzyme-linked immunosorbent assay, immunofluorescent antibody assay, murine norovirus

Introduction

The murine norovirus (MNV) was recently isolated

from immunodeficient mice that succumbed to a disease of unknown etiology [9, 23]. Genetic analysis of this agent has revealed that the pathogen (MNV-1) is close-

(Received 14 July 2009 / Accepted 16 September 2009)

Address corresponding: S. Kyuwa, Department of Biomedical Science, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

ly related to human norovirus, a member of the *Caliciviridae* family of positive-strand RNA viruses. In addition to MNV-1, several MNV strains have been isolated from laboratory mice [6, 10, 20]. Generally, MNV infection does not show any clinical symptoms in immunocompetent mice [23], except for occasional association with histopathological changes in the intestine and the spleen [14]. On the other hand, it sometimes induces noticeable symptoms such as diarrhea in immunodeficient mice, such as OTI/Rag1^{-/-}IFN- γ ^{-/-} and β_2 M^{-/-} mice [20]. Persistent MNV infection has been reported in not only immunodeficient but also immunocompetent mice [4, 6, 14]. However, viral persistence is a viral strain-dependent phenomenon, since Karst *et al.* demonstrated that viral RNA was no longer present in visceral and mucosal tissues collected from immunocompetent mice 3 days after oral infection with MNV-1 [9]. Although MNV exhibits biological diversity as stated above, it has been found to comprise a single genogroup as well as a single serotype [20].

A recent study of a large number of mouse serum samples from research colonies in the United States and Canada identified MNV-1 reactive antibodies in 22.1% of serum samples [7]. In addition, the results of a serological survey that evaluated the contemporary prevalence of MNV in laboratory mice in Western Europe indicated that MNV is the most prevalent viral pathogen [13]. Although Goto *et al.* recently demonstrated MNV prevalence in Japan by RT-PCR [4], there is no information available on the MNV prevalence in laboratory mouse colonies in Japan based on serology.

In this study, an indirect immunofluorescent antibody (IFA) assay and an ELISA system were developed using MNV-S7, a new MNV strain that was isolated in Japan. The results suggest that MNV infection is more prevalent than mouse hepatitis virus (MHV) and *Mycoplasma pulmonis* (*M. pulmonis*) infections in conventional mouse colonies in Japan, as is the case in other areas of the world [13, 15].

Materials and Methods

Mice and sera

Female, 6-week-old specific pathogen-free C57BL/6J (B6), BALB/cAJcl, C3H/HeJJcl, DBA/2JJcl, and Jcl:ICR

mice were purchased from CLEA Japan, Inc. (Tokyo, Japan). The breeding colonies except for Jcl:ICR were free of MNV when examined by RT-PCR (Dr. Goto, personal communication).

Two experimental MNV-S7 infections of mice were carried out. The first one was a time course study using B6 mice. The second one was a strain difference study using five strains of mice. Mice were orally inoculated with 0.1 ml of 5×10^5 TCID₅₀ of MNV-S7 on the day when they arrived at our laboratory. They were housed in isolation racks in a room maintained at a temperature of 23°C on a 12:12-h light-dark cycle, and were fed on commercial pellet CRF-1 (Oriental Yeast Co., Ltd., Tokyo, Japan) and tap water *ad libitum*. After being anesthetized with isoflurane, blood was collected from naive and MNV-S7-infected mice by cardiac puncture. Sera were collected and stored at -80°C until use. In the time course study, 4, 3, 3, 4, 4, and 2 B6 mice were sacrificed at 1, 2, 3, 4, 5, and 6 weeks after infection, respectively. Five naive B6 mice were used as negative controls. In the strain difference study, four each of B6, BALB/cAJcl, C3H/HeJJcl, DBA/2JJcl, and Jcl:ICR mice were sacrificed at 4 weeks after infection. Five or four naive mice of each mouse strain were used as negative controls. The animal experiments were approved by the institutional animal care and use committee of the University of Tokyo and carried out in accordance with the guidelines for animal experimentation of the University of Tokyo, Japan.

Sera from mice bred in conventional animal facilities were obtained from several universities and research institutions in Japan. Antibodies to MHV and *M. pulmonis* were examined by the use of MONILISA kits (Wakamoto Pharmaceutical, Tokyo, Japan) in accordance with the manufacturer's instructions.

Virus and cells

MNV-S7, which was recently isolated from a conventional mouse in Japan (Genbank accession no. AB435515), was used. RAW 264, a macrophage-like tumor cell line was obtained from the RIKEN BioResource Center Cell Bank (Tsukuba, Japan) and cultured in Dulbecco's modified essential medium (DMEM) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS), 0.1 mM non-essential amino acids, and antibiotics (100 units/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin). The virus was

propagated and titrated in RAW 264 cells using a conventional 50% tissue culture infectious dose (TCID₅₀) assay. Briefly, viral suspensions were five-fold serially diluted (5^{-1} to 5^{-10}) in 100 μ l of DMEM medium to inoculate eight wells per dilution in 96-well plates, and a suspension of RAW 264 cells was added to each well (total volume of 200 μ l/well). The cultures were maintained at 37°C, 5% CO₂, and after 2 days, the cytopathic effect was manually recorded. TCID₅₀/ml values were calculated according to the Reed and Muench method [16], where the tissue culture infectious dose is the virus dilution at which 50% of the wells contained infected cells. The results are presented as the $-\log$ mean of 4 replicates for each measured virus concentration.

Indirect immunofluorescent antibody (IFA) assay

RAW 264 cells were cultured in chamber slides (Nalge Nunc International, Rochester, New York) and inoculated with MNV-S7 at a multiplicity of infection (MOI) of 0.1. Eighteen to 20 h later, the infected cells were fixed in 4% paraformaldehyde and 8% sucrose in PBS for 20 min and permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 10 min at room temperature. The cells were treated with 5% bovine serum albumin (BSA) in PBS for 30 min at room temperature and incubated with diluted mouse serum in PBS containing 1% BSA for 1 h at room temperature. After being washed three times, the cells were incubated with Alexa Fluor 488-conjugated anti-mouse IgG (H and L chain)(Molecular Probes, Eugene, Oregon) diluted to 1:500 in PBS for 1 h at room temperature. The samples were then analyzed using a confocal laser-scanning microscope (LSM510 Version 2.02; Carl Zeiss, Jena, Germany).

Preparation of MNV-S7 antigen for ELISA

RAW 264 cells were inoculated with MNV-S7 at an MOI of 0.1 and then cultured in DMEM supplemented with 10% FCS in 150 mm dishes for 40–48 h. The culture supernatant was collected and centrifuged at 2,000 rpm (800 \times g) for 10 min at 4°C to remove cellular debris. The resultant supernatant was collected and the viral titer was determined. One hundred and eighty milliliters of the supernatant that showed $10^{5.83}$ TCID₅₀/0.1 ml were centrifuged at 25,000 rpm (105,000 \times g) for 90 min in an SRP-28SA rotor (Hitachi Koki, Tokyo, Japan). The re-

sultant pellets were resuspended in TN buffer (0.01 M Tris-HCl and 0.1 M NaCl, pH 8.0) and then layered on top of a 1-ml 30% sucrose cushion and centrifuged at 25,000 rpm for 90 min in the SRP-28SA rotor. The viral pellets were dissolved with 1.8 ml TN buffer containing 0.1% sodium dodecyl sulfate. After incubation at room temperature for 10 min, the suspension was centrifuged at 1,000 \times g for 15 min at 4°C. The supernatant ($10^{6.61}$ TCID₅₀/0.1 ml) was collected, divided into samples, and stored at -80°C until use. These procedures succeeded in achieving a concentration that was approximately 30 times higher than that estimated from the infectious viral titers. Purified virus was treated with 0.1% formalin for a week at room temperature, dialyzed against PBS at 4°C, and used as a viral antigen for ELISA. To examine the presence of infectious virus in the antigen, the antigen was filtrated with a 0.45- μ m membrane filter and inoculated into RAW 264 cells, and the cytopathic effect was monitored. To further confirm the absence of infectious virus in the antigen, supernatant collected from RAW 264 cells that had been blindly passaged three times with the antigen was examined using the IFA assay.

