

**FIGURE 4** The relationship between infant behavior at 6 months of age and maternal PCB concentration.

weight of the PCBs-high and -low groups as a measure of exposure length or body fat. Neither age nor weight showed significant difference between two groups. It, however, does not mean that the difference of PCBs does not stem from mother's PCBs intake period and its amount. Another investigation should be needed if we identified the cause of the difference. Anyway, all dams were primiparous. Understanding the factors that underlie variation in the uptake and accumulation of PCBs is an important issue for future study.

Compared with PCBs contaminated in a human umbilical cord blood, monkey's PCBs level seemed to be considerably low as far as that was concerned in the present study. It is possible that the amount of PCBs naturally taken from the environment was standardized by a highly controlled husbandry system. We could, however,

mention multiple factors as variety of individual PCBs level such as mother's diet ingestion and water intake at any stage of their development. Although PCBs level of the infants were not measured, it was supposed that the infant borne by the mother of the higher level should be exposed to the higher level of PCBs all through fetal and lactation period.

We examined what types of behaviors were most affected by maternal PCB level by using principal component analysis and found a negative correlation between factor 1 and maternal PCB levels. The behaviors that contributed to factor 1 involved "activity including relations to mother." Infants in the high-PCB group showed a tendency not to watch or approach their mothers or to move actively in the early period of development, which could be regarded as autistic tendencies. We

observed rapid development in infants in the low-PCB group in the later half of the lactation period, and no change in the high-PCB group. Behavioral differences had developed definitively within several months of birth and appeared to have a lasting impact on developmental progress. During the first 6 months of life, infants' activity should increase, and they should establish increasingly close ties with other monkeys. Higher of maternal plasma PCB levels may impede infants' ability to establish a close relationship with their mothers.

An increasing number of synthetic chemicals, including PCBs and dioxins, are suspected to affect the thyroid system by inhibiting TH synthesis or the binding of TH to its receptors (Hauser & Rovet, 1998; Honda, Wada, & Nakashima, 2009). Several studies have reported that perinatal exposure to these chemicals reduces the concentration of TH in the serum and brain and finally causes impaired CNS function, leading to a lower intelligence quotient and behavioral changes in offspring (Brouwer et al., 1995; Chen et al., 1992; Jacobson & Jacobson, 1996; Porterfield, 2000). Furthermore, PCBs have been reported to disrupt sex steroid hormones and relate to testosterone levels (Qin et al., 2007; Turyk et al., 2008). Baron-Cohen et al. have discussed that fetal testosterone levels may shape the neural mechanisms underlying social development (Knickmeyer et al., 2005; Lutchmaya et al., 2004).

Some developmental disorder or mild developmental disorder has been associated with an inability to build relationships with other people. ADHD is another potentially devastating disability that affects behavior in numerous domains, with the result that "individuals with ADHD cannot depend upon themselves to control their own behavior" (Rice, 2000). Rice (2000) also discussed that like patients with ADHD, monkeys exposed developmentally to lead or PCBs also perform differently from control monkeys on a fixed interval schedule of reinforcement, which requires the temporal organization of behavior using only internal cues. These first social skills are cultivated in maternal relationships during development.

In social animals, the ability to maintain relationships is essential. A mutual relationship accompanied by physical contact between the infant and mother for several months after birth is indispensable for the behavioral development of infant monkeys (Minami, 1994) and strongly influences their later social development and peer relationships. It is believed that when pregnant women or breastfeeding mothers drink alcohol, it affects their children through their blood or breast milk. Similarly, PCBs exposure may cause developmental problems. In the present study, we have shown that maternal plasma PCB contamination levels affect the interactive behaviors

between mother and infant in cynomolgus monkeys. The observed behavioral tendencies in infant monkeys exposed to higher prenatal PCB levels suggest that maternal PCB levels affect the CNS development of the next generation.

## NOTES

This research was partially supported by KAKENHI (Grant-in-Aid for Scientific Research (S), 14104020) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan. This study was also supported by the Core Research for Evolutional Science and Technology (CREST) program of the Japan Science and Technology Agency.

## REFERENCES

- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (2000). Toxicological profile for polychlorinated biphenyls (PCBs). Atlanta, GA: Department of Health and Human Services, Public Health Service.
- Akagi, K., & Okumura, M. (1985). Association of blood pressure and PCB level in yusho patients. *Environmental Health Perspectives*, 59, 37–39.
- Baron-Cohen, S., Auyeung, B., Ashwin, E., & Knickmeyer, R. (2009). Fetal testosterone and autistic traits: A response to three fascinating commentaries. *British Journal of Psychology*, 100, 39–47.
- Brouwer, A., Ahlborg, U. G., Van den Berg, M., Birnbaum, L. S., Boersma, E. R., Bosveld, B., et al. (1995). Functional aspects of developmental toxicity of polyhalogenated aromatic hydrocarbons in experimental animals and human infants. *European Journal of Pharmacology*, 293, 1–40.
- Chapman, E., Baron-Cohen, S., Auyeung, B., Knickmeyer, R., Taylor, K., & Hackett, G. (2006). Fetal testosterone and empathy: Evidence from the empathy quotient (EQ) and the "reading the mind in the eyes" test. *Social Neuroscience*, 1, 135–148.
- Chen, Y. C., Guo, Y. L., Hsu, C. C., & Rogan, W. J. (1992). Cognitive development of yu-cheng ("oil disease") children prenatally exposed to heat-degraded PCBs. *The Journal of the American Medical Association*, 268, 3213–3218.
- Crosby, D. (1998). *Environmental toxicology and chemistry*. Oxford, UK: Oxford University Press.
- Haddow, J. E., Palomaki, G. E., Allan, W. C., Williams, J. R., Knight, G. J., Gagnon, J., et al. (1999). Maternal thyroid deficiency during pregnancy and subsequent neuropsychological development of the child. *The New England Journal of Medicine*, 341, 549–555.
- Hansen, L. G. (1999). *The ortho side of PCBs: Occurrence and disposition*. Boston, MA: Kluwer Academic Publishers.
- Hauser, P., McMillin, J. M., & Bhatara, V. S. (1998). Resistance to thyroid hormone: Implications for neurodevelopmental research on the effects of thyroid hormone disruptors. *Toxicology and Industrial Health*, 14, 85–101.

