

incubated at 37°C for 24 h. After incubation, aliquots of the samples were transferred to tetrathionate brilliant green (TBG) broth³ and incubated under 42°C for 24 h.

All of the enriched samples were streaked on xylose-lysine deoxycholate (XLD) agar⁴ plates and incubated at 37°C for 24 h. Expected *Salmonella* colonies appear as pink colonies with black center on XLD media. The suspected colonies were purified, subjected to biochemical tests (triple sugar iron⁵, indole⁶, Methyl-Red⁷, Voges-Proskauer⁷, citrate⁸, urease⁶ and lysine decarboxylase⁶ tests) and confirmed using miniaturized identification kit⁹.

DNA extraction

The DNA extraction was done based on the National Institute of Molecular Biology and Biotechnology (BIOTECH) protocol. Briefly, each 1.5 mL TBG broth was placed in a 1.5 mL microcentrifuge tube and centrifuged at 8,050 x g for 10 s to remove the minced tissues. The supernatant was transferred to fresh microcentrifuge tube and the debris was discarded. The tube was then centrifuged at 8,050 x g for 5 min to collect the cell pellets. The supernatant was removed and the cell pellets were washed with 150 µL HPLC-grade water. The mixture was mixed using vortex mixer and centrifuged for another 5 min. The supernatant was again discarded and the tube was suspended in 45 µL HPLC-grade water and then mixed. Five microliters of 10% sodium dodecyl sulfate (SDS)¹⁰ was added and mixed. The mixture was boiled for 5 min. After boiling, 0.95 mL of HPLC-grade water was added in the mixture and then mixed. Final dilution of the samples was done using HPLC-grade water.

Polymerase chain reaction assay and analysis

PCR detection of *Salmonella* employed a developed kit¹¹ that contained a genus-specific primer, *Sal-05*, with the following nucleotide sequence: 5'-GGCAGGGCTCATTT-TTACG-3'. PCR incubation steps were performed using a thermal cycler¹² with the following settings: initial denaturation at 95°C for 5 min, 30 cycles of denaturation at 94°C for 2 min, annealing at 56°C for 2 min and extension at 72°C for 2 min, followed by final extension by polymerase at 72°C for 10 min, and holding temperature at 8°C.

The PCR products along side with 1kb DNA ladder¹³ and negative and positive control were resolved using 1% Tris-acetate-EDTA (TAE) agarose gel¹³ in an electrophoresis chamber containing 0.5x TAE buffer. The gel was run at 100 V for 30 min until the dye indicator

reached the target lane. At the end of each run, the gel was soaked in ethidium bromide solution for 15 min, washed and viewed under an ultraviolet transilluminator machine¹⁴. The machine was connected to a computer with a software program¹⁵ for the documentation of each run.

RESULTS

The samples obtained from the small intestines of 96 apparently healthy bats were subjected to conventional culture method and PCR detection for *Salmonella* spp. The summary of the species of bats included in the study is shown in Table 1.

A total of 11 species of bats were collected, namely *Miniopterus australis*, *M. schreibersi*, *M. tristis*, *Hipposiderus diadema*, *Myotis macrotarsus*, *Ptenochirus jabori*, *Scotophilus kuhlii*, *Pipistrellus javanicus*, *Cynopterus brachyotis*, *Eonycteris spelaea*, and *Rousettus amplexicaudatus*. These different species are grouped into three families and based on the number of species obtained, the least falls under Rhinolophidae (1/11), followed by Pteropodidae (4/11), while majority were classified under Vespertilionidae (6/11).

Two (2.08%) of the 96 samples subjected to PCR produced the expected 450-bp band for *Salmonella*-positive samples as exhibited in Figure 1. The positive samples came from *Miniopterus australis* and *M. schreibersi*. These chiropterans were both insect-eating adult female bats captured from Pangihan cave of Barangay Pablacion, Malay in Aklan. However, all of the minced small intestine samples of the bats were found negative for *Salmonella* spp. using the conventional isolation method. Suspected colonies from xylose-lysine deoxycholate agar plates were confirmed by biochemical tests (triple sugar iron, indole, methyl-red, Voges-Proskauer, citrate, urease and lysine decarboxylase tests) and further verified by a miniaturized identification kit.

DISCUSSION

A total of 96 apparently healthy bats belonging to three families (Vespertilionidae, Pteropodidae, Rhinolophidae) were collected. Two of the families (Vespertilionidae & Rhinolophidae) were identified as insectivores and one family as frugivores. Based on the number of species obtained, the least falls under Rhinolophidae (1/11), followed by Pteropodidae (4/11) and majority were classified under Vespertilionidae (6/11)(Table 1). However, based on the number of collected

Table 1. Summary of the species of bats tested for *Salmonella* spp. using conventional isolation and PCR methods.

Bat Species (Common name)	Family	Place of Collection			Total
		A	L	QC	
<i>Miniopterus australis</i> (Little bent-winged bat)	Vespertilionidae	21	0	0	21
<i>Miniopterus schreibersi</i> (Common bent-winged bat)	Vespertilionidae	15	0	0	15
<i>Miniopterus tristis</i> (Greater bent-winged bat)	Vespertilionidae	1	0	0	1
<i>Scotophilus kuhlii</i> (Lesser Asian house bat)	Vespertilionidae	0	0	5	5
<i>Pipistrellus javanicus</i> (Javan pipistrelle)	Vespertilionidae	0	0	3	3
<i>Myotis macrotarsus</i> (Philippine large-footed myotis)	Vespertilionidae	1	0	0	1
<i>Ptenochirus jagori</i> (Musky fruit bat)	Pteropodidae	1	17	1	19
<i>Cynopterus brachyotis</i> (Common short-nosed fruit bat)	Pteropodidae	0	4	20	24
<i>Eonycteris spelaea</i> (Common nectar/dawn bat)	Pteropodidae	0	3	1	4
<i>Rousettus amplexicaudatus</i> (Common rousette)	Pteropodidae	0	0	2	2
<i>Hipposideros diadema</i> (Diadem roundleaf bat)	Rhinolophidae	1	0	0	1
Total		40	24	32	96

*A- Aklan L- Laguna QC- Quezon City

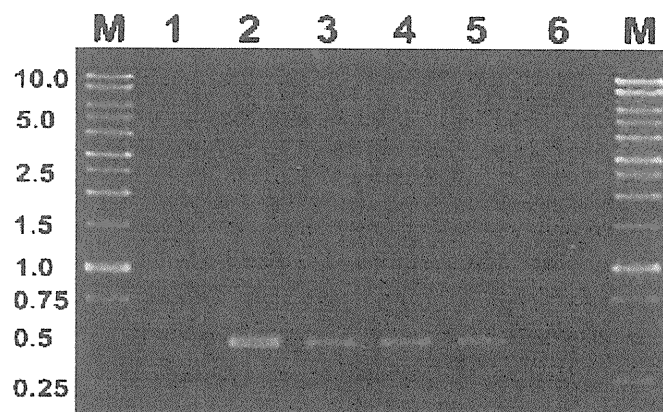


Figure 1. Polymerase Chain Reaction Amplification of the *Salmonella* genus-specific 450-bp PCR products from bat samples. (M) Molecular size marker (1kbp DNA ladder); (1) Negative control (HPLC-grade water); (2) Positive control (*Salmonella* Typhimurium); 3-4 (Sample 1) & 5-6 (Sample 2) Two *Salmonella* positive samples showing the expected 450-bp amplicon size.

samples, majority were frugivores (Pteropodidae). This can be due to small body size and ability to produce echolocation signals of insectivores which enable them to escape and avoid being trapped in the mist nets [7].

Vespertilionidae is the largest family within the order Chiroptera and is worldwide in distribution. Most species are known to be insectivores and roost in caves. Likewise in the Philippines, previous data have shown that the number of insectivores was almost twice as that of frugivores [7,16].

The present study was able to molecularly detect *Salmonella* species from the small intestines of two (2/96 bats) vespertilionids adult female bats (*Miniopterus australis* and *M. schreibersi*) from Panay Island (Pangihan cave, Aklan). The successful detection was attributed to the ability of PCR to detect atypical *Salmonella* spp. and non-viable *Salmonella* cells which makes it more sensitive and specific in determining the presence of the target *Salmonella* DNA. This result is in agreement with previous studies.

It was previously shown that the detection of *Salmonella* sp. in 391 fecal samples from cattle, pig and poultry in Sweden using commercial PCR-based method (BAX® system) was proven to be satisfactory [6]. In addition, a study using PCR for *Salmonella hila* gene also successfully amplified the expected 784-bp DNA fragment in all the 33 *Salmonella* strains from 27 serotypes while none from all the non-*Salmonella* strains tested. Furthermore, it was able to detect *S. choleraesuis* subsp. *choleraesuis* serovar Typhimurium in artificially contaminated fecal samples at a concentration of 3×10^2 cfu/mL [20]. Similarly, the use of PCR for specific detection of *Salmonella* spp. in food has been documented. It was reported that PCR targeting specific gene (e.g. *fimA*, *invA*, *ssaR*) displayed high degree of diagnostic accuracy, without unspecific amplification or false signals and was found to be faster, less costly and more reliable than the traditional culture methods [5,14,18,25]. Likewise, the BIOTECH *Salmonella* PCR-based detection kit was also established to be sensitive enough to detect the presence of *Salmonella* in fecal samples, artificially spiked and naturally contaminated animal feeds. Extensive validation trials of the kit were previously performed [24] in collaboration with several government and private testing laboratories on animal feeds and ingredients, and animal organs. Furthermore, the kit has been used on swab samples from ileum and tissue samples from mesenteric lymph nodes of apparently healthy dogs. Atypical *Salmonella* that failed

to be detected using the plate culture assay can be positively identified using the kit. Under optimized conditions, the level of PCR assay sensitivity is 10^3 cells [22,23].