ELISA

Aliquots (100 μ l) of the MNV-S7 antigen diluted 1:100 in carbonate coating buffer (0.032 M Na₂CO₃, 0.068 M NaHCO₃, pH 9.6) were added to each well of a 96-well plate (Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Denmark) and allowed to incubate at 4°C overnight. After being washed three times with Tris-buffered saline (TBS) containing 2% Tween 20, the wells were incubated with carbonate coating buffer containing 5% skimmed milk (blocking buffer) at room temperature for 1 h. After being washed three times, 50 μ l of mouse sera diluted with blocking buffer was added to each well and incubated at 37°C for 1 h. After being washed three times, horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse IgG (γ chain) antibody (ZYMED, San Francisco, California) diluted 1:2,000 in PBS was added to each well and incubated at 37°C for 1 h. After being washed four times, 100 μ l of SureBlue™ TMB substrate (KPL, Gaithersburg, Maryland) was added and incubated at room temperature for 10 min. The reaction was stopped by adding 100 μ l of 1 M H₂SO₄, and the OD₄₅₀ was determined with a Wallac 1420 ARVOsx plate reader

(PerkinElmer, Waltham, Massachusetts). To inhibit contamination by liquid waste from the ELISA system, we autoclaved all the liquid waste and the ELISA plates.

Statistics

Statistical analysis was performed using Student's *t*-test and the chi-square test, with $P < 0.05$ considered significant.

Results

IFA assay to detect the anti-MNV-S7 antibody in mice

Five, naive B6 mice were sacrificed, and their sera were used as a negative control. Twenty B6 mice were orally inoculated with 5×10^5 TCID₅₀ of MNV-S7, and 2 to 4 mice were sacrificed each week for sera collection. The sera of uninfected and infected mice were used in the IFA assay to detect anti-MNV-S7 antibody. The sera of the naive B6 mice did not show immunofluorescence after incubation with MNV-S7-infected RAW 264 cells. On the other hand, the sera obtained from MNV-infected mice fluoresced vigorously, and the antibody titers increased with time (Fig. 1). It is worth noting that the mouse sera obtained at 1 week postinfection showed a relatively high antibody titer in the IFA assay. As shown in Fig. 2, we found immunofluorescence in the cytoplasm of MNV-infected RAW 264 cells.

Establishment of ELISA to detect the anti-MNV-S7 antibody in mice

Before establishing the ELISA system, we examined the presence of infectious virus in purified MNV-S7 antigen. RAW 264 cells that had been inoculated with the antigen did not show a cytopathic effect, suggesting the absence of infectious virus in the antigen. To confirm the absence of infectious virus in the antigen, supernatant collected from RAW 264 cells that had been blindly passaged three times with the antigen was examined using the IFA assay. Unexpectedly, we found weak immunofluorescence in the cytoplasm of the inoculated RAW 264 cells, suggesting that a small amount of infectious virus still remained in the antigen. To inhibit contamination from our ELISA system, we decided to autoclave all the liquid waste and the ELISA plates.

To construct an ELISA system for detecting the anti-

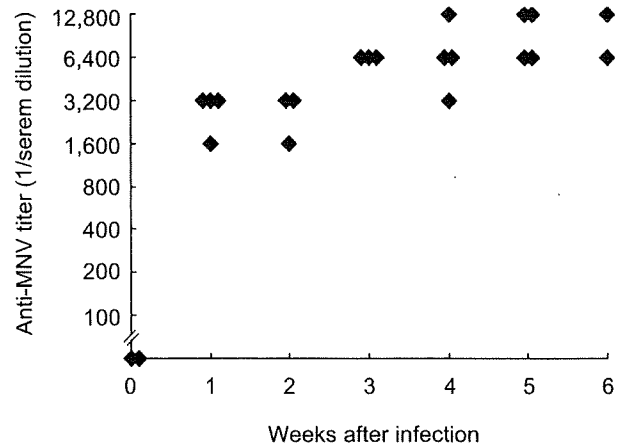


Fig. 1. IFA reactivity of sera from naive and experimentally MNV-S7-infected B6 mice. Three to five mice were sacrificed each week, and antibody to MNV-S7 was examined by IFA.

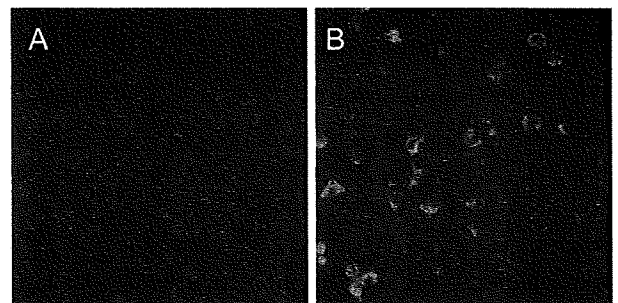


Fig. 2. Photographs of the IFA assay. RAW 264 cells infected with MNV-S7 were incubated with the sera of naive (A) and experimentally MNV-S7-infected B6 mice (B) and were then treated as described in Materials and Methods.

MNV antibody in mice, we carried out a box titration. Purified MNV-S7 antigen was serially diluted and added to the wells of a 96-well plate for adsorption, then a B6 mouse serum obtained at 6 weeks postinfection (IFA titer 1:12,800) was also serially diluted and added to the wells, and enzymatic action was developed according to the procedure described in Materials and Methods (Fig. 3). The OD_{450nm} value generally decreased along with serum dilution, and the OD_{450nm} value induced by the antigen diluted to 1:50 was lower than that calculated for the antigen diluted to 1:100. The highest OD_{450nm} value was observed when the MNV-S7 antigen was diluted to 1:100 and the serum was diluted to 1:100. From these results, we adopted 1:100 diluted MNV-S7 antigen

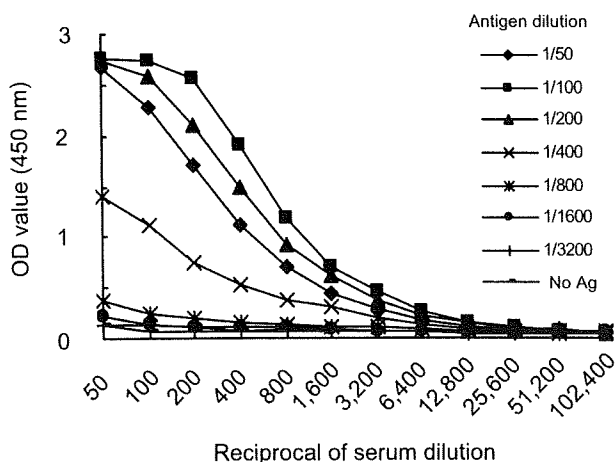


Fig. 3. ELISA reactivity of serially diluted MNV-S7 antigen and an experimentally MNV-S7-infected B6 mouse serum (Box titration).

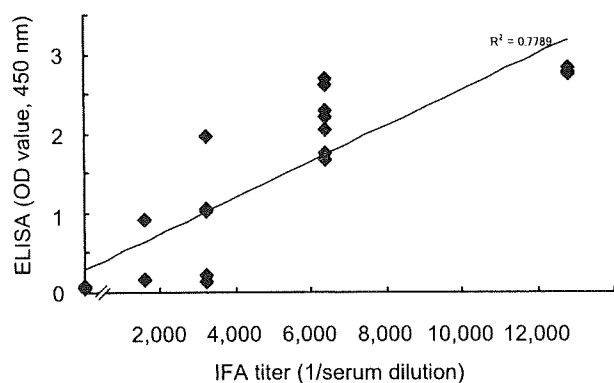


Fig. 5. Comparison of ELISA and IFA results in naive and experimentally MNV-S7-infected C57BL/6JJcl mice. ELISA (OD450 nm) and IFA (1/serum dilution) titers are plotted. ($R^2=0.7789$, $P<0.05$).

and mouse sera diluted to 1:100 for our ELISA system for detecting the antibody to MNV-S7.