- Hauser, P., & Rovet, J. (1998). Thyroid diseases of infancy and childhood. Effects on behavior and intellectual development. Washington, DC: American Psychiatric Press.
- Hauser, P., Soler, R., Brucker-Davis, F., & Weintraub, B. D. (1997). Thyroid hormones correlate with symptoms of hyperactivity but not inattention in attention deficit hyperactivity disorder. *Psychoneuroendocrinology*, 22, 107–114.
- Hetzel, B. S. (1994). Iodine deficiency and fetal brain damage. *The New England Journal of Medicine*, 331, 1770–1771.
- Honda, T., Wada, M., & Nakashima, K. (2009). PCBs and PCDD/DFs in waste oil illegally dumped and neglected for more than 20 years. *Journal of Environmental Science and Health. Part A, Toxic/hazardous Substances and Environmental Engineering*, 44, 654–660.
- Hosoda, R., Nakayama, K., Kato-Negishi, M., Kawahara, M., Muramoto, K., & Kuroda, Y. (2003). Thyroid hormone enhances the formation of synapses between cultured neurons of rat cerebral cortex. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 23, 895–906.
- Ikeda, M. (1996). Comparison of clinical picture between Yusho/Yucheng cases and occupational PCB poisoning cases. *Chemosphere*, 32, 559–566.
- Ingudomnukul, E., Baron-Cohen, S., Wheelwright, S., & Knickmeyer, R. (2007). Elevated rates of testosterone-related disorders in women with autism spectrum conditions. *Hormones and Behavior*, 51, 597–604.
- Jacobson, J. L., & Jacobson, S. W. (1996). Intellectual impairment in children exposed to polychlorinated biphenyls in utero. *The New England Journal of Medicine*, 335, 783–789.
- Johanson, C. E. (1980). Permeability and vascularity of the developing brain: Cerebellum vs cerebral cortex. *Brain Research*, 190, 3–16.
- Kanagawa, Y., Matsumoto, S., Koike, S., Tajima, B., Fukiwake, N., Shibata, S., et al. (2008). Association of clinical findings in yusho patients with serum concentrations of polychlorinated biphenyls, polychlorinated quarterphenyls and 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran more than 30 years after the poisoning event. *Environmental Health*, 7, 47.
- Kato, Y., Haraguchi, K., Yamazaki, T., Ito, Y., Miyajima, S., Nemoto, K., et al. (2003). Effects of polychlorinated biphenyls, kanechlor-500, on serum thyroid hormone levels in rats and mice. *Toxicological Sciences*, 72, 235–241.
- Kimura-Kuroda, J., Nagata, I., & Kuroda, Y. (2007). Disrupting effects of hydroxy-polychlorinated biphenyl (PCB) congeners on neuronal development of cerebellar purkinje cells: A possible causal factor for developmental brain disorders? *Chemosphere*, 67, S412–S420.
- Kitamura, S., Jinno, N., Suzuki, T., Sugihara, K., Ohta, S., Kuroki, H., et al. (2005). Thyroid hormone-like and estrogenic activity of hydroxylated PCBs in cell culture. *Toxicology*, 208, 377–387.
- Knickmeyer, R., Baron-Cohen, S., Raggatt, P., & Taylor, K. (2005). Foetal testosterone, social relationships, and restricted interests in children. *Journal of Child Psychology and Psychiatry, and Allied Disciplines*, 46, 198–210.
- Knickmeyer, R., Baron-Cohen, S., Raggatt, P., Taylor, K., & Hackett, G. (2006). Fetal testosterone and empathy. *Hormones and Behavior*, 49, 282–292.
- Leung, H. W., Kerger, B. D., Paustenbach, D. J., Ryan, J. J., & Masuda, Y. (2007). Concentration and age-dependent elimination kinetics of polychlorinated dibenzofurans in yucheng and yusho patients. *Toxicology and Industrial Health*, 23, 493–501.
- Lutchmaya, S., Baron-Cohen, S., Raggatt, P., Knickmeyer, R., & Manning, J. T. (2004). 2nd to 4th digit ratios, fetal testosterone and estradiol. *Early Human Development*, 77, 23–28.
- Masuda, Y. (1996). Approach to risk assessment of chlorinated dioxins from yusho PCB poisoning. *Chemosphere*, 32, 583–594.
- Masuda, Y., Kuroki, H., Haraguchi, K., & Nagayama, J. (1985). PCB and PCDF congeners in the blood and tissues of yusho and yu-cheng patients. *Environmental Health Perspectives*, 121, 53–58.
- Millichap, J.G. (2008). Etiologic classification of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Pediatrics*, 121(2), e358–365.
- Minami, T. (1994). Series Human's Development 10. Development of monkey's behavior. University of Tokyo Press. (in Japanese)
- Minami, T. (1997). Contact behavior in early mother–infant relations in macaques. *The Japanese Journal of Animal Psychology*, 47, 129–136.
- Ministry of Health, Labor and Welfare, Chemical Safety Office Evaluation and Licensing Division Pharmaceutical and Food Safety Bureau. (2005). Advisory Committee on Health Effects of Endocrine Disruptors. The Supplement II to the Intermediary Report.
- Morreale de Escobar, G., Obregon, M. J., & Escobar del Rey, F. (2000). Is neuropsychological development related to maternal hypothyroidism or to maternal hypothyroxinemia? *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 85, 3975–3987.
- Ness, D. K., Schantz, S. L., Moshtaghian, J., & Hansen, L. G. (1993). Effects of perinatal exposure to specific PCB congeners on thyroid hormone concentrations and thyroid histology in the rat. *Toxicology Letters*, 68, 311–323.
- Osborn, D. A. (2000). Thyroid hormone for preventing of neurodevelopmental impairment in preterm infants. *Cochrane Database of Systematic Reviews (Online)*, 2(2), CD001070.
- Park, J. S., Bergman, A., Linderholm, L., Athanasiadou, M., Kocan, A., Petrik, J., et al. (2008). Placental transfer of polychlorinated biphenyls, their hydroxylated metabolites and pentachlorophenol in pregnant women from eastern Slovakia. *Chemosphere*, 70, 1676–1684.
- Park, J. S., Linderholm, L., Charles, M. J., Athanasiadou, M., Petrik, J., Kocan, A., et al. (2007). Polychlorinated biphenyls and their hydroxylated metabolites (OH-PCBS) in pregnant women from eastern Slovakia. *Environmental Health Perspectives*, 115, 20–27.
- Porterfield, S. P. (2000). Thyroidal dysfunction and environmental chemicals—Potential impact on brain development. *Environmental Health Perspectives*, 108, 433–438.
- Porterfield, S. P., & Hendrich, C. E. (1993). The role of thyroid hormones in prenatal and neonatal neurological development—Current perspectives. *Endocrine Reviews*, 14, 94–106.

- Qin, Z. F., Qin, X. F., Yang, L., Li, H. T., Zhao, X. R., & Xu, X. B. (2007). Feminizing/demasculinizing effects of polychlorinated biphenyls on the secondary sexual development of *Xenopus laevis*. *Aquatic Toxicology*, 84, 321–327.
- Rice, D. C. (1997). Effect of postnatal exposure to a PCB mixture in monkeys on multiple fixed interval-fixed ratio performance. *Neurotoxicology and Teratology*, 19, 429–434.
- Rice, D. C. (1999). Behavioral impairment produced by low-level postnatal PCB exposure in monkeys. *Environmental Research*, 80, S113–S121.
- Rice, D. C. (2000). Parallels between attention deficit hyperactivity disorder and behavioral deficits produced by neurotoxic exposure in monkeys. *Environmental Health Perspectives*, 108, 405–408.
- Rice, D. C., & Hayward, S. (1997). Effects of postnatal exposure to a PCB mixture in monkeys on nonspatial discrimination reversal and delayed alternation performance. *Neurotoxicology*, 18, 479–494.
- Rodier, P. M. (1994). Vulnerable periods and processes during central nervous system development. *Environmental Health Perspectives*, 102, 121–124.
- Schantz, S. L., Levin, E. D., Bowman, R. E., Heironimus, M. P., & Laughlin, N. K. (1989). Effects of perinatal PCB exposure on discrimination-reversal learning in monkeys. *Neurotoxicology and Teratology*, 11, 243–250.
- Simic, N., Asztalos, E. V., & Rovet, J. (2009). Impact of neonatal thyroid hormone insufficiency and medical morbidity on infant neurodevelopment and attention following preterm birth. *Thyroid*, 19, 395–401.
- Tanaka, M. (2004). The effects of endocrine disrupting chemicals in the nervous system. *Niigata Medical Journal*, 118, 396–399 (in Japanese).
- Turyk, M. E., Persky, V. W., Imm, P., Knobeloch, L., Chatterton, R., & Anderson, H. A. (2008). Hormone disruption by PBDEs in adult male sport fish consumers. *Environmental Health Perspectives*, 116, 1635–1641.
- Wang, S. L., Tsai, P. C., Yang, C. Y., & Guo, Y. L. (2008). Increased risk of diabetes and polychlorinated biphenyls and dioxins: A 24-year follow-up study of the yucheng cohort. *Diabetes Care*, 31, 1574–1579.
- Weiss, R. E., Stein, M. A., & Refetoff, S. (1997). Behavioral effects of liothyronine (L-T3) in children with attention deficit hyperactivity disorder in the presence and absence of resistance to thyroid hormone. *Thyroid*, 7, 389–393.
- WHO, ILO and UNEP. International Programme on Chemical Safety (IPCS). (2002) *Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors*.
- Yang, C. Y., Wang, Y. J., Chen, P. C., Tsai, S. J., & Guo, Y. L. (2008). Exposure to a mixture of polychlorinated biphenyls and polychlorinated dibenzofurans resulted in a prolonged time to pregnancy in women. *Environmental Health Perspectives*, 116, 599–604.

## Reston Ebolavirus Antibodies in Bats, the Philippines

**To the Editor:** Filoviruses cause highly lethal hemorrhagic fever in humans and nonhuman primates, except for Reston Ebolavirus (REBOV), which causes severe hemorrhagic fever in macaques (1,2). REBOV epizootics among cynomolgus macaques occurred in 1989, 1990, 1992, and 1996 (2) and among swine in 2008 (3). African fruit bats have been suggested to be natural reservoirs for Zaire Ebolavirus and Marburg virus (4–6). However, the natural reservoir of REBOV in the Philippines is unknown. Thus, we determined the prevalence of REBOV antibody-positive bats in the Philippines.