Local studies revealed that the combination of TBG enrichment with bacterial lysis method and capillary gel electrophoresis is suitable for a rapid *Salmonella* detection in chicken feces [3]. However, false-negative results can still occur and the bile salt component of TBG broth used as enrichment medium for *Salmonella* spp. may inhibit PCR amplification of DNA [27]. Additionally, other substances that are inhibitory to PCR include large amounts of polysaccharides, phenolic and metabolic compounds in feces [13].

The results of the study strongly indicated that PCR detection appears to be more sensitive over the conventional isolation method. No *Salmonella* spp. isolates were obtained from the small intestines of 96 apparently healthy bats using the conventional method of isolation. The inability to obtain a *Salmonella* spp. culture can be attributed to several factors. It is foremost believed that the short intestinal length and rapid transit time in bats [12] could have prevented the stasis necessary for adherence, colonization and multiplication of bacteria in the distal small intestine. Another consideration is the fact that the pre-enrichment stage which provides nutrition, promotes revival of damaged or stressed cells and multiplication of *Salmonella*, is non-selective, hence it favors the overgrowth of other organisms which may have overwhelmed *Salmonella* species due to its poor competitive nature. Therefore, it is most likely that highly competing non-*Salmonella* organisms may hamper the identification of *Salmonella* on agar plates. Lastly, the atypical appearance of *Salmonella* in the selective media plates may have been overlooked since only those pink colonies with black centers were considered positive on XLD media.

In general, results have shown that there is a significant degree of agreement between the conventional and PCR method, especially for the samples from Laguna and Quezon City. The samples subjected to both methods were found negative for *Salmonella* spp.

CONCLUSION

The study reports the first detection of *Salmonella* spp. in Philippine bats using intestinal samples. Results in the present study revealed that the Philippine bats, *Miniopterus australis* and *M. schreibersi*, both adult female insectivorous bats captured in Pangihan cave

of Barangay Pablacion, Malay, Aklan harbored *Salmonella* in their intestines. Since salmonellae have been detected in a large variety of environment and host species including insects, these bats may have acquired these microorganisms in water and in their diet.

This finding showed that Philippine bats may serve as potential reservoir and carrier of *Salmonella* organisms. The data also strongly indicates that bats may actively contribute in the dissemination of salmonellae into the environment through fecal route. This currently makes Philippine bats as a significant threat to livestock and a serious public health concern, since all serotypes of *Salmonella* are considered to be pathogenic to man [1,8].

Lastly, the results also indicate that majority of the collected species were insectivores under family Vespertilionidae while the largest population of the Philippine bats were frugivores belonging to family Pteropodidae.

Acknowledgments. The authors are grateful to the assistance given by the following: Japan Health Sciences

Foundation through Prof. Yasuhiro Yoshikawa (University of Tokyo, Graduate School of Agricultural and Life Sciences), National Institute of Molecular Biology and Biotechnology (BIOTECH), UPLB and UPLB Museum of Natural History. The authors also would like to thank Dr. Abigail M. Baticados for the critical review and editing of the paper.

SOURCES AND MANUFACTURERS

- ¹ Virbac Philippines, Inc., Pasig, Philippines
- ² BBL, Maryland, USA
- ³ Biotest, Dreieich, Germany
- ⁴ Difco, Maryland, USA
- ⁵ HiMedia, Mumbai, India
- ⁶ Conda, Madrid, India
- ⁷ Hispanlab, S.A., Madrid, Spain
- ⁸ Difco, Michigan, USA
- ⁹ BBL Crystal™ Identification System Enteric/Nonfermenter ID kit, Difco, Maryland, USA
- ¹⁰ Sigma, St. Louis, USA
- ¹¹ *Salmonella* DNA Amplification System™, BIOTECH, Philippines
- ¹² AB Applied Biosystems™, California, USA
- ¹³ Promega Corporation, Wisconsin, USA
- ¹⁴ UVP LLC, California, USA
- ¹⁵ Labworks™ Analysis Software, California, USA

REFERENCES

- 1 Acha P.N. & Szyfres B. 2001. *Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals*. 3rd edn. Washington, D.C.: Pan American Health Organization, pp.233-246.
- 2 Arata A.A., Vaughn J.B., Newell K.W., Barth R.A.J. & Gracian M. 1968. *Salmonella* and *Shigella* infections in bats in selected areas of Colombia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 17(1): 92-95.
- 3 Carli K.T., Unal C.B., Caner V. & Eyigor A. 2001. Detection of Salmonellae in chicken feces by a combination of tetrathionate broth enrichment, capillary PCR and capillary gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*. 39(5): 1871-1876.
- 4 Chen W., Martinez G. & Muchandani A. 2000. Molecular beacons: a real-time polymerase chain reaction assay for detecting *Salmonella*. *Analytical Biochemistry*. 280(1): 166-172.
- 5 Cheng C.M., Lin W., Van K.T., Phan L., Tran N.N. & Farmer D. 2008. Rapid detection of *Salmonella* in foods using real-time PCR. *Journal of Food Protection*. 71(12): 2436-2441.
- 6 Eriksson E. & Aspan A. 2007. Comparison of culture, ELISA and PCR techniques for *Salmonella* detection in faecal samples for cattle, pig and poultry. *Biomed Central Veterinary Research*. 3(21): 1-19.
- 7 Fowler M.E. & Miller R.E. 2003. *Zoo and Wildlife Medicine*. 5th edn. Philadelphia: Elsevier, pp.315-333.
- 8 Hirsh D.C., MacLachlan N.J. & Walker R.L. 2004. *Veterinary Microbiology*. 2nd edn. Malden: Blackwell Publishing, pp.69-74.
- 9 Ingle N.R. & Heaney L.R.H. 1992. A key to the bats of the Philippine islands. *Fieldiana: Zoology*. 69(1):1-44.
- 10 Jijón S., Wetzel A. & LeJeune J. 2007. *Salmonella enterica* isolated from wildlife at two Ohio rehabilitation centers. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 28(3): 409-413.
- 11 Kenny D.E. 1999. *Salmonella* spp. survey of captive rhinoceroses in U.S. zoological institutions and private ranches. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 30(3): 383-388.
- 12 Klite P.D. 1965. Intestinal bacterial flora and transmit time of three neotropical bat species. *Journal of Bacteriology*. 90(2): 375-379.
- 13 Malorny B. & Hoorfar J. 2005. Toward standardization of diagnostic PCR testing of fecal samples: lessons from the detection of salmonellae in pigs. *Journal of Clinical Microbiology*. 43(7): 3033-3037.

- 14 Malorny B., Paccassoni E., Fach P., Bunge C., Martin A. & Helmuth R. 2004. Diagnostic real- time PCR for detection of *Salmonella* in food. *Applied and Environmental Microbiology*. 70(12): 7046-7052.
- 15 McCoy R.H. 1974. Bacterial diseases of bats: a review. *Laboratory Animal Science*. 24(3): 530-534.
- 16 Mickleburgh S.P., Hutson A.M. & Racey P.A. 2002. A review of the global conservation status of bats. *Oryx*. 36(1): 18-34.
- 17 Morse E.V., Midla D.A. & Blessman B.H. 1982. Survival of *Salmonella* species under natural simulated condition in the swine environment. In: *25th Annual Proceedings of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians* (Tennessee, U.S.A.). pp.99-114.
- 18 Naravaneni R. & Jamil K. 2005. Rapid detection of foodborne pathogens by using molecular techniques. *Journal of Medical Microbiology*. 54(1): 51-54.
- 19 Omatsu T., Watanabe S., Hiroomi A. & Yoshikawa Y. 2007. Biological characters of bats in relation to natural reservoir of emerging viruses. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 30(5-6): 357-374.
- 20 Pathmanathan S.G., Cardona-Castro N., Sanchez-Jimenez M.M., Correa-Ochoa M.M., Puthucheary S.D. & Thongs K.L. 2003. Simple and rapid detection of *Salmonella* strains by direct PCR amplification of the *hilA* gene. *Journal of Medical Microbiology*. 52(Pt 9): 773-776.
- 21 Quinn P.J., Carter M.E., Markey B.K. & Carter G.R. 1994. *Clinical Veterinary Microbiology*. London: Mosby-Yearbook Europe Limited, pp.226-234.
- 22 Ramirez T.J., Perez M.T.M., Mercado M.A., Sedano S.A., Sapin A.B., Calapardo M.R., Garcia M.R.C., Tambalo R.D., Guerra M.R.V. & Mercado S.M. 2001. Evaluation of BIOTECH PCR-based detection kit for *Salmonella* in foods, water and feeds. In: *Proceedings of the 30th Philippine Society for Microbiology Annual Convention* (Cebu, Philippines). pp.238-243.
- 23 Ramirez T.J., Sedano S.A., Guerra M.A.R.V., Garcia M.R.C. & Mercado S.M. 2001. Comparison of two methods for *Salmonella* detection in feeds. In: *Proceedings of the 38th Philippine Society for Animal Sciences Annual Convention* (Manila, Philippines). pp.130-131.
- 24 Sedano S.A., Perez M.T.M. & Ramirez T.J. 2004. Comparative assessment of *Salmonella* DAS™ with conventional method of *Salmonella* detection. In: *Proceedings of the 15th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology Sustainable Development of SME's Through Biotechnology and JSPS-NRCT Symposium on the Forefront of Bioinformatics Application* (Chiang Mai, Thailand). 1 CD-ROM.
- 25 Shi X.L., Hu Q.H., Zhang J.F., Li Q.G., Wang B., Lin Y.M., Zhuang Z.X., Liu X.L. & Zhang S.X. 2006. Rapid simultaneous detection of *Salmonella* and *Shigella* using modified molecular beacons and real-time PCR. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*. 27(12): 1053-1056.
- 26 Smith W.A., Mazet J.A.K. & Hirsh D.C. 2002. *Salmonella* in California wildlife species: prevalence in rehabilitation centers and characterization of isolates. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 33(3): 228-235.
- 27 Stone G.G., Oberst R.D., Hays M.P., McVey S. & Chengappa M.M. 1994. Detection of *Salmonella* serovars from clinical samples by enrichment broth cultivation-PCR procedure. *Journal of Clinical Microbiology*. 32(7): 1742-1749.
- 28 The Manila Times. July 2006. Some food-borne illnesses to watch out for. *The Sunday Times*. Available in: <http://findarticles.com/p/news-articles/manilatimes/the/mi_8072/is_20060702/food-borne-illnesses-watch/ai_n45931156>. Accessed on 02/2009.