Twenty-five B6 mouse sera, whose anti-MNV-S7 antibody titer had been measured by the IFA assay, were assayed using our ELISA system (Fig. 4). The OD_{450nm} values of naive mouse sera were around or less than 0.1. Although the sera obtained at 1 week postinfection showed a weak response, the response was not significantly different from that of the naive mice. A significantly positive response was observed in the sera collected at 2 weeks postinfection or later, and the OD_{450nm} value generally increased with time. The antibody response judged by ELISA was correlated with the titer

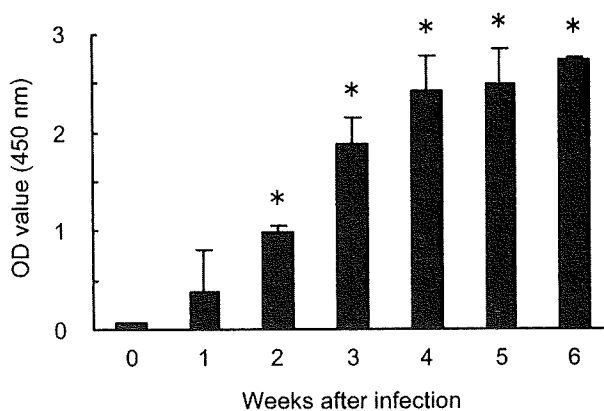


Fig. 4. ELISA reactivity of sera from naive and experimentally MNV-S7-infected B6 mice. Two to five mice were sacrificed each week, and antibody to MNV-S7 was examined by ELISA ($OD_{450 nm}$) (Mean \pm SD). *: significantly different from naive mice ($P<0.05$).

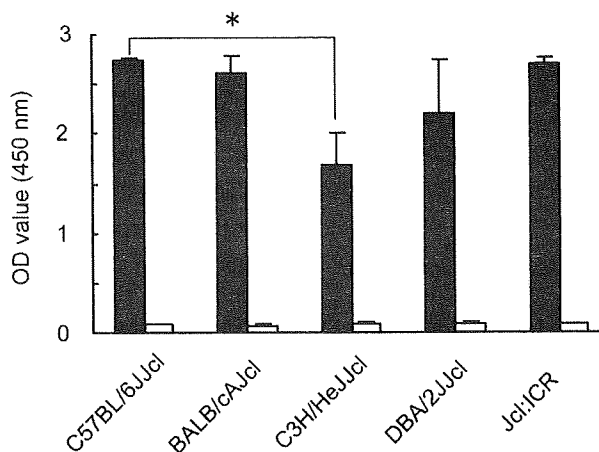


Fig. 6. ELISA reactivity of sera from four inbred strains and ICR mice infected with or without MNV-S7. Sera were obtained from naive BALB/cAJcl, B6, C3H/HeJJcl, DBA/2JJcl, and Jcl:ICR mice and those orally inoculated with MNV-S7 4 weeks earlier and were assayed using the anti-MNV antibody ELISA. Each group consisted of 4 or 5 mice. The grey columns represent infected mice (Mean \pm SD), and the open columns represent naive mice (Mean \pm SD). *: $P<0.05$.

measured by the IFA assay ($R^2=0.7789$, $P<0.05$) (Fig. 5).

To examine whether this ELISA system was useful for other strains of mice, sera from B6, BALB/cAJcl, C3H/HeJJcl, DBA/2JJcl, and Jcl:ICR mice (4 weeks postinfection) with or without MNV-S7 infection were applied to our ELISA system (Fig. 6). Although all the

Table 1. Anti-MNV-S7 ELISA titer in mice bred in conventional animal facilities

Room	OD value (450 nm)			
	0-0.149	0.15-0.499	0.5-0.999	1--
A				8/8 ^{a)}
B				4/4
C	3/3			
D	3/4	1/4		
E	3/3			
F	1/2	1/2		
G		3/3		
H				10/10
I				3/3
J				7/7
K	1/6			5/6
L	8/10	2/10		
M				4/4
N		6/8		2/8
O				2/2

^{a)}No. of samples with indicated OD value/Total sample numbers of each room.

strains of mice tested mounted a significant antibody response during MNV-S7 infection, the OD_{450nm} value of the C3H/HeJcl mice was significantly lower than that of the B6 mice. It is worth noting that no nonspecific responses were induced in uninfected mouse sera.

Antibodies to MNV-S7 in mice bred in conventional animal facilities in Japan

Seventy-seven mouse sera from 15 conventional animal facilities (A to O) in Japan were obtained and assayed using our ELISA system for detecting anti-MNV-S7 antibody (Table 1). Of the 77 samples tested, the OD_{450nm} values of 19 samples (24.7%) were less than 0.15, those of 13 samples (16.9%) were between 0.15 and 0.5, and those of 45 samples (58.4%) were over 1.0. The OD_{450nm} values of all the mouse sera from two conventional animal facilities (C and E) were less than 0.15. On the other hand, those of mouse sera from seven other conventional animal facilities (A, B, H, I, J, M, and O) were over 1.0. Thirteen mouse sera that showed a weak response in ELISA (0.15-0.499) were further tested using the IFA assay. While eight sera diluted to 1:50 were found to be negative for MNV by IFA, five mouse sera diluted to 1:50 were shown to be weakly positive (data not shown). A cutoff value of 0.3 OD_{450nm} was tentatively set for the ELISA, which minimized the

Table 2. Summary of anti-MNV, anti-MHV, and anti-*M. pulmonis* antibodies in murine serum samples from conventional animal facilities in Japan

Animal facilities	Antibodies to		
	MNV	MHV	<i>M. pulmonis</i>
A	8/8 (100%) ^{a)}	8/8 (100%)	8/8 (100%)
B	4/4 (100%)	4/4 (100%)	0/4 (0%)
C	0/3 (0%)	0/3 (0%)	0/3 (0%)
D	0/4 (0%)	0/4 (0%)	0/4 (0%)
E	0/3 (0%)	0/3 (0%)	0/3 (0%)
F	0/2 (0%)	2/2 (100%)	0/2 (0%)
G	0/3 (0%)	0/3 (0%)	0/3 (0%)
H	10/10 (100%)	10/10 (100%)	10/10 (100%)
I	3/3 (100%)	0/3 (0%)	0/3 (0%)
J	7/7 (100%)	7/7 (100%)	0/7 (0%)
K	5/6 (83.3%)	0/6 (0%)	0/6 (0%)
L	0/10 (0%)	0/10 (0%)	0/10 (0%)
M	4/4 (100%)	4/4 (100%)	4/4 (100%)
N	2/8 (25%)	2/8 (25%)	2/8 (25%)
O	2/2 (100%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)
Total	45/77 (58.4%)	37/77 (48.1%)	24/77 (31.2%)

^{a)}No. of positive samples/No. of total samples (%).

inconsistency between the results of the IFA assay and those of ELISA. With this benchmark, 1 week postinfection results gave an inconsistent assessment between the IFA assay and ELISA for three B6 sera from 67 sera (including negative controls) with experimental MNV-S7 infection in this study (Fig. 5).

In addition to antibody to MNV, the mouse serum samples were examined for antibodies to MHV and *M. pulmonis* using a commercial ELISA kit. As shown in Table 2, MNV was most prevalent (58.4%) among these three murine pathogens. It is worth noting that sera from some animal facilities (I, K, and O) were positive only for MNV.

Discussion

In the present study, we developed serological assay systems (ELISA and IFA) for MNV infection in mice using MNV-S7, which was isolated in Japan, and applied them to murine sera from conventional animal facilities in Japan. Serological tests are the most common methodology used in viral surveillance of laboratory mouse colonies. They include the complement fixation test, hemagglutination inhibition test, neutralization test,

ELISA, and IFA. The last two methods are inexpensive, rapid, sensitive, and specific, and therefore, are used widely all over the world [2, 3, 18, 19]. Since ELISA systems performed in a 96-well plate format are suitable for handling large numbers of samples, they are frequently used in screening tests. Samples that are shown to be positive in ELISA tests usually undergo an IFA test to confirm the results. Some ELISA kits for detecting antibodies to rodent viruses are commercially available and are used in in-house examinations. In the present study, we used a commercially available kit to examine antibodies to MHV and *M. pulmonis*. Moreover, viral antibody responses are detected for prolonged periods even in the recovery stage after acute infection. Therefore, serological examination allows us to retrospectively check the microbiological status of laboratory mouse colonies. These merits of serological tests have made them the standard diagnostic measures for viral infections in laboratory mice, even though molecular detection techniques have been developed for most viral infections [4, 21]. An important caveat is that serology is invalid for mice that have just been infected and immunodeficient mice, which cannot produce immunoglobulins. In these cases, a molecular detection technique such as PCR/RT-PCR is efficacious. A microsphere-based, multiplexed fluorescent immunoassay has been recently developed as a high-throughput, automated screening test to complement traditional ELISA in laboratory animal medicine [7, 15].