Permission for this study was obtained from the Department of Environment and Natural Resources, the Philippines, before collecting bat specimens. Serum specimens from 141 wild-caught bats were collected at several locations during 2008–2009. The bat species tested are summarized in the Table. Captured bats were humanely killed and various tissues were obtained. Carcasses were then provided to the Department of Environment and Natural Resources for issuance of a transport permit.

We used immunoglobulin (Ig) G ELISAs with recombinant nucleoprotein (NP) and glycoprotein (GP) of REBOV (7) to determine REBOV antibody prevalence. REBOV NP and GP were expressed and purified from Tn5 cells infected with recombinant baculoviruses AcResNP and AcResGPDTM, which express NP and the ectodomain of GP with the histidine tag at its C-terminus. We also used histidine-tagged recombinant Crimean-Congo hemorrhagic fever virus NP as a negative control antigen in the IgG ELISA to confirm specificity of reactivity.

In IgG ELISAs for bat specimens, positive results were detected by using rabbit anti-bat IgG and horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG. Anti-bat (*Rousettus aegyptiacus*) rabbit IgG strongly cross-reacts with IgGs of other bat species, including insectivorous bats (8). Bat serum samples were 4-fold serially diluted (1:100–1:6,400) and tested by using IgG ELISAs. Results of IgG ELISAs were the sum of optical densities at serum dilutions of 1:100, 1:400, 1:1,600, and 1:6,400. Cutoff values (0.82 for both IgG ELISAs) were determined by using serum specimens from REBOV antibody-negative bats.

Among 16 serum samples from *R. amplexicaudatus* bats, 5 (31%) captured at either the forest of Diliman (14°38'N, 121°2'E) or the forest of Quezon (14°10'N, 121°50'E) had positive results in the IgG ELISA for REBOV NP, and 5 (31%) captured at the forest of Quezon had positive results in the IgG ELISA for REBOV GP. The REBOV NP antibody-positive bats serum samples were confirmed to be NP antibody positive in the IgG ELISA by using glutathione-S-transferase-tagged partial REBOV NP antigen (9). Three samples had positive results in both IgG ELISAs (Table). Serum samples from other bat species had negative results in IgG ELISAs.

All bat serum samples were also tested by indirect immunofluorescence assays (IFAs) that used HeLa cells expressing NP and GP (10). In the IFAs, 2 samples from *R. amplexicaudatus* bats captured at the forest of Diliman and the forest of Quezon had high titers (1,280 and 640, respectively) of NP-specific antibodies, and 1 sample from an *R. amplexicaudatus* bat captured at the forest of Quezon had a positive result in the GP-specific IFA (titer 20). All IFA-positive samples were also positive in the IgG ELISA (Table).

The forest of Diliman is ≈30 km from the monkey facility and the Bulacan farm where REBOV infections in monkeys and swine, respectively, were detected. The forest of Quezon is ≈60 km from the monkey facility. Samples from other bat species had negative results in IFAs. We also performed heminested reverse transcription PCR specific for the REBOV NP gene with spleen specimens from all 16 *R. amplexicaudatus* bats but failed to detect any REBOV-specific amplicons.

REBOV-specific antibodies were detected only in *R. amplexicaudatus* bats, a common species of fruit bat, in the Philippines. In Africa, *R. aegyptiacus* bats, which are genetically similar to *R. amplexicaudatus* bats, have been

Table. REBOV-specific IgG in *Rousettus amplexicaudatus* bats and other bats, the Philippines\*

Bat ID	Collection site	ELISA optical density		IFA titer	
		REBOV NP	REBOV GP	REBOV NP	REBOV GP
1539	FD	<b>2.13</b>	–0.21	<b>1,280</b>	<20
1632	FQ1	<b>0.88</b>	0.2	<20	<20
1642	FQ1	0.36	<b>5.22</b>	<20	<b>20</b>
1643	FQ1	<b>1.26</b>	<b>0.92</b>	<20	<20
1651	FQ1	<b>1.61</b>	<b>1.02</b>	<20	<20
1657	FQ1	–0.45	<b>1.69</b>	<20	<20
1660	FQ1	<b>3.8</b>	<b>2.51</b>	<b>640</b>	<20

\*Cutoff optical density of ELISA was 0.82 (sum of optical densities at serum dilutions of 1:100, 1:400, 1:1,600, and 1:6,400). Values in **boldface** are positive results. REBOV, Reston Ebolavirus; Ig, immunoglobulin; IFA, indirect immunofluorescence assay; ID, identification; NP, nucleoprotein; GP, glycoprotein; FD, forest of Diliman at the University of the Philippines Diliman campus; FQ1, forest at the Agricultural College in Province of Quezon, the Philippines. The other 9 *R. amplexicaudatus* bats collected at FQ1 had negative results for all assays. The following bat species also had negative results: 5 *Eonycteris spelaea*, 35 *Cynopterus brachyotis*, 38 *Ptenochirus jagoli*, 6 *Haplonycteris fischeri*, 2 *Macroglossus minimus*, 2 *Rhinolophus rufus*, 1 *Rhinolophus arcuatus*, 9 *Emballonura alecto*, 2 *Pipistrellus javanicus*, 5 *Scotophilus kuhlii*, 8 *Miniopterus australis*, 8 *M. schreibersi*, 1 *M. tristis tristis*, 1 *Hipposideros diadema*, 1 *Myotis macrotarsus*, and 1 bat of unknown species.

shown to be naturally infected with Zaire Ebolavirus and Marburg virus. Thus, *R. amplexicaudatus* bats are a possible natural reservoir of REBOV. However, only 16 specimens of *R. amplexicaudatus* bats were available in this study, and it will be necessary to investigate more specimens of this species to detect the REBOV genome or antigens to conclude the bat is a natural reservoir for REBOV.

We have shown that *R. amplexicaudatus* bats are putatively infected with REBOV or closely related viruses in the Philippines. Antibody-positive bats were captured at the sites near the study areas, where REBOV infections in cynomolgus monkeys and swine have been identified. Thus, bats are a possible natural reservoir of REBOV. Further analysis to demonstrate the REBOV genome in bats is necessary to conclude that the bat is a reservoir of REBOV.

#### Acknowledgments

We thank the staff at the Special Pathogens Laboratory, National Institute of Infectious Diseases, and Maiko Endo for taking care of bats at the university farm, and Edison Cosico and Eduardo Eres for collecting the wild bats in the Philippines.

This study was supported in part by a grant-in-aid from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan and the Japan Society for the Promotion of Science KAKENHI.

**Satoshi Taniguchi,  
Shumpei Watanabe,  
Joseph S. Masangkay,  
Tsutomu Omatsu,  
Tetsuro Ikegami, Phillip Alviola,  
Naoya Ueda, Koichiro Iha,  
Hikaru Fujii, Yoshiyuki Ishii,  
Tetsuya Mizutani,  
Shuetsu Fukushima,  
Masayuki Saijo, Ichiro Kurane,  
Shigeru Kyuwa, Hiroomi Akashi,  
Yasuhiro Yoshikawa,  
and Shigeru Morikawa**

Author affiliations: University of Tokyo, Tokyo, Japan (S. Taniguchi, S. Watanabe, N. Ueda, K. Iha, H. Fujii, Y. Ishii, S. Kyuwa, H. Akashi, Y. Yoshikawa); National Institute of Infectious Diseases, Tokyo (S. Taniguchi, S. Watanabe, T. Omatsu, K. Iha, T. Mizutani, S. Fukushima, M. Saijo, I. Kurane, S. Morikawa); University of the Philippines, Laguna, the Philippines (J.S. Masangkay, P. Alviola); and University of Texas at Medical Branch, Galveston, Texas, USA (T. Ikegami)