ズーノーシス統御へのアプローチ

吉川泰弘, 太田周司, 吉崎理華, 門平睦代

獣医畜産新報 *JVM* Vol.64 No.4, 2011年4月号

特集 ズーノーシス ー総集編ー

275-282頁

ズーノーシス統御へのアプローチ

吉川泰弘*¹ 太田周司*² 吉崎理華*² 門平睦代*³

要約

動物由来感染症の統御へのアプローチが少しずつ見えてきた。輸入動物のリスク評価法を開発し、輸入動物届出制を敷いたことはリスク回避法として有効であった。今回、多くの動物由来感染症を序列化するための、定量的な因子の重み付方法の適応を試みた。今後は序列上位で対応の取れていない感染症について、リスクシナリオの検討、重要管理点の確定、管理のコスト・ベネフィットと有効性の検証のためのプロセスを明らかにすることが必要である。

はじめに

21世紀の克服すべき課題には環境保全 (eco-health) の問題がある。これらは主として環境汚染の低減、地球温暖化の抑制といった課題である。また、爆発する人口の増加と食料危機の問題もある。他方で、食料の安定供給 (food security: 食の安全保障) の確立、貧困と飢餓の解消は差し迫った国際的な課題である。しかし、グローバリゼーションを推し進めたとしても、経済格差や文化・信仰の相違、政治の不安定化なども絡んでおり、これらの問題は簡単に

解消できる課題ではない。さらに、これらの課題は、相互に複合的に関連しており、結果として感染症 (野生動物の感染症、家畜の感染症および動物に由来する人の感染症など) を生み出している。このような意味で、21世紀において、新興・再興感染症の統御は最も喫緊の課題であるといえる。特に最近の新興感染症のほとんどは人と動物の共通感染症 (ズーノーシス) である。

人と動物の共通感染症の統御法という専門の学問や研究があるようには思えない。各国、各機関が個々の感染症について、その対策に試行錯誤を繰り返し、経験的に対応してきているようである。それでも、個々の感染症の類型化や順位付 (プライオリティー化)、リスク評価とリスク管理法の導入などが、少しずつ試みられている。

わが国も、約10年前に新感染症法 (伝染病の100年ぶりの改正) に、初めて動物由来感染症を組み込んでから、本格的に人と動物の共通感染症の研究が始まったといえる。沢山の感染症、次から次へと出現する新興感染症に対して、科学的、中立的、理論的に統御の方法を考えるにはどのようにしたら良いか。リスク分析法や危機管理手法を組み込みながら、この間、ズーノーシス統御へのアプローチの仕方を模索してきたように思う。ここ2年間、我々4名で月1回の会合を重ねて、少しずつ考えを進めてきたので、概要を紹介する。

感染症とズーノーシス概念の変遷

地球の生命の歴史を振り返れば、37億年前に原始生命が誕生した。その後、次第に、比較的単純な単細胞生物の細菌や原虫類が出現した。そして多細胞生物の真菌、線虫や条虫などが誕生した。さらにカンブリア紀を経て、生物種の爆発が起こり、節足動物を頂点とする進化の世界と、鳥類を頂点とする爬虫類群、そして我々の属する哺乳類のように、多様化し分化してきた。現存する生物はこうした進化の歴史を継ぐものたちである。

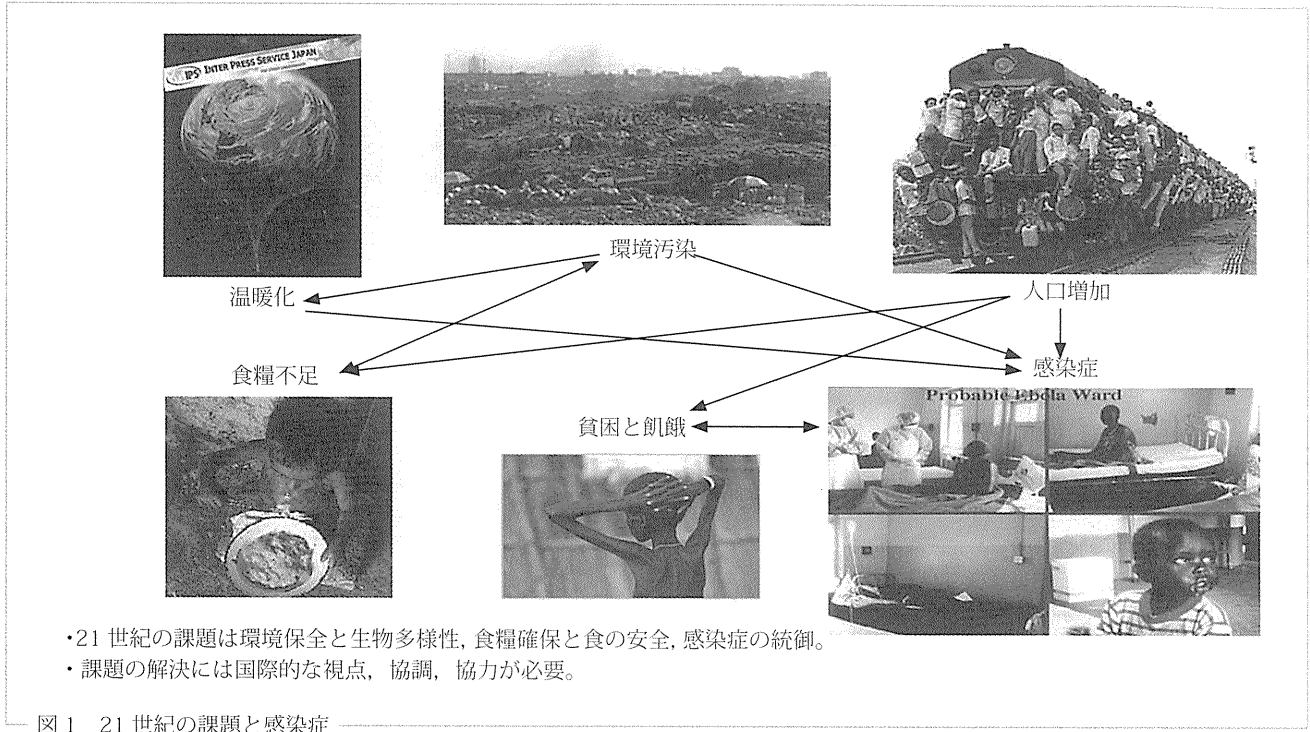
*¹ Yasuhiro YOSHIKAWA (写真・コメント)
北里大学獣医学部
〒034-8628 十和田市東二十三番町35-1

*² Shuji OTA & Rika YOSHIZAKI
株式会社東レリサーチセンター

*³ Mutsuyo KADOHIRA
帯広畜産大学畜産学部



動物由来感染症のリスク評価法は、まだ確立されていない。各国が独自に試行錯誤的に取り組んでいるのが実情である。普遍性をもったリスク評価法とリスク管理法を考えていきたい。感染症の危機管理対応を含めて、研究は、まだ始まったばかりである。



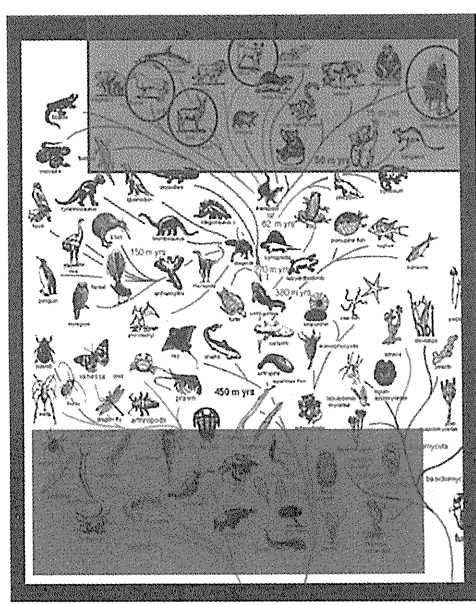
このような観点から感染症を振り返れば、感染症とは、こうした生物多様性の反映であり、宿主（より高等な生物：主として魚類から哺乳類まで）と寄生体（より原始的な生物：主として細菌から節足動物まで）の相互作用であるととらえられる。その意味では人の感染症や家畜の感染症は、自然界の宿主と病原体の相互作用としての特殊解である。すべての宿主と病原体の相互作用の一般解を求めるとすれば、それは野生生物と寄生病原体のかかわりの中にある。したがって、一般解を解くためには、医学、薬学、獣医学という縦割りの分析、対応だけでは十分ではありえない。