The antibody response judged by ELISA was correlated with the titer measured by the IFA assay during acute MNV-S7 infection. However, we found a minor inconsistency. Three of four B6 sera at 1 week postinfection were judged negative at a cutoff value of 0.3 by ELISA, whereas all four sera were judged positive by IFA assay. Although the cutoff value was tentatively set at 0.3 to minimize the inconsistency between the results of the IFA assay and those of ELISA for sera from conventional animal facilities, a lower cutoff value might be suitable when ELISA is used for screening. Serum samples showing an OD value above 0.121 (Mean + 3 SD in negative controls) by ELISA should be examined by IFA assay, and a few weeks later serum samples obtained from the same mouse colony should be checked again.

In this study, we demonstrated that the prevalence of MNV was higher than those of MHV and *M. pulmonis*, which was consistent with serological survey data that indicates that MNV is the most prevalent viral pathogen in contemporary mouse colonies [13, 15]. We found that some serum samples were negative for antibodies to MHV and *M. pulmonis* but positive for antibody to MNV-S7. Therefore, we should not suppose that mice negative for antibodies to MHV, Sendai virus, and *M. pulmonis*, which are commonly examined in serological tests in Japan, are also clear of MNV.

We were surprised at the high prevalence rate of MNV infection found in this study, which we partly attribute to the limited number of samples. Judging from the data concerning MHV and *M. pulmonis* infection, the sera used in this study may have included sera from mice bred under substandard microbiological controls. Recently, Goto *et al.* reported the epidemiology of MNV infection in laboratory mice in Japan using RT-PCR [4]. They detected the MNV gene from 33/245 (13.1%) cecal samples derived from 15/59 (25.4%) facilities. The samples used in the two studies were different, and the detection methods were also different: RT-PCR detects viral RNA, whereas ELISA measures specific antibodies produced *in vivo*. Since some MNV strains may induce an antibody response without viral RNA persistence in mice, as MNV-1 does even though the precise mechanism remains unknown [9], it is possible that the MNV prevalence assessed by serological tests is higher than that estimated by RT-PCR.

Noroviruses have been shown to be relatively resistant to physical and chemical inactivation [5]. In this study, purified MNV-S7 was treated with 0.1% formalin for a week at room temperature and then used as an antigen for coating ELISA plates. Contrary to our expectation, a small amount of infectious virus still remained in the antigen. To inhibit contamination from our ELISA system, we autoclaved all the liquid waste and the ELISA plates. It need scarcely be said that the data were not corrupted by the presence of infectious virus in the MNV antigen. However, the use of completely inactivated virus or a recombinant protein [19] that lacks a contamination risk may be preferable.

Several studies have indicated that resistance against viral infections is dependent on mouse strain [1, 8, 9, 11,

17]. Namely, numerous host factors, both major histocompatibility complex (MHC)-dependent and MHC-independent, account for viral resistance. In this study, we demonstrated that the antibody level of C3H/HeJJcl mice was significantly lower than that of C57BL/6JJcl mice. To investigate the cause of the difference, we will compare MNV-S7 replication in these strains of mice as antibody production is influenced by the dose of antigen loaded *in vivo*. Further studies may reveal factors that affect the replication of MNV.

Periodic health screening of laboratory rodents is necessary due to the adverse effect of infectious diseases on biomedical research. However, the influence of MNV infection on animal research remains obscure. Most reports have stated that MNV infection in immunocompetent mice was asymptomatic [4, 6, 9, 23]. In this study, we also observed C57BL/6 mice inoculated with MNV-S7, and they did not show any clinical signs (data not shown). However, it has been recently shown that concurrent MNV infection accelerates the progression of *Helicobacter bilis*-induced inflammatory bowel disease in *Mdr1a*^{-/-} mice [12]. Since MNV infects dendritic cells and macrophages [22], it is likely that MNV induces immune system disorders. Further study is needed to understand the influence of MNV infection on animal research.

Acknowledgments

We thank Prof. H. Akashi of the Department of Veterinary Microbiology and members of the Department of Biomedical Science for their helpful discussions.

References

1. Brown, M.G., Dokun, A.O., Heusel, J.W., Smith, H.R., Beckman, D.L., Blattenberger, E.A., Dubbelde, C.E., Stone, L.R., Scalzo, A.A., and Yokoyama, W.M. 2001. Vital involvement of a natural killer cell activation receptor in resistance to viral infection. *Science* 292: 934–937.
2. Ferner, W.T., Miskuff, R.L., Yolken, R.H., and Vonderfecht, S.L. 1987. Comparison of methods for detection of serum antibody to murine rotavirus. *J. Clin. Microbiol.* 25: 1364–1369.
3. Goto, K., Hayashimoto, N., Ishida, T., Takakura, A., and Kagiya, N. 2009. First trial in the developmental phase of the “Performance evaluation program” based on the ICLAS animal quality network program: self-assessment of microbiological monitoring methods using test samples supplied by ICLAS. *Exp. Anim.* 58: 47–52.
4. Goto, K., Hayashimoto, N., Yasuda, M., Ishida, T., Kameda, S., Takakura, A., and Itoh, T. 2009. Molecular detection of murine norovirus from experimentally and spontaneously infected mice. *Exp. Anim.* 58: 135–140.
5. Henderson, K.S. 2008. Murine norovirus, a recently discovered and highly prevalent viral agent of mice. *Lab. Anim. (NY)* 37: 314–320.
6. Hsu, C.C., Riley, L.K., Wills, H.M., and Livingston, R.S. 2006. Persistent infection with and serologic cross-reactivity of three novel murine norovirus. *Comp. Med.* 56: 247–251.
7. Hsu, C.C., Wobus, C.E., Steffen, K., Riley, L.K., and Livingston, R.S. 2005. Development of a microsphere-based serologic multiplexed fluorescent immunoassay and reverse transcriptase PCR assay to detect murine norovirus 1 infection in mice. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 12: 1145–1151.
8. Itoh, T., Saitoh, M., and Iwai, H. 1989. Comparison of lung virus titers in susceptible and resistant inbred mouse strains against Sendai virus infection. *Jikken Dobutsu* 38: 269–273.
9. Karst, S.M., Wobus, C.E., Lay, M., Davidson, J., and Virgin, H.W. 2003. STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus. *Science* 299: 1575–1578.
10. Kelmenson, J.A., Pomerleau, D.P., Griffey, S., Zhang, W., Karolak, M.J., and Fahey, J.R. 2009. Kinetics of transmission, infectivity, and genome stability of two novel murine norovirus isolates in breeding mice. *Comp. Med.* 59: 27–36.
11. Kyuwa, S., Shibata, S., Tagawa, Y., Iwakura, Y., Machii, K., and Urano, T. 2002. Acute hepatic failure in IFN-gamma-deficient BALB/c mice after murine coronavirus infection. *Virus Res.* 83: 169–177.
12. Lencioni, K.C., Seamons, A., Treuting, P.M., Maggio-Price, L., and Brabb, T. 2008. Murine norovirus: an intercurrent variable in a mouse model of bacteria-induced inflammatory bowel disease. *Comp. Med.* 58: 522–533.
13. Mäler, M. and Köhl, W. 2009. A serological survey to evaluate contemporary prevalence of viral agents and *Mycoplasma pulmonis* in laboratory mice and rats in western Europe. *Lab. Anim. (NY)* 38: 161–165.
14. Mumphy, S.M., Changotra, H., Moore, T.N., Heimann-Nichols, E.R., Wobus, C.E., Reilly, M.J., Moghadamfalahi, M., Shukla, D., and Karst, S.M. 2007. Murine norovirus 1 infection is associated with histopathological changes in immunocompetent hosts, but clinical disease is prevented by STAT1-dependent interferon responses. *J. Virol.* 81: 3251–3263.
15. Pritchett-Corning, K.R., Cosentino, J., and Clifford, C.B. 2009. Contemporary prevalence of infectious agents in laboratory mice and rats. *Lab. Anim.* 43: 165–173.
16. Reed, L.J. and Muench, H. 1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoint. *Am. J. Hyg.* 27: 493–497.
17. Stohlman, S.A. and Frelinger, J.A. 1978. Resistance to fatal central nervous system disease by mouse hepatitis virus,