DOI: 10.3201/eid1708.101693

#### References

1. Miranda ME, Ksiazek TG, Retuya TJ, Khan AS, Sanchez A, Fulhorst CF, et al. Epidemiology of Ebola (subtype Reston) virus in the Philippines, 1996. *J Infect Dis.* 1999;179(Suppl 1):S115-9. doi:10.1086/514314
2. Morikawa S, Saijo M, Kurane I. Current knowledge on lower virulence of Reston Ebola virus [in French]. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2007;30:391-8. doi:10.1016/j.cimid.2007.05.005
3. Barrette RW, Metwally SA, Rowland JM, Xu L, Zaki SR, Nichol ST, et al. Discovery of swine as a host for the Reston ebolavirus. *Science.* 2009;325:204-6. doi:10.1126/science.1172705
4. Leroy EM, Kumulungui B, Pourrut X, Rouquet P, Hassanin A, Yaba P, et al. Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. *Nature.* 2005;438:575-6. doi:10.1038/438575a
5. Pourrut X, Souris M, Towner JS, Rollin PE, Nichol ST, Gonzalez JP, et al. Large serological survey showing cocirculation of Ebola and Marburg viruses in Gabonese bat populations, and a high seroprevalence of both viruses in *Rousettus aegyptiacus*. *BMC Infect Dis.* 2009;9:159. doi:10.1186/1471-2334-9-159
6. Towner JS, Amman BR, Sealy TK, Carroll SA, Comer JA, Kemp A, et al. Isolation of genetically diverse Marburg viruses from Egyptian fruit bats. *PLoS Pathog.* 2009;5:e1000536. doi:10.1371/journal.ppat.1000536
7. Saijo M, Niikura M, Ikegami T, Kurane I, Kurata T, Morikawa S. Laboratory diagnostic systems for Ebola and Marburg hemorrhagic fevers developed with recombinant proteins. *Clin Vaccine Immunol.* 2006;13:444-51. doi:10.1128/CVI.13.4.444-451.2006
8. Omatsu T, Ishii Y, Kyuwa S, Milanda EG, Terao K, Yoshikawa Y. Molecular evolution inferred from immunological cross-reactivity of immunoglobulin G among Chiroptera and closely related species. *Exp Anim.* 2003;52:425-8. doi:10.1538/expanim.52.425
9. Ikegami T, Saijo M, Niikura M, Miranda ME, Calaor AB, Hernandez M, et al. Immunoglobulin G enzyme-linked immunosorbent assay using truncated nucleoproteins of Reston Ebola virus. *Epidemiol Infect.* 2003;130:533-9.
10. Ikegami T, Saijo M, Niikura M, Miranda ME, Calaor AB, Hernandez M, et al. Development of an immunofluorescence method for the detection of antibodies to Ebola virus subtype Reston by the use of recombinant nucleoprotein-expressing HeLa cells. *Microbiol Immunol.* 2002;46:633-8.

Address for correspondence: Shigeru Morikawa, Special Pathogens Laboratory, Department of Virology 1, National Institute of Infectious Diseases, 4-7-1 Gakuen, Musashimurayama, Tokyo 208-0011, Japan; email: morikawa@nih.go.jp

## Acute Hepatitis C Outbreak among HIV-infected Men, Madrid, Spain

**To the Editor:** In the past decade, hepatitis C virus (HCV) has emerged as a sexually transmitted infection (STI) among HIV-infected men who have sex with men (MSM). The epidemic was originally reported in several northern European countries (England, France, Germany, and the Netherlands) (1) and soon after in Australia (2) and the United States (3). Acute HCV acquisition was associated with group sex, unprotected receptive anal intercourse, and according to some studies, concomitant STI (4). Molecular phylogenetic studies suggested evidence of an international transmission network of MSM within northern Europe (1). However, expansion of the HCV epidemic among MSM to Spain (5) or to other

## 学 術

## 「One World, One Health」と獣医師

吉 川 泰 弘

北里大学獣医学部教授

## 2001年BSEから2010年口蹄疫まで

振り返ると2001年、BSEの恐怖が国民を襲ったとき、表に立って問題提起や説明責任を果たしたのはいずれも獣医師でした。科学的説明には山内一也、小澤義博先生が、行政の説明には栗本まさ子さんが、リスク評価には吉川が責任を負うことになりました。現場では、と畜場でのBSEの検査、農場の死亡牛の検査、あるいは輸入牛肉の検査など、食肉の安全性の確保の役割と、安心してもらうためのリスクコミュニケーションの役割を果たすのに努力しました。BSEの問題に端を発した内閣府の食品安全委員会の専門委員の約半数は獣医出身者です。

食品安全委員会の調査専門委員会のテーマは、食の安全に関する化学物質、病原体、残留農薬、遺伝子組換え産物等、課題は多岐にわたっています。リスク評価という新しい分野で、国民の食の安全に関する獣医師の役割が大きいことをアピールするとともに、その責任の大きさに戸惑う面もあったことと思います。

BSEに続く2003年のSARSのパニックの時にも、結局、テレビで説明の責任を負ったのは厚労省の獣医師である加地祥文さんでした。このウイルスが人から来たものではなく、自然宿主がコウモリであり、ハクビシンという耳慣れない動物が食用になり、それから人に来た可能性があるという理解するならば、最終的にヒトを巻き込む感染症であっても、獣医師が深くコミットする立場にあることになります。SARSコロナウイルスに感染したハクビシンを診断した獣医師は、法的に届出義務を負っています。

こうしたことは、1997年、香港から始まったH5N1という高病原性の鳥のインフルエンザが、ニワトリから野鳥に戻り、2005年に国際的に拡大し、ヒトを巻き込む危険性が指摘されたときにもみられました。北大の獣医師である喜田宏先生が自然界でのインフルエンザウイルスの振る舞いから、そのメカニズムやワクチンを含む対処法を説明してくれました。ヒトに来る前の動物由来感染症の研究がいかに重要か、またそのほとんどが獣医の研究によるものであることを如実に示してくれました。

その後2009年のパンデミックインフルエンザ（A/H1N1pandemic 2009）も結局、後半は厚労省の獣医師である中嶋健介さんが説明をする役割を引き受けてくれました。その起源が豚由来のインフルエンザウイルスの組換え体（re-assort）であれば、獣医師の説明責任が生じることになります。また、この疾病の国内侵入時の検疫には多くの獣医師が業務として一日中働いたわけです。陰で多くの苦労話を聞きました。そして、2010年の口蹄疫の流行は、各地の獣医師の支援により、大規模の流行とはいえ、幸い宮崎県内に封じ込めることができました。自衛隊員を含め、延べ約6万人に上る人々の努力により、収束を見ました。獣医師は述べ、約2万人が協力したといわれています。大動物の臨床獣医師さんの活躍と実力は、あちこちで耳にしました。このように、この10年間、獣医師が、いわゆる「小動物のお医者さん」とは別の分野で、東奔西走したことは明らかです。

獣医さんはどこに向かって走るのか？

こうした傾向は日本だけではありません。後述す

るように新興感染症の多くが動物に由来する感染症であり、容易にグローバル化すること、物流や人の移動が激しく、感染症の統御には、国際的に協調して取り組む必要があります。獣医師の役目と質の保証が問われています。さらに、国際貿易の拡大と自由化の中で食の安全を保障するもっとも重要な役割を、各国の獣医師が負うことになりました。生産から消費までの全過程の見張り役の責任を持たなければなりません。世界獣疫事務局（OIE）や国連の食糧農業機関（FAO）が、各国に獣医師の業務や検査の基準・勧告をだしており、その中には獣医師の重要な役割が書かれています。特にOIEのアドホック委員会が獣医教育の新しいミニマムコンピテンスの案を出しました（2010年11月）。これは、各国の獣医師が卒業するまでに最低限必要とする適格性を身に着けるために、教えなければならない教育内容の項目を示したものです。2011年にはコアカリキュラムの形で、各国に提案されることになります。

また、人口の増加に伴う食料の安定供給は世界的な課題です。畜産品や水産品は穀物と並んで、動物性蛋白質の唯一の供給源です。食料資源の確保は、動物の感染症のコントロールにかかっており、もっぱら獣医師の責任になっています。口蹄疫の様に、ヒトには通常感染・発症しない感染症を防御するのに、何故何十万、何百万頭の家畜を淘汰するのか？一般人には理解しにくいと思います。しかし、これは統御を誤ると、畜産品がなくなるという食料の安定供給（食の安全保障）に関わる世界的脅威であり、食の安全の問題とは別の次元の問題です。獣医師の役割は、食べて安全か危険かを守るだけでなく、食べるものを確保するという、持続的社会的維持という下支えをしているのです。