このことは、比較的古くから気づかれていた。人獣共通感染症対策には獣医学と医学の連携が必須である。細胞病理学の父と言われるドイツのルドルフ・ウイルヒョウ (Rudolf Virchow) により、このことが指摘された。彼はズーノーシス (zoo: 動物, nosos: 病気, 直訳すれば動物由来感染症) という言葉を作り出し、獣医学と医学の連携に努力した。約百年後の1960年代には、獣疫学の創設者と言われるカリフォルニア大学獣医学部のカルビン・シュワーベ (Calvin Schwabe) 教授が、人獣共通感染症に対して獣医学と医学が一緒になって対応する必要性を指摘し、One Medicine という概念を提唱した。人も動物の一種であり医学はひとつという概念である。

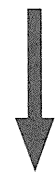
2004年のマンハッタン原則では野生動物保護協会から「One World, One Health」というキーワードに基づく行動計画が提言された。これは、WHO (世界保健機関), FAO (食料農業機関), OIE (国際獣疫事務局), WB (世界銀行), UNICEF (国連児童基金) などの国際機関が協力して人獣共通感染症の制圧に取り組む活動方針を示したものである。「人、動物、環境を含めた健康の維持が必要であること (One Health) と、もはや世界が切り離すことのできない緊密さで繋がっており、感染症は生物全体の危機となる (One World)」というメッセージである。One Medicine の概念は、最近の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のもと、獣医学と医学が連携して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た。2007年には米国獣医師会と米国医師会が One Health イニシアチブの発足を決定し、活動を開始した。

OIE の戦略

国際的なレベルで感染症を制御する責務を負っている機関は、人の感染症についてはジュネーブに本部を置く WHO であり、動物の感染症および食物に由来する感染症



- ・宿主と病原体の原型はすべて野生動物の中にある
- ・人と家畜は野生動物の特殊な末裔である
- ・人と家畜の感染症は特殊解
- ・野生動物と病原体の相互作用は一般解である



- ・伝統的な人や家畜を対象とした下流からのアプローチは古い。ダメ！
- ・発想を変えて環境、生態、野生動物と病原体の振る舞いを知るアプローチが重要。

図2 感染症は原始生命体と高等動物のインターフェイス

についてはフランスに本部を置く OIE が責任を負っている。また食糧の安定供給に関してはローマに本部のある FAO がコントロールしている。しかし、OIE の決定は、しばしば各国の家畜や家畜由来食品の貿易等に直接関連するので、WTO（世界貿易機構）の関連機関としての役割も果たしている。

感染症の制圧は基本的には政治問題であり、経済問題である。貧困と飢餓、戦争が続く限り、国際的な公衆衛生レベルの向上は望めない。各国・地域の文化の違い、国民性の違いや生活・習慣の違いなど、多様性を認めたくて、グローバルな感染症防御のための基準やシステムを構築していくという国際協調路線が感染症制圧への道筋と言える。

近年、世界を震撼させる感染症の多くは動物由来であり、容易にグローバル化し、繰り返し流行を起こすようになっている。これらの感染症は、真の原因が不明で制御困難という特徴がある。その理由は、主要な動物由来感染症は野生動物に由来するためである。前述したように、これまで行われてきた、従来型の人や家畜だけを対象とした下流からの感染症対策でなく、環境や野生動物と病原体の生態学といった、上流の視点からの研究を進める必要がある。また、野生動物や家畜、畜産物等を介して広がる感染症には、国境のバリアーは意味をなさない、したがってグローバル

な対策をたてる必要がある。具体的な戦術としては、感染の源である環境、宿主、病原体の生態系の解析という、トップダウン方式の導入、フィールド科学と疫学、生態学、感染症学、リスク科学といった異分野の統合的研究体制の確立、感染症情報ネットワークの確立により、新興感染症の制御を図ることが必要である。

こうした流れの中で、OIE は最近、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、人に来る前の人獣共通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、安定供給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 UNEP（国連環境計画）と協力して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。

各国の首席獣医官（Chief Veterinary Officer：CVO）は、年に1回オンラインで、その年の野生動物疾病を前期と後期に分けて OIE に報告することを義務付けられた。届出のリストは野生動物疾病のワーキンググループ（WG）が作成し、OIE の質問事項に組み込まれている。毎年の

データはOIEのデータベースWAHIS-wildに登録され、公開されている。

ズーノーシスとアジアの状況

アジアは面積的には3200万km²で世界の23%を占めるにすぎないが、人口は世界の56%を占める。人口の過密地帯である。しかし、これは人だけでなく、家畜の飼育状況でも世界の3分の1(牛)から半分(鶏)、約6割(豚)を占める過密状況でもある。世界の18%に及ぶ熱帯雨林を有している。生物種の多様性を絶滅危惧種の数で比較すると、アジアは約8000種で欧州、南北アメリカ大陸、オセアニア、アフリカに比べて、極めて多い。このように、アジアは生物の多様性、棲息密度が高く、人、家畜も過密状況で生物叢のカオス地帯であり、感染症のホットスポットである。新興感染症の大半がアジアから拡散しているのが実情である。

世界の感染症統御のネットワークを見ると北アメリカ(カナダ、米国)は中南米に技術移転や感染症統御の援助を行い、Pan American Health Organization (PAHO)などを通じて、一体化による感染症封じ込めを進めている。他方、ヨーロッパはEU圏の拡大による全欧州の標準化と宗主国群として、アフリカの感染症統御に力を入れており、ヨーロッパ・アフリカ圏として感染症のコントロールを目指している。オーストラリア、ニュージーランドは欧州、北米と強固なネットワークを確立している。

このような状況を見ると、感染症に関してはアジア地域のみが孤立しており、またアジアの地域内での情報交換や、感染症コントロールの戦略・戦術が示されていない。ヘゲモニーを取る国も明らかでなく、各国間の調整も進んでいないようである。OIEの地域事務局が東京にあり、WHOのアジア支局がマニラにあり、FAOのアジア支局がバンコクにあるが、一体的な司令塔として、有機的に動いているようには見えない。今後の世界の経済をリードしていく可能性の高いアジア諸国にとって、感染症の統御は大きな課題である。

ズーノーシスの統御戦略：リスク回避

人獣共通感染症の統御は、リスクの回避と回避できなかった時の危機管理に分けられる。感染症のリスク回避をどのように行うべきかという問題には、総論と各論がある。



面積：3200万km²(世界1億3000万km²の23%)
人口：40億人(世界67億人の56%)
人口密度：126人/km²(世界平均49人/km²の2.6倍)

家畜：世界の30～60%を飼育

牛 4億3000万頭(世界13億4700万の32%)
豚 5億5500万頭(世界9億4100万頭の59%)
鶏 98億羽(世界184億羽の53%)

熱帯雨林面積：

中南米 9億1800万ha(52%)
アフリカ 5億2000ha(30%)
アジア 3億1100ha(18%)

絶滅危惧種 great biodiversity：

欧州 1,500
アメリカ North 3,600 South 4,670
アジア 8,000
オセアニア 1,900
アフリカ 5,400

Asia is a chaos of biodiversity and high risk area of infections!

図3 ズーノーシスリスクとアジアのステータス

ほとんどの場合は、感染症のアウトブレイクが起こり、パニックになり、応急措置を施し、対策を実行し、リスクが減少し、封じ込めに成功したら終わりという、各論の繰り返しである。

前述したように、ここ10年余り、感染症法の成立後、人獣共通感染症の統御法に関して、総論的なアプローチの開発に努力してきた。個々の感染症でなく、ズーノーシス全体を統御する方法として、以下のステップをアプローチ方法として考えた。①リスクシナリオの作成とリスク評価：120種類を超す、ズーノーシスの個々の感染症についてリスクシナリオを作成する。この際サーベイランス・データがキーポイントとなる。作成したシナリオをもとに、統一的、一貫性を持ったリスク評価法を考案する。感染症に関連する因子の重み付けを、定量化するためにAHP(analytic hierarchy process)のような、一対比較、階層化意志決定法などを利用する。②感染症の序列化と標的感染症の重要管理点の明確化：上記の統一的評価法を用いて感染症の序

AHP (analytic hierarchy process) 階層化意思決定法 / 階層分析法

- ① 評価基準について 1 対比較を行う → 評価基準の重み
- ② 評価水準の 1 対比較を行う → 各疾病の水準レベルを当てはめる
- ③ ①の結果と②の結果をあわせて、総合得点が計算される

動物由来感染症の順位化

評価基準 ②-1

1 次発症者数 スタートポイント	侵入頻度	人一人	重篤度 (致死率)	診断	予防	治療
2-1	2-2	2-3	2-4	2-5	2-6	2-7

評価基準 ②-1

130 万人以上	A	国内に存在	A	高率	A	非常に高い	A	できない	A	有効な予防法なし	A	できない	A
13 万人以上	B	1case/3years	B	起こる	B	高い	B	限定機関	B	有効な予防法あり	B	対処療法のみ	B
1 万 3000 人以上	C	1case/10years	C	起こらない	C	低い	C	できる	C	ワクチン有り	C	できる	C
1300 人以上	D	1case/100years	D			非常に低い	D						
130 人以上	E					無視できる	E						
30 人以上	F												
30 人未満	G												

代替案 (疾病) ③ E A B ...