- strain JHM. *Immunogenetics* 6: 277–281.
18. Takahashi, Y., Okuno, Y., Yamanouchi, T., Takada, N., and Yamanishi, K. 1986. Comparison of immunofluorescence and hemagglutination inhibition tests and enzyme-linked immunosorbent assay for detection of serum antibody in rats infected with hemorrhagic fever with renal syndrome virus. *J. Clin. Microbiol.* 24: 712–715.
 19. Takimoto, K., Taharaguchi, M., Morikawa, S., Ike, F., and Yamada, Y.K. 2008. Detection of the antibody to lymphocytic choriomeningitis virus in sera of laboratory rodents infected with viruses of laboratory and newly isolated strains by ELISA using purified recombinant nucleoprotein. *Exp. Anim.* 57: 357–365.
 20. Thackray, L.B., Wobus, C.E., Chachu, K.A., Liu, B., Alegre, E.R., Henderson, K.S., Kelley, S.T., and Virgin, H.W. 2007. Murine noroviruses comprising a single genogroup exhibit biological diversity despite limited sequence divergence. *J. Virol.* 81: 10460–10473.
 21. Yamada, Y.K., Yabe, M., Takimoto, K., Nakayama, K., and Saitoh, M. 1998. Application of nested polymerase chain reaction to detection of mouse hepatitis virus in fecal specimens during a natural outbreak in an immunodeficient mouse colony. *Exp. Anim.* 47: 261–264.
 22. Wobus, C.E., Karst, S.M., Thackray, L.B., Chang, K.O., Sosnovtsev, S.V., Belliot, G., Krug, A., Mackenzie, J.M., Green, K.Y., and Virgin, H.W. 2004. Replication of norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages. *PLoS Biol.* 2: e432.
 23. Wobus, C.E., Thackray, L.B., and Virgin, H.W. 2006. Murine norovirus: a model system to study norovirus biology and pathogenesis. *J. Virol.* 80: 5104–5112.

動物由来感染症対策, リスクプロファイルと 国際野生動物疾病届出制

吉川泰弘*¹ 太田周司*² 吉崎理華*³

はじめに

我が国で感染症法が制定されてから約10年が経過した。新しい法律には人・人感染症以外に動物由来感染症が初めて組み込まれ、サル類を対象とした法定検疫が開始された。5年後の法改正の際に、ワーキンググループ(WG)により初めて動物由来感染症の半定量的なリスク評価が行われ、輸入動物を対象にリスク評価に対応した管理措置をとることになった。ハイリスクの動物などが輸入禁止となり、またリスクに応じて検疫・係留措置の必要な動物、その他の輸入動物一般の届出制度が導入された。輸入動物届出制により、哺乳類の輸入数は半減し、鳥類は1/5～1/6に減少した。また、どちらも90%以上が繁殖動物となり、野生動物のペットとしての輸入による感染症の侵入リスクは基本的に回避できたと考えている。

その後、厚労省の研究班では動物由来感染症の一貫性のあるリスク評価を行うため、リスクプロファイリングを行った。病原体保有動物のカテゴリー、動物から人への感染経路、病原体保有動物に暴露される可能性のある人のカテゴリー分類を行い、患者数(年間)を算出した。これに流行の頻度、人-人感染の有無、致死率の高低、予防法の有無、生前診断法の有無、有効な治療法の有無等を加味して総合評価を行った。評価点の高い疾患には家畜を含めて、獣医師の届出義務を伴う疾患が多い。専門家によるリスクプロファイルの検証を受けたうえで、プライオリティーをつけ、

リスクの高い感染症から新たな対応措置を考える必要がある。

他方、国際動物保健機関(国際獣疫事務局:OIE)が、最近、国際的な野生動物疾病届出制度を導入した。これは野生動物の疾病が野生動物集団それ自身に対する脅威であることに加えて、家畜と人の健康にも影響を及ぼすからである。OIEが世界保健機関(WHO)と協力して、人に来る前の動物由来感染症を把握しようという戦略、国連食糧農業機関(FAO)と協力して家畜感染症の統御および食品の安全性を確保しようという戦略である。また、このほかに重要な戦略として地球環境の変化の指標、生物多様性の確保、生態系の保全が人の健康に重要であるという戦略から、野生動物そのものの疾病も新しく届出制度に組み込んだ。以下に動物由来感染症の対策のこれまでの10年とこれからの10年を考えてみたい。

新感染症法と動物由来感染症

国際的には世界を震撼させた感染症としてエボラ出血熱、マールブルグ病、ニパウイルス感染症、ヘンドラウイルス感染症、SARS(重症急性呼吸器症候群)、西ナイル熱のように野生動物を媒介するもの、あるいは、O157腸管出血性大腸菌感染症、BSE(牛海綿状脳症)、高病原性鳥インフルエンザのように家畜や食品に由来するもの、デング熱やデング出血熱、マラリアのように節足動物を媒介するものがある。いずれも熱帯雨林の開発、急激なインフラの伴わない都市化、環境汚染と地球温暖化、物品・人の急速な移動・貿易拡大、工場型家畜飼育、ペットや生活スタイルの変化等が複雑にかかっているとされる。20世紀後半に出現した新興感染症の約3分の2は動物由来感染症である。さらに、家畜に由来する感染症は日常的に食品を介して人に感染する可能性があることから(サルモネラ中毒、バンコマイシン耐性腸球菌感染症、E型肝炎、O

*¹Yasuhiro YOSHIKAWA
東京大学大学院農学生命科学研究科
〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

*²Shuji OTA
東京検疫所川崎支所

*³Rika YOSHIKAWA
株式会社東レリサーチセンター

157, BSE など), 食の安全性の点でも不断の監視が重要である。

他方, わが国では戦後の高度経済成長後, 社会体制や価値観の急激な変化により核家族化, 少子化が進み, ペット動物が伴侶動物として人の代替の役を果たすようになった。さらにバブル経済期を経て, 従来のペット動物種とは異なるエキゾチックアニマルの輸入が非常に盛んになった。少子高齢化の速度は先進国の中でも群を抜いており, また野生動物輸入の多さでも群を抜いていた。こうした事態にリスク管理の担い手である行政が対応しきれず, リスクは指摘されているが法整備が伴わない状況が続いてきた。そして, 感染症法の改正(平成10年)に伴い, それまで100年間に及んで「伝染病は人から人への感染症を言う」という考え方から, 「動物に由来する感染症を対象に加える」ことになり, リスク管理対応が大きく変わったことになった。

このように感染症法の制定(平成11年施行)にあたって動物由来感染症が取り上げられ, サル類のエボラ出血熱・マールブルグ病が検疫対象となり, わが国で初めて感染症法による動物の法定検疫が実施されるようになった。また, 同時に狂犬病予防法の対象動物の拡大(犬の他に猫, スカンク, アライグマ, キツネ)により, これらの動物もまた, 法定検疫されることとなった。しかし, この時には, これ以外の感染症, 動物種に関しては規制対象とされなかった(平成15年3月ベストを媒介する危険のある動物としてプレーリードッグの輸入禁止措置が取られた)。動物由来感染症の対策強化は5年後の法律見直しまでの懸案となった。

実際, わが国への動物の輸入は当時(平成12年)の厚生省研究班の調査では年間, 約400万頭が輸入されていた。平成11年度の厚生省研究班が行った輸入動物の使用目的調査では, 全体の88%がペットとして販売することを目的としたものであることが明らかにされた。農水省の動物検疫統計においてはサルで約10%がペットとして輸入されており, 犬, 猫でそれぞれ65%, 80%が, キツネ, スカンクは全頭がペットとして輸入されていることが明らかになった。平成13年の動物種別輸入データでは, 哺乳類は約40の国または地域から119万頭が輸入されており, オランダからの輸入が最も多く, 63%を占めている。次いでチェコ, 米国, 中国の順である。オランダとチェコ