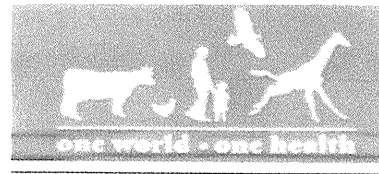
こうしてみると、新しい獣医さんの役割は単に国内における役割だけでなく、国際的なニーズにこたえることも要求されています。これからの獣医さんは、日本だけでなく、世界の一員としての日本国の獣医師として走る必要性があります。特に、感染症の増場といわれるアジアでは、経験と技術の高さから、リーダーとしての役割を負っていると思います。

その意味で、獣医さんがどこに向かって走るのか？というなら、「世界は一つ、健康は一つ：one

world, one health」に向かって走るべきです。

## One World One Health 一つの世界一つの健康

2010年1月29日 宮崎 日本獣医師会



東京大学大学院 農学生命科学研究科 吉川森弘

### 1. 世界の機関が見た21世紀の課題と危機管理

#### 21世紀の課題と獣医師

21世紀の克服すべき課題には環境汚染の低減、温暖化の抑制といった環境保全（eco-health）の問題、爆発する人口と食料危機の問題があります。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問題ですが、グローバル化をもっても、経済格差や文化・信仰の相違なども絡んでおり、簡単に解消できる問題ではありません。

一つの国際基準が理想ですが、現実にはダブルスタンダードやトリプルスタンダードがなければ200を超える国からなる世界は、動いていきません。環境の劣化、食糧危機はそのまま新興・再興感染症を生み出す原因です。今や、人獣共通感染症（zoonosis）の流行は、国際社会にとって共通の脅威となっています。こうした課題の解決を誰が支えるのか？

畜産品や水産品などの安定した食料の生産（food production）には、病気の管理が必須で獣医師の技能が請われています。また国際流通する食品の安全性の確保（food safety：食の安全）や、バイオテロやアグロテロといわれる食の安全体制に対する破壊行為を抑止するための活動、食の防衛（food defense）にも、検疫所などで働く獣医師が第一線に立っているわけです。動物に由来する感染症の調査や防疫もまた獣医師の役割です。このように、国際問題に立ち向かう獣医師が各国で求められているのです。





マンハッタン原則とは：その前文

国際保健機関（WHO）、国際獣疫事務局（OIE）、国連の食糧農業機関（FAO）、世界銀行（WB）やユニセフ（UNICEF）などが一堂に会して議論した結果が2004年に野生動物保護協会（WCS：Wildlife Conservation Society）からマンハッタン原則として提示されました。この原則のキーワードが「One World, One Health」です。ここでは、以下のような認識を基本概念においています。

すなわち「近年のWest Nileウイルス、Ebola 出血熱、SARS、サル痘、BSE、鳥インフルエンザの流行はヒトと動物の健康が密接に関連していることを想起させる。従ってヒト、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・再興感染症はヒト（食糧供給、経済活動を含む）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活動と同時に、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に関して分野を超え・融合したアプローチが必要である」と述べ具体的なアクションプランを提示しています。

マンハッタン原則の行動計画（Action plan）

1. ヒト・家畜・野生動物の健康がリンクしていること、疾病の脅威が我々に必要な食糧供給や経済、健全な環境を維持するための生物多様性

と生態系機能にリンクしていることを認識する必要がある。

2. 土地と水の使用法の決定が健康維持に深く関連することを認識すること。この認識に失敗すると生態系の弾力性は失われ、病気の出現・拡散が起こる。
3. 野生動物の健康科学はグローバルな疾病の予防、監視、モニタリング、規制の強化と緩和に不可欠な要素である。
4. ヒトの健康のためのプログラムが環境保護活動に強く貢献し得ることを認識することが必要である。
5. 複雑に種を超えて広がる新興・再興感染症への予防、監視、モニタリング、規制の強化と緩和に関する工夫と応用性のある総合的、前向きな取り組みを進める必要がある。
6. 感染症の脅威を解決しようとする場合、ヒトの要望（家畜の健康に関連する要望）と生物多様性・保全を十分に統合するための機会をもつ必要がある。
7. 生きた野生動物やその肉類の国際貿易量を減らし、規制することは野生動物の減少防止、疾病の拡散・種を超える伝播、新しい宿主と病原体の関係を生むリスクを下げる。公衆衛生、農業と野生動物保全への影響から、この種の国際貿易の被害は非常に大きく国際社会は世界的社会経済の安全性に対する現実的脅威として取り組むべきである。
8. 疾病制御のため自由生活を送る野生動物の大量処分を行う場合でも制限が必要である。すなわち野生動物が絶滅の危機に瀕しているということ、その疾病が公衆衛生・食糧供給、野生動物保全上、脅威となることに関する広範な学際的、国際的な科学的同意が必要である。
9. ヒト、家畜、野生動物の脅威となる新興・再興感染症の深刻さに応じ、国際的なヒトと動物の健康維持のためのインフラへの投資を増加させる必要がある。国際的なヒトと動物の健康監視、明確でタイムリーな情報交換能力の強化により、政府や非政府機関、公衆衛生・家畜衛生研究所、ワクチン・製薬企業及び他のステーク

ホルダー（利害関係者）間の協調性を向上させることが出来る。

10. 政府、地域住民、私的・公的（非営利）部門が国際的な健康と生物多様性の保全に立ち向かうための協力体制を確立すること。
11. 新興・再興感染症出現の脅威に立ち向かう早期警戒体制を確立するために、情報交換のための国際的野生動物疾病監視ネットワークの資源提供と支援を行う。
12. 世界の人々の教育と啓蒙、および健康と生態系の統合に関するより深い理解が必要であるという認識を強める政策の決定に投資すること。このことは将来の地球の健康を改善することに繋がる。

こうした行動計画の多くの項目が、新しい獣医師の役割を要求していると思うのは私だけでしょうか？

#### マンハッタン原則：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、どの国もヒト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、我々がヒト・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、「一つの世界、一つの健康：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ます。何度読み直しても、含蓄の深い提言であると思います。また、これからの獣医師の規範となる概念であると思います。

## 世界獣医系大学学長による 獣医学教育の改善会議

### パリでの国際獣疫事務局（OIE）開催の会議

2009年10月12日午後から14日まで、2日半に亘ってパリのオルセー美術館の近く、聖ドミニク通りのMaison de la Chimieで、OIEの獣医学教育に関する会議が開かれました。世界保健機構（WHO）、食糧農業機構（FAO）等の国際機関が協力、EC（欧州委員会）、フランス農水省、フランス獣医学校連合が協賛しました。10月中旬のパリにしては安定した晴天に恵まれ、朝晩はやや冷え込みましたが、プラタナスの落ち葉がとてもきれいで、落ち着いた雰囲気の中で開かれました。OIEをはじめとする国際機関の獣医学教育に関する戦略の総論、各論が紹介されました。最終日の獣医学教育に関する国際ニーズ、指針、カリキュラム、ディプロマ制度などに議論が及ぶにつれ、質疑が活発になり、最終勧告案に関しては、かなり熱い議論が戦わされました。ここに概要を示します。国際的な獣医学教育に関する考え方を知るのに、非常に有用でした。

## OIEの獣医教育改善戦略



### OIEの提示した課題と参加者

OIEの提示した表題は「より安全な世界を構築するための獣医学教育の展開：Evolving Veterinary Education for Safer World」でした。足かけ3日間にわたり行われた会議は、世界から約400人を超す参加者があり、3日目の獣医学教育の展開に関する勧告案とそれに対する意見の徴集まで、ほとんど常に満席状態でした。日本からは文部科学省、農水省、OIEの地域事務局、学術会議、国立大学では帯広大、北大、東大、山口大、宮崎大、鹿児

島大から、また大阪府大からも参加がありました。食の安全の座長を務めた山内一也先生、OIE事務局等の日本の方を加えると、総勢15名を越す参加者で、アジアの中では非常に参加者の多い国でした。

#### 1日目の重要事項・国際戦略

いずれのスピーカーも21世紀に、人類が人口増加、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と、これらの課題に立ち向かうにはヒトおよび動物の感染症の統御、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とを述べました。こうした課題の解決には国際協調と貿易拡大が必須で、それらを支える獣医師に対する社会的ニーズとその役割を果たす責任が急速に増大していることを強調していました。