図 4 リスク評価法 (項目の重み付け)

列化 (prioritization) を行う。序列化を行うには、科学性、中立性、一貫性、透明性を確保し、ステークホルダーに説明と同意を得ることが必要である。序列化により、標的とすべき感染症が絞りこまれたら、標的感染症の重要管理点: Critical control point (CCP) を明確化する必要がある。個々の感染症のリスクシナリオとそれを支える科学的なサーベイランス・データ (標的サーベイランスと一般的サーベイランス・データなど) が CCP の決定には極めて重要である。重要管理点の決定には、リスク管理側のコスト・ベネフィット計算、リスクのトレードオフなどの検討も必要となる。

③実施と検証: リスク管理措置が決まれば、感染症統御の実施、実施後の統御の有効性検証が必要になる。適切な対応により、リスクが減少し、序列 (重要度) が下がれば、別のプライオリティーの高い感染症の統御にうつる。この繰り返しになる。

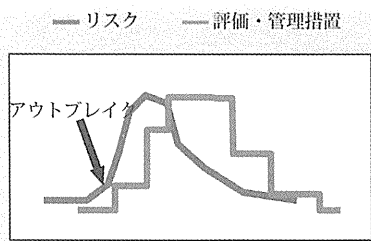
今回、感染症の因子の重み付けに用いた AHP 法は、1971 年に Thomas L. Saaty 博士 (ピッツバーグ大学) が提唱した方法である。多基準の選択問題があるとき、目標・評価基準・代替案の階層構造に整理したうえで、各階層における要素同士の相対的な重要度を導き出し、それらを総合することで最適な評価・選択を図るという手法である。

この方法は、各因子の重要度を項目全体に対して数値化するのが困難であっても、2つの項目間での重要性の比較判断はしやすく、データの入手が容易である点を利用している。2項目の比較の程度を主観的に判断した上で、客観的な統計理論を用いて加工することにより、主観と客観を統合することができる。

この方法を使うと国内にある感染症では各因子の重み付けは、致死率が 0.387、患者数が 0.203、予防法の有無が 0.111、治療法の有無が 0.111、診断の可否が 0.104、人一人感染が 0.064、侵入頻度が 0.020 となった。他方海外にある未侵入の感染症では、致死率が 0.308、侵入頻度が 0.163、診断の可否が 0.156、予防法の有無が 0.152、治療法の有無が 0.152、人一人感染が 0.046、患者数が 0.026 となった。

感染症の危機管理

感染症のようにリスクが変動するもの、不確実性の要素が大きいものに対する危機管理は簡単ではない。難しさは 4 つある。1 つは化学物質のように一度リスク評価をすれば、その値 (例えば ADI: acceptable daily intake) は変動しないというものに対して、感染症はリスクが容易に変動



1. 増大するリスクに対応して管理措置を強化することは容易
 - ・強化により評価者、管理者、消費者の責任は減少
 2. 減少するリスクに対応して管理措置を緩和することは困難！
 - ・リスク措置の緩和には強化以上に責任が伴う
- 評価者、管理者、消費者の責任が増大

- ・ゼロリスクがない場合の責任の所在が問題！
- ・誰も責任を取らないと管理はゼロリスクにもどる。コストは無限大となる
- ・コスト負荷によるシステム崩壊
- ・持続的社会的維持のための危機管理対応が自己否定に陥る

感染症の対応は、強めるだけが危機管理ではない。
リスクに応じて緩めることも危機管理である。

図5 感染症の危機管理

することである。対応が遅ればリスクは増大するし、適切な対応をとればリスクが減少し、消滅する。2つ目は予防原則の適用であり、3つ目は、可能性のあるリスクシナリオを多種類準備することであり、4つ目はリスクが減少した時に、危機管理措置を緩和することである。

リスク評価をする科学者は、評価の結果に対する責任を負う。特に科学的な不確実性を持ったものについては、予防原則を基本とするリスク管理措置を誘導するようリスク評価が多くなる。予防原則をとるとすれば、科学的証拠を出す、あるいは新しい証拠に基づいた再評価を行うという検証が、常に義務づけられる。日本の科学者にはこの認識が弱い。自然科学と社会科学が融合したリスク分析のような分野はピュア・サイエンスで育った科学者には向かないが、日本ではこうした分野に対応する人材を育成してこなかった。また、わが国ではまだ、危機管理のための科学的なリスクシナリオを多種類用意するという戦術はとられていない。方法論の開発と検証のためのツールを開発していく必要がある。

他方、リスク管理者（行政）は、リスク評価の結果にコスト・ベネフィットやリスクのトレードオフ、施策の実現性などを勘案し、管理措置や規制の最終決定をするわけである。したがって、その決定の科学性、透明性、一貫性などの説明責任、特に費用対効果に関する説明責任と、消費者に対する安全性の説明と同意を得なければいけない。この責任を回避すると消費者からの信頼は得られない。行政

に対する不信は、安全性とは異なる安心感のために、不必要で過剰な管理をとらざるを得ないという両者にとって不毛な対応となる。

感染症の危機管理で重要なことは、適切な対応がとれ、リスクが減少した時に、誰がリスク管理の緩和に対する責任を取るかということである。リスク評価者、リスク管理者、消費者の三者が責任をとりたくないとする、結局、規制を緩和することは困難で、ゼロリスクを迫ることしかできない。次から次に出現する新興感染症に、このような対応を取ると、費用は無限大に要るので、社会は崩壊してしまう。もともと危機管理は持続的に社会を維持することが目的なのだから、社会を崩壊させる管理措置は危機管理ではない。

危機管理はリスクに応じて上げるだけでなく、下げることも含めて危機管理なのだと理解する必要がある。特に不確実性とリスクの変動を伴う感染症については、このことを理解しなくてはならない。

フォーカルポイントとネットワークの確立

前述したように全世界のOIE加盟国の首席獣医官(CVO)は各国の国内情報収集拠点(national focal point)を決める必要がある。フォーカルポイントはCVOの下でOIEに野生動物の届け出疾病に関する情報を送る必要がある。OIEは、これまで、アメリカ、アフリカ、アジア(2010年10月、バンコク)で各国のCVOを集めて、OIEの戦略

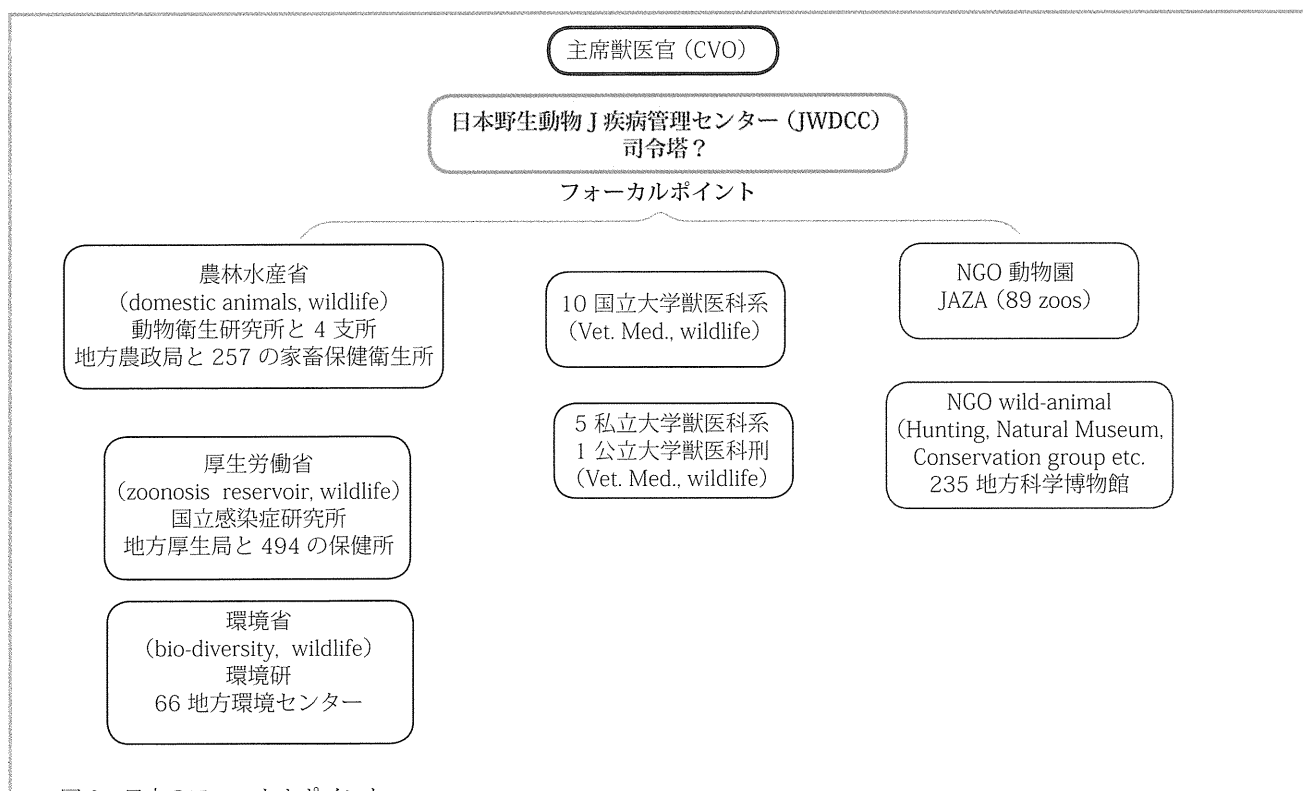


図6 日本のフォーカルポイント

とフォーカルポイントの役割を理解させるためのワークショップを開催してきた。また2011年2月にはパリで野生動物疾病の国際会議を開催する。司令塔としての役割を着実に果たしている。

野生動物と家畜のインターフェイスでは、OIEはコンパートメンタリゼーションという概念を導入している。これは疾病に侵された環境下でも飼育されている家畜(家禽)が当該感染症に侵されていない状況を維持していることを認めるものである。コンパートメンタリゼーションの概念は野生動物で疾病がある場合でも、当該地域の家畜(家禽)の飼育を認め、畜産品の国際貿易に役立っている。例えば、野鳥のニューカッスル病や高病原性鳥インフルエンザなどである。他方、コンパートメント内のバイオセキュリティ管理により家畜感染症から野生動物を守ることも可能である。