からはハムスターが, 米国からはフェレット, プレーリードッグが, 中国からはリスが多く輸入されていた。げっ歯目の輸入頭数は, ハムスター(約100万頭), リス(6万7千頭), プレーリードッグ(1万3千頭)の順となっている。また検疫の対象にされているサル, 犬, 猫, アライグマ, キツネ, スカンクの輸入頭数が集計されている。サルは, アジア, 南米およびアフリカの6か国から6千頭前後が輸入されており, 犬は1万2千頭が, 猫は2千頭が輸入されている。キツネ, スカンクは米国から数十頭が輸入されていた。かつて8千頭近く輸入されていたアライグマは法定検疫が開始されたためゼロであった。フェレットは3万1千頭が輸入されていた。

厚生省動物由来感染症委員会WGによる 輸入動物のリスク評価と管理対応

感染症のリスクはダイナミックに変動するものである。また感染症ごとにリスクの高さにも差がある。こうしたリスクの違いに応じた管理を行うにはリスクレベルに対応する管理をとる必要があり, そのためには定量的なリスク評価が前提となる。感染症法の5年後見直しにあたっては, 動物由来感染症に関する国際的な発生情報の収集, 輸入動物の実態, 疾病の重要度評価などのデータを入手し, 厚生省の動物由来感染症委員会ワーキンググループ(WG)で, 初めてリスク評価を行った。

リスク評価の手順は危害の同定として感染症法1~4類に含まれる動物由来感染症および前回WGが行った動物種別感染症重要度分類を対象に評価した。これに, 導入リスクとして動物輸出国の当該疾病発生状況をOIE, WHO, GIDEON(イスラエルのGIDEON Informatics, Inc.が提供する世界の感染症データベース)などが公表している国別, 地域別データベースに基づき, 過去5~10年間を検索し, 「清浄国(地域)」から「高度汚染国」まで5段階に分類した。当該疾病を媒介する可能性のある動物に関しては, 財務省の貿易税関統計, 農水省統計等をもとに, 「少ない」から「非常に多い」まで4段階に分類した。これを縦横の行列に組み合わせ, リスクレベルを「問題なし」から「非常に危険」まで6段階に分類した。ついで動物由来感染症重要度分類のレベル(レベル1~5)を組み合わせリスクポイントとした。その上で包括的リスク分析として地域・動物種ごとに主な関連疾病の数, リスクの総得点, 平均値をも

とに総合評価を行った。

その結果、翼手目とマストミス（ラッサ熱の自然宿主）は平成 15 年 11 月から全面輸入禁止となった。すでに輸入禁止となっているプレーリードッグ、ハクビシン等、および法定検疫の対象であるサル類と食肉目の動物以外のものに関しては、輸入届出、健康証明書、係留など、リスクレベルに応じた対応をとることになった。すなわち、今回の対策強化は従来のように単純に動物検疫を増加させるものではなく、輸入禁止動物種の追加、係留措置、動物由来感染症の新 4 類への追加、国内動物による特定感染症診断時の獣医師の届出追加（犬のエキノコックス、サル類の赤痢、鳥の西ナイル熱）、サーベイランスシステムを含む侵入動物・国内の野生動物対策の強化、動物由来感染症発生時の動物調査、措置の強化を盛り込んだ。特に輸入動物の届出制度と健康証明書の添付、特定の病原体に関するフリーの証明書添付の要求は、これまで野放しであった輸入野生動物を事実上禁止するものであり、検疫に代わってリスクを回避する有効な措置となった。最も緊急性の高かった、輸入野生動物に由来する感染症対策に関する法は整備されたと言ってよい。

この感染症法の見直しにより導入された輸入動物の届出制度は、輸入動物業者、ペット業者のみならず、動物愛好家や研究者に種々の迷惑をかけることになった。しかし、上述の平成 12 年の輸入実績に比較すると、哺乳類はほぼ 40%に、鳥類は約 17%まで、輸入動物数が減少している。さらに、最も心配された野生動物の輸入はほぼ完全に止ったと思われる（哺乳動物は 99%以上、鳥類は 90%以上が繁殖された動物になった）。このことは、輸出国の順位にも反映されており、中近東、アフリカ、東南アジアなどからの野生動物の輸入がとまったことが明らかになった。法的措置の導入にあたり心配された混乱も最小限度であり、世界に先駆けて人獣共通感染症侵入リスクを回避する実効性のある対応が取れたと評価している。

動物由来感染症の統一的风险プロファイルの作成

感染症法による人での動物由来感染症の届出を見ると、O157 が最も多く、年間 3000～4500 人である。500～1000 人の間は赤痢、アメーバ赤痢であるが、この場合多くは海外などで旅行者が感染してくるケースである。500 人前後はツツガムシ病、100 人程度はマラリア、ジ

アルジア症で、いずれも海外渡航者が現地で感染する例がほとんどである。50 人前後は海外で感染するデング熱、このほか国内で感染を起こすオウム病、日本紅斑熱、クリプトスポリジウム症、E 型肝炎が挙げられる。20 人前後がエキノコックス症、レプトスピラ症である。近年、年間 1 桁の発症例としては Q 熱、ライム病、日本脳炎、ブルセラ症が挙げられる。このようにしてみると、人獣共通感染症でも、食中毒の原因として見られるサルモネラ症、カンピロバクター症（感染症法の届出ではない）、O157 などは発生すると非常に多くの患者を巻き込むことになる。海外で感染を受ける動物由来感染症がこれについて多い傾向がある。国内で感染する届出感染症はツツガムシ病、日本紅斑熱、オウム病を除けば、いずれも年間 50 人以下である。人-人感染症は一度の流行で数万（麻疹、風疹など）から数百万以上（インフルエンザなど）に達することを考えると、日本における動物由来感染症は流行規模としては非常に小さいといえる。もっとも、これは予防対策や規制が取られた後の数字であり、もしリスク回避対策がなされず、野放しであったとすれば別の数字になるであろう。

厚労省の動物由来感染症研究班では 100 を超す動物由来感染症に関して統一的一貫性のあるリスク評価を行うために、個々の感染症についてリスクプロファイルを作成し、評価に基づくプライオリティー化をしようという試みを進めている。具体的には「動物から伝播される感染症の人へのリスクを一貫性をもって評価する」ということを基本的な考え方として取り組んだ。各々の動物由来感染症について下記の 4 つのフェーズから評価を行った。

① 日本に存在するさまざまな動物からさまざまな人に対する総リスク暴露回数の推計、人における感染成立率、発症率から推定される感染可能人数の推計。

② 発生頻度、人での伝播性、重篤性。

③ 診断、予防、治用法の有無といった感染症統御法の有無。

④ ②の推計値に基づくポイント評価と③のポイント評価の組合わせで総合評価を行う。

動物由来感染症に関する基礎データは決して多くないため、より正確なデータが得られた際には、評価を入れ替え得るものであることを前提とした。

動物由来感染症の感染ルートは、侵入門戸と感染経路の組み合わせから、以下の 6 つとした。今回の検討では、水系、

表1 輸入動物のリスク評価方式

疾病頻度と輸入動物量による侵入リスク

感染症の流行程度（地域，国）過去5～10年間の 人での流行人口10万人当たりの報告	輸入動物数			
	> 10 ⁴ 頭	10 ³ ～10 ⁴ 個	10 ² ～10 ³ 個	< 100 個
高汚染国（年間10人以上）or 5年連続発生	非常に危険	非常に危険	危険	中等度
中等度汚染国（年間1～10人）or 5年間で3回以上	非常に危険	危険	中等度	やや少
低汚染国（5年間に流行あり）	危険	中等度	やや少	少ない
汚染国：過去10年以内に発生 or 発生が疑われる	中等度	やや少	少ない	少ない
清浄国：サーベイランスあり（上記以外の国，地域）	問題なし	問題なし	問題なし	問題なし

侵入リスクと感染症重要度によるリスクポイント

侵入リスク	重要度				
	5 ☆	4 ☆	3 ☆	2 ☆	1 ☆
非常に危険	10	9	7	5	3
危険	9	7	5	3	2
中等度	7	5	3	2	1
やや少	5	3	2	1	0
少ない	3	2	1	0	0
問題なし	0	0	0	0	0