また、科学を基礎にした政策決定 (science based policy making) の必要性、しかし国際的な多様性を考慮した調和も必要であることが指摘されました。OIEが取り組む、富裕国と貧困な国で共通に受け入れられる公共獣医事の指針 (Veterinary Service Guideline)、指針を実行するための方式 (PVS: Performance of Veterinary Service tool) とその評価方式 (gap analysis) が紹介されました。この中で用いられた「One World One Health」という言葉がキーワードとして3日間を通して繰り返し述べられたことが、とても印象深いものでした。「ヒト、動物、環境を含めた健康の維持が必要である事と、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いる」という認識を基礎に置こうというメッセージです。こうしたニーズにこたえる人材を育成するためには新しい獣医学教育の展開が必須であるという結論が導かれていました。ここで要求される獣医師の資質は、単なる臨床専門家ではなく、調整者、説明者、政策決定能力等を持つ公共獣医事の実行者 (Server of Veterinary Service) であることも指摘されました。

#### バラ事務局長の講演

世界的な問題 (人口、食糧、環境等) の進行が、より安全な世界 (Safer World) の構築を難しくしている。課題の解決には種々の対策が必要であるが、特に動物の健康・福祉は食の安全、公衆衛生、感染症統御に重要で、結果として貧困の減少、食糧の安定供給に繋がる。また、感染症の統御には国際的公衆衛生の向上、政治の安定、国際協調が必要で、「一国の失敗がこの惑星を危うくするというリスク感覚」を持つ必要がある、と述べました。

また、これらの基盤となる獣医師の教育 (学部前期教育、後期教育、卒後教育、社会人専門教育) は重要で、新しい教育で育った人材が公共獣医事 (Veterinary Service) の実行者として、政策の監視、疫学調査情報のネットワーク構築、官民のつなぎ役を果たすことが求められている。獣医師へのニーズに応える新しい展開として、次の段階では動物健康管理の改善、公共獣医業務と獣医教育への投資、科学に基づく動物福祉がキーとなる。獣医教育に関しては国際協調、最低限の必要なカリキュラムの設定、ハード・ソフトの確立が必要となると指摘し、議論の方向性を示しました。その後のOIEの獣医教育アドホック委員会の活動と提言を見ると、この戦略が着実に実行されつつあることがわかります。

#### 2日目の重要事項・獣医学教育

獣医学教育に関するキーワードでは専門領域の自由選択、学生交換、大学院生のトレーニング、指導者教育、公衆衛生の課外教育、チーム教育、野生動物専門コース・大学院および卒後教育等に関する提案がありました。学生の資質に関しては政策決定能力、問題解決能力、コミュニケーション能力、説明能力が必要とされること、また、途上国の獣医学教育の支援、eラーニング、IT機器利用、教育資源交換の必要性が指摘されました。

先進国に比べて、途上国の公共獣医師の資質、待遇に問題が多い点も指摘されました。特に獣医人材の枯渇、獣医の専門家としての評価の低さ、安い給与、乏しく不十分な支援、政策的な貢献へ

の評価の不足、医師、統治機関との連携の不足、汚職等の問題がある。そのため、途上国の学部長への要望としては獣医学教育の評価を実施すること、認証制度を利用すること、ステークホルダーの意見を聞くこと等の方法がある。その上で必要なカリキュラムの整備、複数年・複数世代のプログラム開発、共同支援プログラム（Twining program）の作成、予算措置に取り組む必要があることが示されました。

途上国といわれていますが、この内容のほとんどは、現在のわが国が抱える、獣医師の問題をそのまま指摘しているように思えます。地方行政を含め、農水・厚労の縦割り制度の中で、連携のとれた獣医本来の活動が出来ず、低い評価と、責任のある地位につけないこと、安い給与等のために、卒業学生の大半は、自営業の動物病院を志望することになります。獣医系大学が上記のような資質・適格性を持った人材育成を行うこと、社会、特に行政がそうした人材を責任ある地位に任用することが重要です。そのことが、結局社会にとって、安い投資で大きな有効性を買うことになると思います。

## OIEの獣医教育改善への提言

### 獣医学教育機関(獣医大学等)は、(コアカリの内容)

- ・動物衛生、獣疫病学、公衆衛生(人獣共通感染症、食品の安全性、食の安全保障)、生産、経済と貿易、社会的便益を提供する伴侶動物・競技・娯楽用動物獣医療、動物福祉や生物多様性保護等の社会的価値に関する分野の獣医学の初期教育・生涯教育を強力に支援する。
- ・獣医学士が科学の進歩、世界情勢と緊急的要請を理解できるようにするために関連する基礎科学分野の教育を維持・発展させる。また、公衆衛生、食料生産、生物多様性あるいは環境衛生に影響を及ぼす野生動物と水生動物の疾病、疾病制御方法、動物分類学に関する理解を教育に組みこむ。
- ・動物薬および動物用ワクチンの適正使用に関する獣医師教育を強化する。

### 獣医疫学的重要性について

家畜の感染症に関する疫学調査（サーベイランス）は、二国間協定（SPS agreement）や当該国の感染症リスクステータスの評価、清浄国（感染症フリー）宣言、感染症のゾーニング（汚染地域と清浄地域の隔絶）や、感染症の囲い込み（compartmentalization）の有効性評価などに必要です。しかし、予算、技術、機材等が、現状では不十分で、特に途上国ではサーベイランスを実施

するのに問題が多いことが紹介されました。また、教育面では学部でヒトと家畜の相互作用や疫学（参加型サーベイランス）を学ぶようにカリキュラムを改善すること、長期間にわたる人材育成の保障、疫学修了者の職場の確保、遠隔教育、ディプロマ制度、卒業教育、課外授業、集団疫学研修などが重要であること、疫学と同時にリスク分析、免疫学、ワクチン学もカバーする必要があることが指摘されました。また、疫学では宿主・病原体・環境の3要素に社会、経済、政治、宗教の要素も含めて考える必要があり、こうした新しい疫学解析等も必要とされていることが述べられました。

疫学やリスク分析という側面から見ると、獣医学が極めて学際的で、自然科学を基礎に置いた社会科学的应用性を必要とする学問であることがわかります。これまでの基礎科学、臨床科学の2分野だけでなく、社会獣医学という第3の分野の発達が必要であることがわかります。

### 食の安全と新しい獣医師の役割・教育

OIEでは2002年に食品安全のワーキンググループが出来、2008年にFAO、OIEの共同で、望ましい農場の指針が出されています。食の安全の比較的新しい問題としては食中毒、家畜飼料による耐性菌の出現、と畜場の衛生管理、国際貿易、トレーサビリティなどがあること、食品由来のリスクに関しては、リスク評価、リスク管理が完全に分けられる必要があること、EUでは衛生管理はCodexとOIEの基準に準じていること、食の安全に関する情報の収集先としてはOIE、Codex、WHO、FAO、CDC、EUCDC等があることが示されました。また、食の安全に関して、的確なオーソリティーが必要に応じ、国際認証に関連した国内の法制化を図る必要があると指摘されました。

後述するようにわが国のBSEの対応の混乱を考えると、こうした指摘には、リスク評価に関して、科学に基づく問題提起やそれを反映させる経験の乏しい、わが国の政治姿勢の未熟さが含まれている気がします。政治はしばしばリスク評価を政策決定に生かすよりは、政局の道具としてしか利用

しません。これは科学にとっても、国民にとっても不幸なことです。また、科学的評価とリスク管理の住み分けや、説明責任、説明と同意といった、基本要素を理解させえなかった科学者としての責任も含まれているような気がします。

教育面では過去の失敗の総括（BSEなど）、消費者とのリスクコミュニケーションの取り方、流通体制、農場から食卓までの安全確保、関連法規、個体識別とトレーサビリティの意義、食品の安全性管理、品質保証、健康証明書、市場調査方法など多くのことを、獣医師に教育する必要があること、こうした分野は全て獣医師の職業範囲になることが指摘されました。現状の獣医学教育を改善しなすと、国際的に通用し、国内で評価される獣医師を育てることが難しいことが、よくわかります。