これからは、日本も各省庁やNGOの協力を得て、技術的に優れた、適切なサーベイランスなどの資料に基づく疾病管理を進めることが必要である。わが国には農林水産省の下に動物衛生研究所と支所、地方農政局、各県に家畜衛生保健所がある。厚生労働省には感染症研究所と地方の厚

生局、各県の保健所がある、また環境省には環境研究所と地方環境センターがある。さらに16の獣医系大学や動物園水族館協会、狩猟協会や各県の獣医師会などがある。これらの組織をどのようにまとめ、ネットワークを確立していくかが重要な課題である。サーベイランスと野生動物疾病の早期発見には、狩猟協会との連携は特に有用であり重要である。これらの連携は、また野生動物保護と農作物の被害や人への危害の防止の管理にも役立つ。しかし、人からの一方的な判断でなく、野生動物との共存を含めて、高度に複雑な問題を含んでいることを理解しなくてはならない。野生動物肉の利用に関しては、シビエのような地域産業の創生という側面もあるが、ゲームミートのような食の安全に関する問題も含んでいる。問題の解決には議論と時間が必要な課題である。

おわりに

人獣共通感染症は人類の生産活動の拡大や経済効率の追求、ライフスタイルの変化などに関連して、その発生・拡大の様式を進化させてきている。便利で快適な生活を追及することは決して悪いことではないが、人間中心主義に立

脚して、バランスを無視した環境破壊や生態系の破壊を続けて行くと、その結果は必ず人類に戻ってくる。特に先進国の矛盾を途上国に押し付けることによる問題解決の仕方や、一国安全主義は既に破綻しつつある。

マンハッタン原則は「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というパターンを元に戻すことは困難である。これらのことを理解したうえで、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に必要な、技術革新と専門的知識を得ることは、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。私たちは、「1つの世界、1つの健康：One World, One Health」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」という言葉で結ばれている。何度読み直しても、含蓄の深い提言である。



Akiko Nakagami¹
 Takamasa Koyama¹
 Katsuyoshi Kawasaki²
 Takayuki Negishi³
 Toshio Ihara⁴
 Yoichiro Kuroda⁵
 Yasuhiro Yoshikawa⁶

¹Department of Psychology
 Japan Women's University
 1-1-1 Nishi-ikuta, Tama-ku Kawasaki-shi
 Kanagawa 214-8565, Japan
 E-mail: anakagami@fc.jwu.ac.jp

²Hoshi University, Tokyo, Japan

³Faculty of Science and Engineering
 Department of Chemistry
 and Biological Science
 Aoyama Gakuin University
 Kanagawa, Japan

⁴Shin Nippon Biomedical Laboratories
 Kagoshima, Japan

⁵Tokyo Metropolitan Institute for
 Neurosciences
 Tokyo, Japan

⁶Department of Biomedical Science
 Graduate School of Agricultural
 and Life Sciences
 The University of Tokyo
 Tokyo, Japan

Maternal Plasma Polychlorinated Biphenyl Levels in Cynomolgus Monkeys (*Macaca fascicularis*) Affect Infant Social Skills in Mother–Infant Interaction

ABSTRACT: Polychlorinated biphenyls (PCBs) are endocrine disrupting chemicals that disturb normal development of embryonic brains. In the present study, we evaluated the relationship between maternal plasma PCB concentration and infant behavioral characteristics in mother–infant interactions. We grouped 20 pregnant cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) into higher and lower PCB exposure groups; monkeys in the higher PCB group had PCB concentrations above 15 pg/g, which is representative of natural exposure levels. Maternal PCB concentration correlated negatively with infant behaviors (approach, look, proximity, locomotion) at the age of 6 months ($p < .05$), when an increase in these behaviors should normally occur. These results suggest that maternal PCB exposure may affect the development of infant social behavior in cynomolgus monkeys. Furthermore, this study provides primate evidence to support observations of associations between behavioral and learning disabilities and prenatal exposure to PCBs in humans. © 2010 Wiley Periodicals, Inc. *Dev Psychobiol* 53: 79–88, 2011.

Keywords: PCBs, behavior, infant, maternal plasma, natural exposure, *Macaca fascicularis*

INTRODUCTION

Dioxinlike compounds such as polychlorinated biphenyls (PCBs) and polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) are reported to have long-lasting effects on intellectual and

cognitive development, behavior, and attention in offspring (Brouwer *et al.*, 1995; Chen, Guo, Hsu, & Rogan, 1992; Jacobson & Jacobson, 1996; Porterfield, 2000). PCB poisonings occurred in western Japan, where it is called Yusho, in 1968 and in central Taiwan, where it is called Yu-cheng, in 1979 (Wang, Tsai, Yang, & Guo, 2008; Yang, Wang, Chen, Tsai, & Guo, 2008). They were caused by rice oil contaminated with large amounts of PCBs and PCDFs after accidental leakage at the rice oil-producing Kanemi Company (Akagi & Okumura, 1985; Ikeda, 1996; Kanagawa *et al.*, 2008; Leung, Kerger, Paustenbach, Ryan, & Masuda, 2007; Masuda, Kuroki, Haraguchi, & Nagayama, 1985). PCB exposure has also been documented in eastern Slovakia and areas bordering Lake Michigan in the United States. Further, abnormal thyroid gland function and a low intelligence quotient have been well documented in children exposed to PCB prenatally in all these regions (Hauser, Mcmillin, &

Additional supporting information may be found in the online version of this article.

Received 7 December 2009; Accepted 9 August 2010

Correspondence to: A. Nakagami

Contract grant sponsor: Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan

Contract grant number: 14104020

Contract grant sponsor: Core Research for Evolutional Science and Technology (CREST) Program of the Japan Science and Technology Agency

Published online 13 October 2010 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI 10.1002/dev.20493

© 2010 Wiley Periodicals, Inc.

Bhatara, 1998; Jacobson & Jacobson, 1996; Masuda, 1996; Park *et al.*, 2007, 2008).

Endocrine disrupting chemicals such as PCBs bind with transthyretin to completely block the binding of the thyroid hormone thyroxine (T₄), which is essential for the normal development of the central nervous system (CNS), including neural cell proliferation and migration, synapse formation, and myelinogenesis. PCBs have been shown to decrease serum T₄ levels in rodents (Kato *et al.*, 2003; Ness, Schantz, Moshtaghian, & Hansen, 1993). Severe deficiency in iodine, an essential component of thyroid hormones, can cause endemic cretinism characterized by severe mental retardation (Hetzl, 1994). Furthermore, thyroid hormone deficiency in both the mother and fetus is linked to permanent deficits in neurological and intellectual development in humans (Haddow *et al.*, 1999; Morreale de Escobar, Obregon, & Escobar del Rey, 2000). The incidence of learning disabilities and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) has also been shown to increase as a result of thyroid hormone resistance (Hauser, Soler, Brucker-Davis, & Weintraub, 1997; Kimura-Kuroda, Nagata, & Kuroda, 2007; Millichap, 2008; Osborn, 2000; Simic, Asztalos, & Rovet, 2009; Weiss, Stein, & Refetoff, 1997). Different brain regions require thyroid hormone at different developmental periods; thus, different types of CNS deficits may depend on whether insufficient thyroid hormone levels are the result of insufficient maternal thyroid hormone supplied to the fetus or insufficient production after birth (Porterfield & Hendrich, 1993).

Hormones of maternal origin play an important role in the development of the fetal brain until the fetus can produce hormones independently (Tanaka, 2004). The developing brain of the embryo and fetus is very sensitive and vulnerable to exogenous agents because of the immature blood–brain barrier (Brouwer *et al.*, 1995; Johanson, 1980; Rodier, 1994). PCB passes through the placenta and reduces T₄ levels in the fetal brain (Hosoda *et al.*, 2003). Schantz *et al.* (1989) showed that perinatal exposure to low doses of PCB caused spatial learning performance decline, hyperactivity, and impairment in concentration in rhesus monkeys, which remained even 3 years after PCB exposure.

Rice (2000) reported a correlation between ADHD and prenatal exposure to PCBs. Postnatal PCB exposure also resulted in behavioral impairment (Rice, 1999), and PCB exposure limited to the early postnatal period still resulted in environmentally relevant body burdens and produced long-term behavioral effects (Rice, 1997; Rice & Hayward, 1997). In addition, PCB has been reported to affect sex steroid hormones, particularly testosterone (Kitamura *et al.*, 2005; Qin *et al.*, 2007; Turyk *et al.*, 2008). Baron-Cohen *et al.* have suggested that fetal testosterone may shape the neural mechanisms underlying social

development (Baron-Cohen, Auyeung, Ashwin, & Knickmeyer, 2009; Chapman *et al.*, 2006; Ingudomnukul, Baron-Cohen, Wheelwright, & Knickmeyer, 2007; Knickmeyer, Baron-Cohen, Raggatt, & Taylor, 2005; Knickmeyer, Baron-Cohen, Raggatt, Taylor, & Hackett, 2006; Lutchmaya, Baron-Cohen, Raggatt, Knickmeyer, & Manning, 2004).