地域・国別	霊長類	食肉類 イヌ科ほか	げっ歯類 ネズミ科，リス科ほか	翼手類	鳥類	両生類 爬虫類
アメリカ 北米：カナダ，USA 中米：メキシコ，カリブ諸国 南米：ABC，ペルー，ボリビアほか	中南米サル (4, 22, 5.5)		プレーリードッグ (3, 24, 8) 実験用マウス (0, 0, 0)			
アジア 東アジア：中国，韓国，モンゴル 東南アジア：ベトナム，インドネシアほか	アジアサル (4, 22, 5.5)			コウモリ (4, 26, 6.5)		
アフリカ サハラ以北，中央アフリカ，南アフリカ， マダガスカル，モーリシャス	アフリカザル (6, 26, 4.3)		マストミス (4, 24, 6)	コウモリ (4, 26, 6.5)		
ヨーロッパ 東欧，西欧諸国						

() の中は左より感染症の数 N リスクレポイント総和 S 平均 μ を示す。
アフリカのサル：エボラ7，マールブルグ5，赤痢3，結核3，サル痘3，黄熱5 とすると N = 6, S = 26, $\mu = 4.3$ となる。

土壌からの直接感染，人からの感染ルートは，検討対象とはせず，動物からの感染に着目した。

① 咬傷等，感染源となる動物による咬傷やひっかき（皮膚の損傷を伴う接触）。

② 体液・排泄物接触，感染源となる動物の血液や排泄物への非経口接触。本検討では，糞と尿を区別していない。

③ 体液・排泄物経口，感染源となる動物の血液や排泄物への経口接触。本検討では，糞と尿を区別していない。

④ 空気感染，感染源となる動物からの飛沫やエアロゾル化した体液の吸入。本検討では，飛沫感染と空気感染を含めている。③との区別について厳密な定義はつけていないが，③より機会が多く，かつ1回の暴露量は少ない状況を想定している。

⑤ ベクター，病原体をもつベクター（節足動物など）の刺咬。

⑥ 食品，汚染食品の摂取。

動物由来感染症にかかわる動物のカテゴリーを、日本における人との関わり方の特徴に基づき以下の7つとした。

① 伴侶動物、犬および猫。

② ペット動物、犬、猫以外で、ペットとして飼育されている主な動物。

③ 家畜、基本的には、牛、豚、鶏、馬。

④ 実験動物、齧歯類、鳥類、豚、ウサギ、犬、霊長類。

⑤ 動物園動物。

⑥ 徘徊動物、徘徊犬。

⑦ 野生動物、野山および都市に生息する野生の動物。

また、人のカテゴリーは動物カテゴリーと感染シナリオに応じて、以下のように分類した。

① 伴侶動物・ペットに関係する人カテゴリー：伴侶動物・ペット動物飼育者、獣医師、ペット業者。

② 家畜に関係する人カテゴリー：畜産農家、獣医師。

③ 実験動物に関連するカテゴリー：研究者（研究機関における飼育作業を含む）、動物業者（繁殖業者・輸入業者）。

④ 動物園動物に関連するカテゴリー：動物園飼育担当者、獣医師、一般入園者。

⑤ 徘徊動物に関連するカテゴリー：徘徊動物に遭遇する一般者、獣医師（動物管理センター）。

⑥ 野生動物に関連するカテゴリー：ハンター、野生動物に遭遇する一般者。

⑦ その他：特定の動物あるいは特定の感染経路に特徴的に接触する可能性のある人カテゴリーについては、必要に応じて設定した（例えば、馬に関する競馬関係者、乗馬愛好家、野山に多いベクターに接触する可能性の高いアウトドア愛好家等である）。

動物由来感染症の感染シナリオは、さまざまな着眼点で分類することができるが、本検討では、飼育動物からの感染、野生動物からの感染、ベクターを介した感染、食品を介した感染の4つとした。それぞれのシナリオにおけるリスク接触回数の算出は次のように行った。

① 飼育動物からの感染：人に飼育されており、人と日常的接触がある動物（愛玩動物や産業動物、展示動物、実験動物）の咬傷、体液・排泄物への接触による感染。リスク暴露回数（回/年）＝飼育者人数（人）×動物の感染可能状態率（-）×飼育者1人が1年間に遭遇するリスク接触回数（回/年・人）。

② 野生動物からの感染：狩猟、もしくは、野生動物との遭遇時の咬傷、排泄物への接触による感染。野生動物の生息数（全国合計値）については、特にデータが少ない、あるいは根拠の示されていないデータしか得られなかったため、今回のリスク検討では、接触機会数を仮定して算出した。リスク暴露回数（回/年）＝年間の接触（事故）回数（回/年）×動物の感染可能状態率（-）。

③ ベクターを介した感染：蚊、ノミ、ダニ等のベクターの刺咬による感染。動物からベクターへの病原体移行に関するデータがないため、ベクターからの感染として取り扱った。リスク暴露回数（回/年）＝関連人数（人）×ベクターの感染可能状態率（-）×関連対象者1人が1年間に受けるリスク接触回数（回/年・人）。

④ 食品を介した感染：加熱不十分な汚染動物食品による感染。病原体（細菌類）の摂取リスクは、体液・排泄物を経口で摂取する量の1000倍とした。病原体（寄生虫）の摂取リスクは、体液・排泄物を経口で摂取する量の100倍とした。リスク接触回数（回/年）＝年間の摂取回数（回/年）×汚染率（-）×1000。リスク暴露回数（回/年）＝年間の摂取回数（回/年）×汚染率（-）×100。

日本において成立しうるすべての主要な感染サブシナリオ（感染症の由来となりうる動物カテゴリー、動物種、そしてその動物と接触する人カテゴリー、その感染ルート）を検討し、これを動物由来感染症の感染シナリオとした。できる限りのシナリオを書いておくことは、評価を精密にするとともに、感染症を統御する際の重要管理点を明らかにするのに有用である。

今回の検討では、トップダウン式に仮定した数値を用いることにより、異なるタイプの幅広い動物由来感染症を同じ手法で評価するという初めての試みを行うことができた。本検討を通じて、一貫性評価を行う際の基本ルールや一般化が可能なステップが明らかとなった。一方、数値を仮定するためのデータ探索過程において、伴侶動物や家畜を除く各種動物の生息数に関するデータや動物の感染率、感染成立率や発症率などのデータが非常に少ないことが明らかとなった。今後、本リスクプロファイル手法を改善していくためには、実情に即した数値が必要であり、これまでに地方等で実施された個別の調査データを収集し、検討・統合するという試みや能動的サーベイランスにより得られるデータの検討も必要であると思われる。

リスクプロファイル

1. 感染源となる動物種データ

- 原因となる動物種カテゴリーを決定

当該動物カテゴリー毎の頭数 (AN), 動物カテゴリー毎の当該感染可能性頭数 (IN)

- 動物→人感染: 感染様式 (RI)

経皮, 経口, 接触, 空気感染等: 感染様式による効率係数, 1/10, 1/100, 1/1000 ……

2. 感染源となる動物種に接触する人データ

- 動物に接触する人カテゴリーを決定

当該人カテゴリー内の総人数 (HP)

当該人カテゴリー毎, 接触方法毎の年間暴露回数: 回数 / 年, 人 (OH)