## OIEの獣医教育改善への提言

続き

- ・モデルコアカリキュラムの中にコミュニケーション、専門分野を超えた協力ならびに協同作業訓練を組み込み、リスク解析を含む技術的問題の複雑さを獣医師が素人用語で情報伝達できるようにする。
- ・獣医学教育機関は、必要に応じて、初期教育および生涯教育における遠隔教育のための新しい情報技術の活用を推進し実行する。
- ・中核的獣医師の十分な数が地方で働くために教育と援助を受けられるようにすること。
- ・先進国の獣医学教育機関は、発展途上国の教育機関を支援することの重要性を認識すること。また、関連する組織や援助資金供与者は、OIE指針に従ったそれらの計画に対して十分な資金援助を行わなければならない。
- ・経験を積んだ臨床家と接触する初期獣医学教育と訓練、畜主との関係を含む獣医師の日常活動の訓練のため業務管理を通じた新たな学士のための規定を作成する(参加型実習?)。

### 3日目の重要事項

OIEはワーキンググループで動物福祉に関する報告をまとめました。福祉の基本要素は苦痛、痛みの回避です。動物福祉の理念は、ここ10～15年の間に伴侶動物から産業動物へと適用が拡大されつつあり、産業動物でも鎮静剤の使用が導入されつつあります。他方、野生動物では保全と農作物被害による淘汰の対立する問題もあります。

ワーキンググループでは、動物福祉を科学的に評価するという考え方で進めています。動物福祉は、動物の生理、行動、心理、栄養、健康、獣医科学検査（サーモグラフィー、脳波測定（EEG）など）、環境などに基づく動物管理、人道的取り

扱いをキーとする極めて国際政治学的な複雑な課題ととらえられていました。動物福祉の改善運動は南米、北米、欧州で多くのプロジェクトとして進んでいることが紹介されました。

動物福祉に関しては、これまで動物に対する福祉とコスト、労力、管理体制などの要因が、常に対立する構図で進んできたように思います。しかし、最近の動物福祉論は動物の福祉が、結局、動物の健康、感染症防止、畜産物の増量、食の安全等につながるもので、福祉の効果は、産業にとって有用であるという考えに変わってきました。

### 新しい技術と大学教育

獣医技術の目覚ましい進歩（IT、画像診断、分子診断、ゲノム解析など）に応じた教育、疫学、リスク分析学、科学倫理、問題解決学習（PBL）、事実に基づく獣医学（EBM）、獣医療への心構え、チーム医療などの教育、および教育の質の評価が重要であること、基礎と臨床を繋ぐ前臨床教育（検査、診断、治療方針：臨床病理、臨床薬理など）の必要性が説明されました。

獣医教育への国際ニーズはFAOの計画では、人口増加に伴う100%の食糧増産計画のうち、農場でのカバーが20%、生産強化が10%、残りの70%は技術革新で補う必要があることとなります。また飲水の確保、食の安全等に応えるため、獣医学教育として、新しい生産獣医学と集団獣医学を展開する必要があります。獣医教育組織の認証制度、評価制度、法規組織、卒後教育が今後の展開のキーとなります。また、世界獣医師会（WVA）は、国際的に共有出来る最低限の獣医学教育の基準（Day One Competence、獣医専門家としての初日の適応力）と国際生涯学習の基準（Global Life Long Learning）を作成しています。ここで行われる生涯教育は、基本的知識、情報提供能力、記述能力、政策決定能力を養うものです。

### 国際獣医教育の協力と評価

国際獣医教育協力という点では欧州の大学がアフリカの水産を支援する、英国の大学が熱帯、亜熱帯の疾病統御、食糧貿易、野生動物医学を支援

する、米国獣医大学連合（AVSA）がヒト、動物、環境（One World）の教育を展開する、アジア、ニュージーランド、オーストラリアの獣医連合、EU獣医教育連合（EA EVE）も独自に活躍していることが示されました。特に欧州では38カ国が獣医学教育と獣医師免許を国家レベルで統括しています。教育評価では申請、計画、自己評価、専門家チームによる訪問調査、評価報告といった手順で98の大学が評価されつつあります。弱点や利点を挙げ、合格、条件付き合格、不合格等の結果が公表されます。米国獣医師連合（AVMA）は1952年に獣医学教育の認証制度を全米に拡大し、その後ニュージーランド、オーストラリアも加わり、11の認証基準に基づき、20名の代表者が認証を行っています。南アフリカでは獣医法規組織（VSB：veterinary statutory body）がOIEの援助を受けアフリカの獣医教育基準を作成したと報告されました。各地域で統合した獣医教育の基準と評価・認証が進められています。

#### 国際獣医教育改善を推進するための勧告

獣医学教育組織は各国の実情に応じて、獣医学の学部、卒後教育のカリキュラムを検討する必要があります。その際WVA（世界獣医師会）および他の機関はOIEの提案をうけ、獣医学教育が国際的ニーズ、社会ニーズ（野生動物、水棲動物、動物福祉、リスク分析、獣医規範、行政、リスク管理、コミュニケーション、地域獣医へのインセンティブなど）に適合するようカリキュラムを組む支援をすることが重要です。WVAが作成した獣医大学用のコアカリキュラム（獣医初心者用の最低限のカリキュラム）の活用を呼び掛け、法的に認められた機関による第三者評価（ア krediyテーション）による質保証の実施を呼び掛ける必要があります。

獣医学教育の質を向上させるため、教育課程の実施に当たっては、教員、施設の共同利用、単位互換等を実施するTwinning program（共同プログラム）の実施を先進国と発展途上国の間で進めること、評価の実施に当たっては、一国だけでなく、地域における質の確保をはかれるよう努めることが勧告されています。その際、評価制度が整っている先進国においては、途上国地域の評価の取組を支援することになります。

下に、著者が理解するOIEの獣医学教育改善戦略を示しました。OIEが示す、高いレベルの公共獣医事に適合する人材を育成する戦略（ミミマム・コンピータンス）に基づき、各国の獣医学教育レベルに応じた戦術を用いること、各国は、より上のレベルを目指して努力する必要があると思います。今後、わが国はOIEの示すコアカリキュラムに基づき、「中等度」レベルをクリアし、「中等度」から「かなりできている国」を目指すことになると思います。現在、進捗しつつある獣医学共同学部の中から、国際基準を満たす、認証された国際獣医学部や国際獣医大学が出てくると思います。日本にとっても、アジアにとっても、このような国際レベルの獣医学教育に適合できる大学が出来、人材が育つことが喫緊の課題です。

### OIEの獣医学教育改善戦略と戦術

全世界における動物衛生と動物福祉の向上 (One World One Health)	
↑	
「世界の公益 (Global Public Good)」として獣医学の初期・生涯教育	
獣医教育システム (格差)	評価方法 (適応の多様性)
かなり出来ている国(先進国)	カリキュラムの最適化 評価のハーモナイゼーション 国際的な獣医学教育評価システム
↑	
中等度の国	モデルコアカリキュラムの作成 学士の質保証 獣医教育改善の評価
↑	
不十分な国(途上国)	PVSの適用、ギャップ分析 改善計画と実行、OIEによる再評価 (OIE陸生・水生動物コードの適応、実行)
↑	
ほとんどの国	教育機関の認証、リスト作成

SHORT COMMUNICATION

**Serological examination of Philippine bats for *Histoplasma capsulatum***

Lauren T. Arayan<sup>1</sup>, Alisha Wehnesday B. Reyes<sup>1</sup>, Joseph S. Masangkay<sup>1</sup>, Yasuhiro Yoshikawa<sup>2</sup>,  
Waren N. Baticados<sup>1</sup> and Hope G. Rovira<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Veterinary Paraclinical Sciences, College of Veterinary Medicine, University of the Philippines Los Baños, College Laguna, Philippines.

<sup>2</sup>University of Tokyo, Graduate School of Agriculture and Life Sciences, Japan.