In Japan, PCB became a banned substance in 1974, but environmental PCBs have been drawn into the bodies of organisms and are still found in the blood and tissue of human beings. Even now, the effect of PCBs is a health concern (ATSDR, 2000; Hansen, 1999). The Japanese Ministry of Health, Labor and Welfare (2005) analyzed the amount of PCB exposure in living organisms and detected 35 types of PCB congener and an isomer in maternal peripheral blood and umbilical cord blood at concentrations of 60–90 ng/g (60–90 ng/ml) of fat. The degree of the natural exposure to PCBs varies across individuals, and it is not yet clear how the level of exposure to PCBs influences the brain development of the next generation. The final output of the nervous system is behavior. The complex relationship between PCB, thyroid and sex hormones, and CNS development may be further elucidated by gaining a better understanding of what tendencies and characteristics of behavior are affected by maternal PCB levels.

The range of different physiochemical characteristics possessed by EDCs means that these chemicals will degrade and behave in different ways in the environment, impacting exposure routes for both humans and wildlife (IPCS, 2002). Exposure can occur via air, water, soil, sediment, and food and consumer products. The chemical may then enter the organism by ingestion, inhalation, or skin contact across cell membranes and then be absorbed into the blood stream (Crosby, 1998). The contribution of various exposure pathways vary among species and life stages. Food especially would be implicated in animal exposure. Ingestion of EDCs and potential EDCs via food intake is generally considered the major exposure route both for humans and most wildlife and may lead to bioaccumulation and biomagnification. The contribution of dietary exposure will vary as a function of dietary preferences, position in the food chain, and species and quantities consumed. Persistent, lipophilic organic pollutants often bioaccumulate in species at the top levels of the food chain. Fish-eating birds and marine mammals have been found to have concentrations of POPs many times higher than those found in fish on which they feed, or compared with levels in the surrounding waters (IPCS, 2002).

In this study, we evaluated the influence of prenatal PCB exposure on the social development of *Macaca fascicularis* monkeys by analyzing mother–infant interactions. Mother–infant interaction in monkeys is a mutual

relationship that involves all the basic senses, the most characteristic factor being physical contact (Minami, 1997), which lasts until weaning. We examined mother–infant interactions on the basis of physical contact and maternal serum PCB levels in order to deeply understand of the relationship between fetal PCB exposure and early social development in monkeys.

METHODS

Subjects

Colony-bred adult female primiparous cynomolgus monkeys (*M. fascicularis*) were maintained and bred at Shin Nippon Biomedical Laboratories Ltd. (Kagoshima, Japan). The animals received approximately 108 g (12 g × 9 pieces) of solid diet that included animal oil (Tekland Global 25% protein primate Diet; Harlan Sprague Dawley Inc., Indianapolis, IN) on a daily basis, which was supplied once a day at 3:00 p.m.; any food remaining by 9:00 a.m. the next day was removed. The animals had free access to drinking water. Monkeys were housed individually during pregnancy in stainless steel cages (69 cm × 61 cm × 75 cm) according to the National Institute of Health guidelines. They continued to care for their offspring in these cages until weaning. The duration of pregnancy and the body weight of the offspring at birth were recorded.

We obtained approval for the study and conducted the experiments according to the guidelines of the Institutional Animal Care and Use Committee, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, University of Tokyo.

Collection of Blood Samples and PCB Analysis

Thirty pregnant cynomolgus monkeys were raised in Japan. Blood samples were collected during the late pregnancy period (90–100 days of pregnancy; the pregnancy duration for cynomolgus monkeys is 150–160 days). Serum samples (3,000g) were separated centrifugally for 15 min and preserved at -70°C until analysis. Blood analysis for serum PCBs was conducted by a specialized laboratory (Shimadzu Techno-Research, Kyoto, Japan). The following specific PCBs were measured: PeCB #118, PeCB #105, HxCB #153, HxCB #164/#163, HxCB #138, HpCB #180, HpCB #170. The total PCB concentration in serum was calculated by adding the results from each specific compound.

Grouping

From 30 pregnancy monkeys, we chose the 10 with the lowest serum PCB levels (median, 11 pg/g) and the 10 with the highest serum PCB levels (median, 22 pg/g) for further observation of mother–infant pairs without abnormal delivery. Sex ratio of infant depended on chance 50:50 (high-group male: 5, high-group female: 5, low-group male: 5, low-group female: 5). The high-PCB group was representative of a natural exposure level of above 15 pg/g total plasma PCB concentration.

Observation Procedure

Each mother and infant lived together in the same cage (69 cm × 61 cm × 75 cm). We observed mother–infant behavior twice per week during the first 90 days after birth, when infants rapidly undergo large developmental changes, and once per week during the period from 90 to 180 days after birth. The observation started in the morning, before food was supplied. Interactions between the mother and infant in their home cage were recorded for 20 min using a digital video camera. The front mesh of the cage was replaced with an acrylic board for the observation period.

Video recordings of the mother and infant were analyzed separately using the one–zero sampling method every 5 s. We excluded the first and the last 5 min of the 20-min digital video record from analysis, to eliminate the effects of the human influence of the animal technician who switched the video camera on and off. Observed infant behaviors were categorized into 19 previously established behavior categories (Tab. 1). Observers were blind to all information about the subjects (sex, PCB level). We used The Observer 5.0 (Noldus Information Technology, Wageningen, Netherlands) analytical software. Total observation time for each mother–infant pair was 11200 hr for all 20 pairs.

Statistical Analysis

For each behavioral item, we calculated the percentage of total observation time during which it occurred. Each behavioral change was expressed graphically as an average for each month. Infant behaviors were first analyzed by discriminant analysis and then using principal component analysis. The principal component scores of each behavioral category were then analyzed by a three-way analysis of variance (ANOVA). All statistical analyses were performed using SPSS (SPSS Inc., Chicago, USA) and StatView (Hulinks Inc., Tokyo, Japan). Significance was set at $p < .05$.

RESULTS

General Observations

Throughout this study, neither mother nor infants showed gross physical abnormalities that could be regarded as an adverse effect of maternal plasma PCB contamination level. No fetal or neonatal deaths occurred among the 20 pregnant animals. Gestation period and infants' body weights at birth are summarized in Table 2. Differences in PCB concentration had no significant effect on gestation length or body weight at birth. Mother's body weight and age of pregnancy did not show significant difference (*mean body weight*: low-group 5.42 kg, high-group 4.58kg; *mean age*: low-group 7.9 years, high-group 6.6 years, generally healthy).

Maternal Plasma PCB Contamination Level

Figure 1 shows the plasma PCB levels observed in the blood of pregnant monkeys, separated on the basis of the

Table 1. Behavioral Categories of Infant in the Mother–Infant Interactions

Item (Abbreviation)	Explanation
Social behaviors	
Infant	
Approach (Appr)	Approach to mother within its reach
Contact cling (Cnct)	Active body contact excluding ventral contact
Finger sucking	Sucking own finger
Lip smacking (Lips)	Movements of lips rhythmically sometimes with click noise
Look	Infant watches mother's face
Nipple contact (Nipc)	Sucking mother's nipple
Orient (Ornt)	Paying attention to animal and human outside cage. Reaction to voice and noise chiefly
Proximity (Prox)	Sitting or standing within mother's reach
Reject/withdraw (Rjwz)	Rejection of mother's approach or withdrawal at the corners of cage sometimes shaking its head
Social exploration (Soce)	Nonaggressive interactions with mother such as licking and visual exploratory action to mother
Play	Play with mother
Ventral contact (Vntc)	Abdominal cling to mother
Mother	
Approach (Appr)	Approach to infant within its reach
Attack (Atck)	Violent interaction with infant, such as bites, pulling infant's hair, and others
Hostility	Fear and aggression or inimical to infant
Hold	Get her arms wrapped around. Hug
Lip smacking (Lips)	Smacking lips and/or clattering teeth toward infant
Look	Mother watches infant's face
Orient (Ornt)	Paying attention to voice and/or noise from outside
Reject/withdraw (Rjwz)	Rejection of infant's approach or withdrawal at the corners of cage sometimes shaking its head
Social exploration (Soce)	Nonaggressive interactions with infant such as licking and visual exploratory action to its infant
Social grooming (Soeg)	Picking and/or spreading of infant's fur
Play	Play with infant
Threat (Thrt)	Threat to infant (pulled-back ear with open mouth shaping a little "o", gazing infant aggressively)
Other behaviors	
Common to infant and mother	
Auto grooming (Autg)	Grooming oneself
Environmental exploration (Enve)	Exploratory actions to surroundings with four limbs or mouth (licked the glass.)
Inaction	Do nothing
Locomotion (Loco)	Moving on foot or brachiating on cling
Visual exploration	Looking out of the cage from gap between front acyl board and the wall and seeing wire of floor
Self-directed behavior (Sifd)	Stimulating oneself by its mouth, hand, or foot, biting or licking for a long time
Stereotypy (Styp)	Refrain the same pattern behavior in the monotonous rhythm

Table 2. Effect of PCB-Exposure on Gestation Length and Body Weight at Birth in Cynomolgus Monkeys

PCBs Concentration	Low		High	
	Male	Female	Male	Female
Sex of Infant				
Number of pregnant animal	10		10	
Number of animal normally delivered	5	5	5	5
Gestational length (days) ^a	165.4 ± 4.1	161.2 ± 2.6	165.4 ± 5.2	158.6 ± 1.7
F1 body weight at birth (g) ^a	342 ± 26	325 ± 33	390 ± 44	315 ± 22
Number of animal subjected to observations	5	5	5	5

^aNormally delivered mothers and infants were used.