① 当該感染ルート i における年間暴露人数 $RP_i = R_i \times OH_i \times (IN_i / AN_i) \times HP_i$

② すべての感染ルートを合計: $\sum RP_i =$ 感染可能人数 / 年

③ 感染可能人数 ($\sum RP_i$) \times 感染成立率 \times 発症率 = 患者数 / 年

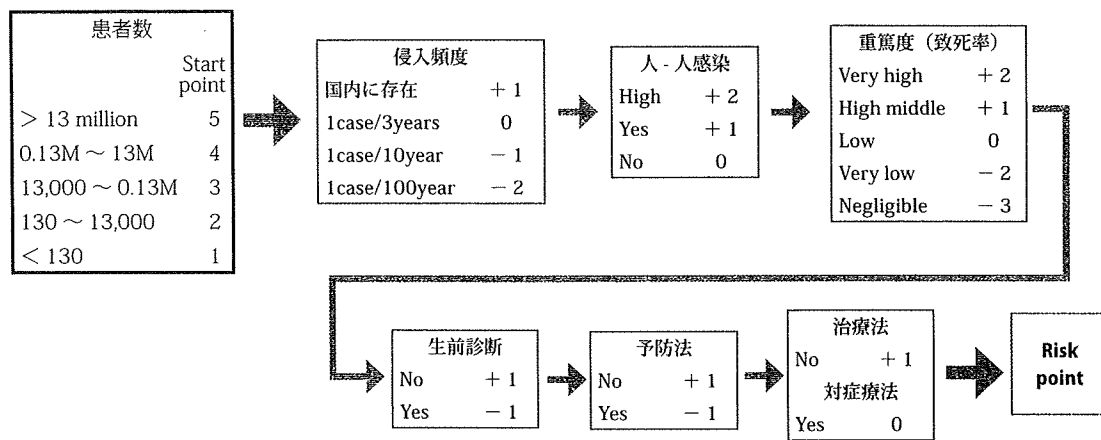


図1 動物由来感染症のリスクプロファイル方式の1例

国際野生動物疾病届出制度

「One World, One Health」という言葉は、野生動物保護協会 (WCS: Wildlife Conservation Society) が商標登録している。動物由来感染症の予防と生態系の保全のために多分野の機関が協力して取り組もうという活動である。FAO, OIE, WHO, 世界銀行 (WB) およびユニセフなどの国際機関が参加している。「人、動物、環境を含めた健康の維持が必要であることと、もはや世界が切り離すことのできない緊密さで繋がっており、1国のミスは世界の危機を招く危険性がある」というコンセプトである。

人獣共通感染症の対策には獣医学と医学の連携が必要である。この点は19世紀に病理学の父 Rudolf Virchow により指摘された。彼は zoonosis (動物に由来する感染症) という言葉を作り出し、獣医学と医学の連携に努力した。

1960年代には獣疫学の創設者、カリフォルニア大学獣医学部の Calvin Schwabe が、獣医学と医学が一緒になって対応する必要性を改めて指摘し、One Medicine という概念を提唱した。2004年マンハッタン原則として野生動物保護協会から、One World, One Health の概念に基づく行動計画が提言された。さらに高病原性鳥インフルエンザウイルスによるパンデミックの危険性の高まりとともに、One World, One Health, One Medicine というキャッチフレーズで獣医学と医学が連携し人獣共通感染症対策をはかる国際的ネットワークの活動につながってきた。

保全医学コンソーシアム (consortium for conservation medicine) は、人間による環境の変化、野生生物の疾病、人獣共通感染症、公衆衛生、生態学および生物多様性などの関係の理解を目的とするコンソーシアムで、米国の大学、研究所の保全医学部門を中心に組織された。代

野生動物疾病届出制度

OIE が野生動物疾病の新しい届出制度を始める (WHO, FAO 共同)



野生動物疾病の統御が OIE (174 か国) の新戦略になった
新しい届出制度に関しては？

事務局長が OIE のホームページのトップページに所信を述べている (2008/07/15)

目的：以下の目的で、国際的な野生動物疾病届出の制度を確立する

1. 人の公衆衛生の立場で zoonosis の統御 (WHO, OIE)
2. 食の安全保障、食の安全のために家畜感染症の統御 (FAO, OIE)
3. 生物多様性とエコシステムの保全のために野生動物の疾病統御 (OIE)

人のため、家畜のため、野生動物のため (One World One Health) !

図2 国際獣疫局 (OIE) への野生動物疾病届出制度

表の Peter Daszak は、中国での SARS の発生とコウモリとの関連を突き止めた研究にも関わっている。人の健康 (human health)、動物の健康 (animal health)、健全な環境 (ecological health) の3つの要素の調和が必須と考える医学である。

Deep ecology は生命平等主義・全体論 (ホーリズム) の世界観・共生概念に基づいて社会の諸制度や個人の世界観、価値観の変革により環境問題を解決しようとする立場で、ノルウェーの哲学者ネス (Arne Naess) が 1970 年代に提唱した概念である。人間中心主義ではなく、人間非中心主義 (non - anthropocentrism, biocentrism) である。生命体や人間を個々ばらばらな存在として捉えるのではなく、「相互連関的・全フィールド」として捉え、「生命圏平等主義・多様性と共生の原理」を採用する。また、新しい生命科学も、そのスタンスが 20 世紀に隆盛を極めた科学のような単純主義や人間中心主義ではなく、生物としての人の意味をもとめ、生命の多様性と共存の哲学を展開する学問であるという期待を担っている。生物学的人のあるべき位置に人間を置き、分析から統合へ、単純系から複雑系への方向転換を模索している。

国際的には人類は 21 世紀に人口増加、食糧・エネルギー不足、環境汚染・地球温暖化などの深刻な課題に直面している。これらの課題に立ち向かうには人および動物の感染症統御、公衆衛生の確立、動物の適正管理と福祉、食の安全と安定供給等が重要である。こうした課題の有効な

解決には国際協調と貿易拡大が必須である。OIE が、最近、国際的な野生動物疾病届出制度を導入した。これは野生動物の疾病が野生動物集団それ自身に対する脅威であることに加えて、家畜と人の健康にも深刻な影響を及ぼすからである。OIE が WHO と協力して、人に来る前の動物由来感染症を把握しようという戦略、OIE が FAO と協力して家畜感染症の統御および食品の安全性を確保しようという戦略である。また、このほかに重要な戦略として地球環境の変化の指標、生物多様性の確保、生態系の保全が人の健康と福祉に重要であるという戦略から、OIE が単独で野生動物のそのものの疾病についても新しく国際届出制度に組み込んだものである。

各国は、その国の首席獣医官 (CVO) が登録された約 100 種類を超える野生動物疾病、家畜感染症、動物由来感染症の野生動物での発生動向を年に 1 回、半期 2 回に分けて OIE にオンラインで報告することが決定された (2009 年総会)。北米の国立野生動物健康管理センターは南米に働きかけて情報を提供するフォーカルポイントの育成のためのワークショップを進めている。欧州はアフリカを巻き込んで疾病情報に関する 1 つの世界構想を推進している。アジアは多くの感染症の発祥地域であるにも関わらず、こうした動きに追随できていない。これからの 10 年は国内のみならず、アジア全体でグローバルに感染症を封じ込めていく道を探らなければならない。

おわりに

感染症法に動物由来感染症が組み込まれてから 10 年が経過し、国内対応の方向性、リスク回避の方法論が確立されつつある。しかし、感染症が容易にグローバル化する現在、1 国のリスク管理だけでは対応できないことも確かである。前述の 2004 年、マンハッタン原則の背景と、結語は以下のように宣言されている。

背景：近年の西ナイル熱、エボラ出血熱、SARS、サル痘、BSE、鳥インフルエンザの流行は人と動物の健康が密接に関連していることを想起させる。人、家畜、野生動物の健康 (one health) を追求する統合的アプローチが必要である。また、種の絶滅、生息域の劣化、汚染、外来種の侵入、温暖化等は地球の原生自然を根本から変えつつある。新興・再興感染症は人 (食糧供給、経済活動) のみならず世界の基底を支える生物多様性においても脅威となる (one world)。21 世紀に感染症を克服するには、より広範な環境の保全と同時に、疾病の予防、サーベイランス、モ

ニタリング、管理の強化と緩和など分野を超え、融合したアプローチが必要である。

結語：今日のグローバル化した世界では、どの学問分野・社会分野も単独で新興・再興感染症の出現を防止するための十分な知識と資源をもっていないことは明らかである。また、どの国も人と動物の健康をむしばむ恐れのある自然生息域の消失と種の絶滅を促進するパターンを元に戻すことは困難である。我々が人・家畜・野生動物の健康と生態系の統合という多くの難しい問題に取り組むための技術革新と専門的知識を得るのは、政府機関・個人・専門家・各部門の壁を乗り越えることでのみ可能となる。

我々は「1つの世界、1つの健康」という時代に生きている。今日の脅威と明日の問題の解決は、昨日までのアプローチでは実現できない。疑いもなく前に横たわる深刻な課題に挑戦するために、我々は適応性のある、前を見据えた、学際的な解決法を考案する必要がある。

これから 10 年の動物由来感染症の統御はこの基本的認識とこの方向性で進むべきであると考えます。