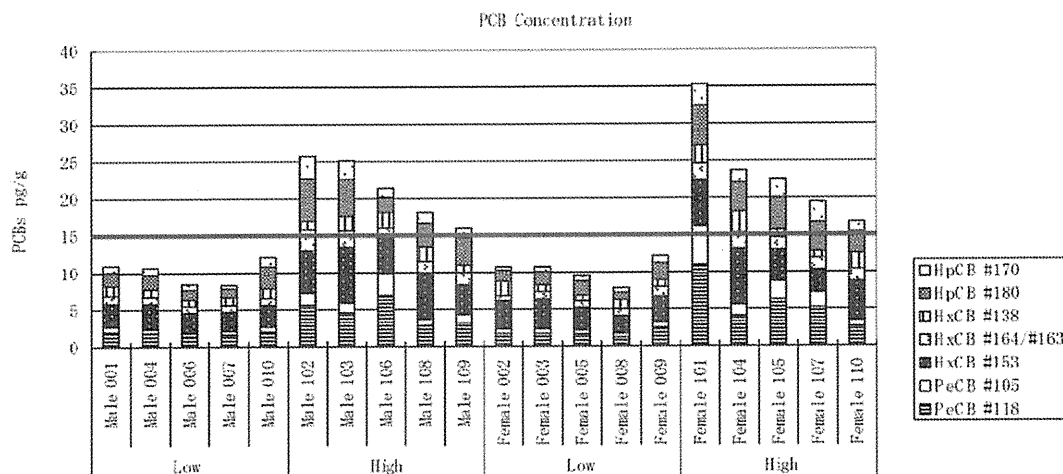


FIGURE 1 Maternal plasma PCB concentration. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

sex of their offspring. Of the specific PCBs that were analyzed, PeCB #118 and HxCB #153 contributed most to total PCB levels. In the low PCB group, the mean concentration of total PCB was 10.126 pg/g ($SD = 1.50$) in mothers with male offspring ($n = 5$) and 10.214 pg/g ($SD = 1.46$) in mothers with female offspring. In the high-PCB group, the average mean total PCB concentration was 21.216 pg/g ($SD = 3.83$) in mothers with male offspring and 23.530 pg/g ($SD = 6.35$) in mothers with female offspring.

Infant Behaviors Differ Across Groups

Discriminant analysis was performed to analyze the behavior of infant monkeys (Fig. 2). Behaviors differed

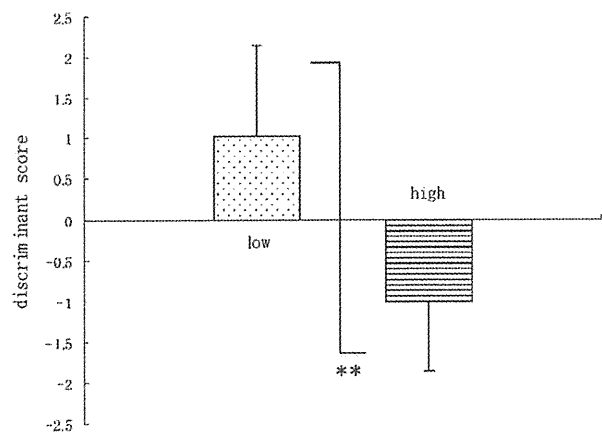


FIGURE 2 Discriminant analysis (low-PCB group–high-PCB group). The analysis significantly differentiated the low group from the high control group. The discriminant scores for the two groups are shown. * $p < .05$.

significantly between the high- and low-PCB concentration groups. The representative category which concerned in a discriminant score was locomotion (positive factor) and visual exploration (negative factor). That is, infants in the low-PCB group tended to be more active than those in the high-PCB group.

The Relationship Between Behavior and PCB Exposure

Infants exposed to higher levels of PCB tended to spend less time watching or approaching their mother or in active movement during early development. We performed a principal component analysis of the behavior of infant monkeys to further assess how the two groups differed. Seven factors were extracted with a cumulative contribution of 74.714%. Three-way ANOVA was conducted to further explore how these factors related to PCBs, age, and sex.

Three-way ANOVA (PCB \times SEX \times AGE) showed significant main effects of PCB concentration in factor 1 (the first factor of principal component analysis; $F_{1,92} = 7.888$, $p < .0061$) and factor 3 ($F_{1,92} = 8.939$, $p < .0036$). A significant interaction between PCBs and age was also shown for both factor 1 ($F_{1,92} = 21.439$, $p < .0001$) and factor 3 ($F_{1,92} = 20.822$, $p < .0001$). Factors 1 and 3 clearly contributed to the observed differences between the high and low PCB groups. The SEX variable showed no main effects or interactions. Correlation analysis further revealed a significant negative correlation ($r = -.318$, $p < .01$) between the principal component score of factor 1 and PCB concentration, indicating that infant monkey behavior was affected by PCB exposure.

Both high and low PCB groups showed developmental changes over the course of the lactation period.

Both groups behaved similarly during the earlier half of the lactation period, but behavior differed across groups during the later half of the lactation period (5–6 months after birth). Figure 3 illustrates this observation in factor 1, to which the behaviors of approach, proximity, look, and locomotion were high contributors. No significant differences were observed in behaviors during the earlier half of the lactation period or between sexes. In the low-PCB group, these behaviors increased in the later half of the lactation period, indicative of normal development. However, in the high-PCB group, mother and infant interactions did not increase in the later half of the lactation period.

For each behavior, three-way ANOVA (PCB \times SEX \times AGE) detected a significant main effect of PCB level (approach, $F_{1,16} = 30.7, p < .0001$; proximity, $F_{1,16} = 17.5, p < .0007$; look, $F_{1,16} = 24.5, p < .0001$; locomotion, $F_{1,16} = 33.2, p < .0001$) and a significant interaction between PCB exposure and age (approach, $F_{4,64} = 40.3, p < .0001$; proximity, $F_{4,64} = 33.5, p < .0007$; look, $F_{4,64} = 48.334, p < .0001$; locomotion, $F_{4,64} = 36.3, p < .0001$) during the later half of the lactation period. Figure 4 shows the relationship between infant behavior at 6 months of age and maternal PCB concentration. A negative correlation was observed between PCB concentration and the frequency of approach ($r = -.635, df = 18, p < .01$), proximity ($r = -.520, df = 18, p < .05$), look

($r = -.691, df = 18, p < .01$), and locomotion ($r = -.696, df = 18, p < .01$).

DISCUSSION

The CNS is thought to be susceptible to endocrine disrupting chemicals for several reasons. Many chemical substances of environmental origin, including PCBs, can pass through the blood–brain barrier easily because they are lipophilic. Once in the brain, lipophilic chemicals are difficult to excrete. PCBs also accumulate in breast milk, which is high in fat, which leads to higher exposure of infants. Furthermore, liver and kidney function is undeveloped in infants, reducing their ability to metabolize, and/or excrete PCBs. These factors compound to make developing infants more susceptible to chemical exposure than adults, which can cause irreversible damage (Tanaka, 2004).

In this study, our aim was to investigate the effect of PCBs, which an organism had already taken in from its environment (i.e., natural exposure). Maternal plasma PCB levels during pregnancy were regarded as indicative of the extent of fetal exposure to PCBs. Although the cynomolgus monkeys described in this study were bred in the same colony and consumed the same water and diet, we observed clear individual differences in animals' natural exposure to PCBs. We compared age and body

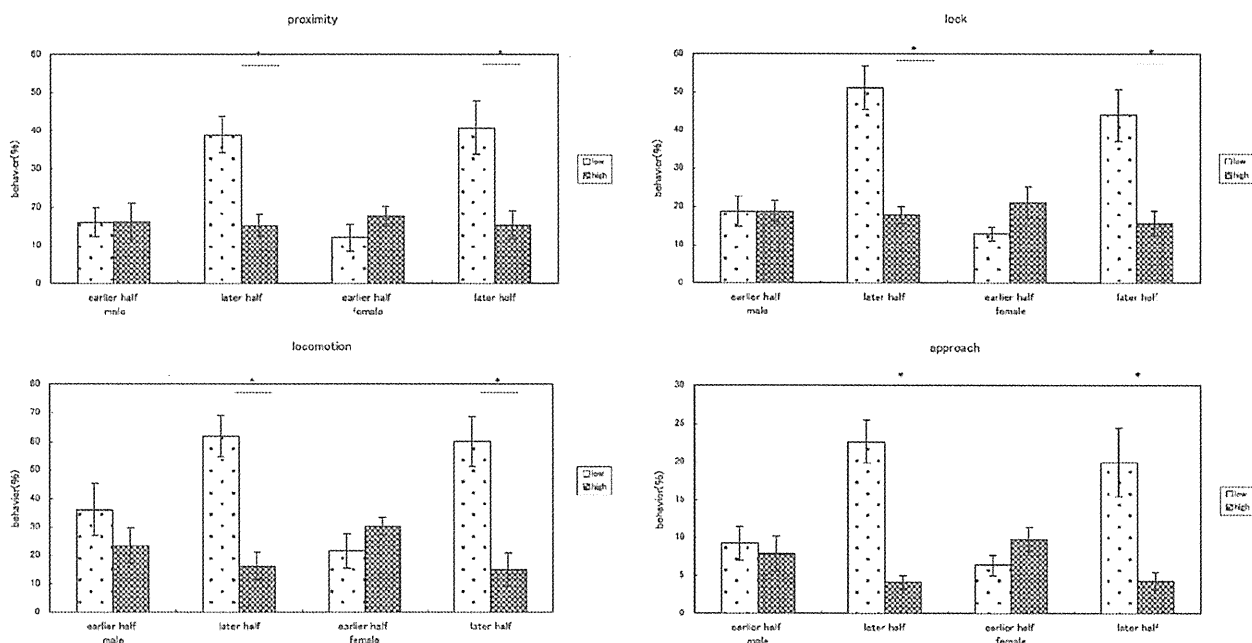


FIGURE 3 Developmental change of infant behaviors. All the behaviors above have proven to be significantly different by ANOVA.