Accepted 30 November 2011

**ABSTRACT**

Histoplasmosis is a disease of medical and veterinary concern. Bats are considered as reservoir hosts of the etiologic agent *Histoplasma capsulatum*, and are therefore used as animal subjects in experimental studies. Thirty six bats, consisting of nine bats (Microchiroptera: Vespertilionidae) from Aklan, 22 bats (Megachiroptera: Pterodidae) from Quezon City and another five bats (Microchiroptera: Vespertilionidae) from Quezon City, Philippines were tested for the presence of precipitating antibodies to *H. capsulatum* using immunodiffusion assay. Results revealed that none of the bats tested were positive for *H. capsulatum* in agar gel precipitation assay. This may be due to no previous exposure of the bats to the pathogen, exposure to the pathogen with insufficient time for seroconversion (infection time < 3 - 5 weeks) prior to capture or the bats were resistant to infection. Any one of the aforementioned factors may have contributed to the absence of antibodies or low undetectable levels of circulating antibodies for *H. capsulatum* in the tested bats. This is the very first attempt at field collecting and monitoring for precipitating antibodies for *H. capsulatum* in Philippine wildlife, particularly in Philippine bats.

**Key words:** Immunodiffusion assay, wildlife, antibodies, Aklan, Quezon City

**INTRODUCTION**

Bats are associated with important public health hazards and serve as an important wildlife reservoir of many emerging and re-emerging infectious agents. One of these infectious agents is *Histoplasma capsulatum* which causes asymptomatic to chronic disease in bats and humans. Among all the mammals infected, only bats are considered to manifest a significant role in the epizootiology of this mycosis (Hoff and Bigler, 1981). At least 70 species of the 1,001 species of bats known in the world (Mickleburgh *et al.*, 2002) inhabit the Philippines. Studies on detection of *H. capsulatum* in bats have not been carried out previously in the Philippines. Histoplasmosis has emerged in the Western Hemisphere and is highly endemic in the Ohio River and Mississippi River valleys of the United States (Lyon *et al.*, 2004). In Asia, prevalence of histoplasmin hypersensitivity has been rarely reported. In some parts of Southeast Asia, a reaction rate of 30% has been documented (Navy, 2005) while it ranged from 0-2% in China, Japan, and Hongkong and from 63-86% in Indonesia and Burma (Navarro *et al.*,

1992). Malaysia has a lower prevalence (4-43%) compared to Thailand (Houston, 1994). However, reported cases in Malaysia suggested a higher prevalence of histoplasmosis than in the published literature (Navy *et al.*, 2005). Most cases of histoplasmosis in non-endemic areas are underreported due to generalized non-specific symptoms observed among cases (Navarro *et al.*, 1992).

In the Philippines, cases of exposure to *Histoplasma* species were reported in poultry. A study on the incidence of histoplasmin hypersensitivity in long-term residents in Manila, specifically among the Manila Electric Company workers, implied that histoplasmosis is very rare in the Philippines but adequately present to be able to infect 25% of the test population (Bulmer and Bulmer, 2001). Serodiagnostic tests for antibodies in mycotic diseases which include immunodiffusion test and complement fixation are routinely used as screening tools. This preliminary investigation was carried out to detect the presence of antibodies in the sera of Philippine bats through immunodiffusion test.

\*Corresponding author's email: hgrovira@gmail.com

## MATERIALS AND METHODS

### Study animals

A total of 36 apparently healthy bats, 19 females and 17 males, were used in the study. Nine bats were collected from Pangihan caves in Barangay Pablacion, Malay and Libertad caves in Barangay Libertad, Nabas, Aklan using mobile nylon mist nets (3 m long and 1.5 m high with 35 mm mesh size) that were set up inside and at the entrance to the caves. Another 27 bats were captured in Diliman, Quezon City using seven nylon mist nets (12 m long and 2 m high with 35 mm mesh size) placed near swampy areas for two nights.

### Species identification

The 36 bats used in the study were identified as belonging to seven species according to Philippine bat identification key of Ingle and Heaney (1992). These were *Miniopterus australis* (Tomes, 1858), *M. schreibersii* (Kuhl, 1817), *Cynopterus brachyotis* (Müller, 1838), *Eonycteris spelaea* (Dobson, 1871), *Rousettus amplexicaudatus* (Geoffroy, 1810), *Ptenochirus jagori* (Peters, 1861) and *Scotophilus kuhlii* (Leach, 1821).

### Collection of blood samples

The body weight of each captured bat was recorded and the dosage of anesthetic drug was computed accordingly (0.45 ml of 5% zolazepam-tiletamine per 30 g body weight). The anesthetic was administered intramuscularly and the bats were euthanized through intracardiac exsanguination. The body parameter measurements of the carcasses were recorded for specimen identification.

Each carcass was placed on a necropsy board where the skin over the thorax and abdomen was reflected. The thorax was opened and the internal organs were collected by research collaborators from abroad for other investigative works. For the present study, blood was transferred into 1.5 ml pre-labeled microtubes and centrifuged for 5 min to collect the serum. The sera were transferred to new microtubes, stored in liquid nitrogen during transport and then stored at -40°C in the laboratory.

### Immunodiffusion assay

The immunodiffusion assay was carried out according to manufacturer's instructions (Immunomycologics Inc., Norman, USA). Briefly, 34 µl of sera from each bat was inactivated by heating at 56°C for 30 min. Inactivation was done to inhibit the lytic activity and to increase precipitation as well as turbidity

for better visualization in the presence of identical antibody-antigen complex. The sera were allowed to cool at room temperature (26°C). Two wells in each plate were filled with approximately 30 µl of the positive control (goat antisera) containing antibodies for both H and M antigen of *H. capsulatum*. One well was filled with 30 µl of phosphate buffer saline as negative control. This was repeated for the rest of the plates and the plates were incubated for 30 min. The central well was filled with 30 µl of a mycelial phase culture filtrate of *H. capsulatum* with H and M antigens. The plates were incubated inside a moisture chamber for 24 h and checked for precipitation bands. Results were confirmed after 48 h of incubation.

## RESULTS

The 36 bats collected comprised 19 females and 17 males that belonged to seven species under two families, Vespertilionidae (3/7) and Pteropodidae (4/7). These were represented by two species of insectivores, *Miniopterus australis* and *M. schreibersii* captured from Aklan, four species of frugivores, *Cynopterus brachyotis*, *Eonycteris spelaea*, *Rousettus amplexicaudatus*, *Ptenochirus jagori* and one species of insectivore, *Scotophilus kuhlii* captured from Diliman, Quezon City.

An evident immune-precipitation reaction (exemplified by the appearance of bands) between positive control and H and M surface glycoproteins or antigens of *H. capsulatum* represent the expected positive test for the presence of precipitating antibodies to *H. capsulatum*. No precipitating antibodies to *Histoplasma capsulatum* were observed in any of the 36 bat sera tested using the agar gel precipitation method.

## DISCUSSION

Histoplasmin (HMIN) is the antigenic component from the mycelial phase of *H. capsulatum* and is composed of H, M and C antigens. HMIN is widely used to assess both humoral and cell-mediated immune responses in patients with histoplasmosis (Guimaraes *et al.*, 2006). The H and M antigens are highly specific to *H. capsulatum* antibodies that equates to its usefulness in the diagnosis of the disease (Hook and Fife, 1967).

The M antigen is an immunodominant antigen that appears first in acute phase of



infection and is present throughout the progression of the disease (Guedes *et al.*, 2003). Hence, the antibodies to M antigen are present in both active and chronic histoplasmosis while the antibodies to H antigen appear only during an active infection (Yeo and Wong, 2002). The presence of antibodies to M antigen also signifies a past infection, a recovery stage or a result of histoplasmin hypersensitivity test (Green *et al.*, 1976).

Non-culture methods have been developed to aid in the diagnosis of diseases in a shorter time possible. These tests include detection of antibody or antigen which offers presumptive diagnosis. The detection of antibodies is considered to be a major tool currently in use. Two of the routine methodologies used are complement fixation and immunodiffusion. The latter is a rapid and excellent qualitative test that provides presumptive diagnosis for histoplasmosis. It is highly specific and almost as sensitive as complement fixation test. It has a sensitivity of 70-100% and specificity of 100% (Guimaraes *et al.*, 2006).

In the study, a total of 36 apparently healthy bats were serologically examined for the presence of precipitating antibodies to *H. capsulatum*. However, none of the tested samples from bats captured from urban and rural collection sites was positive for the presence of antibodies for M and H antigens of *H. capsulatum*.

There are no previous records of infection with *H. capsulatum* in the seven bat species tested in this study, although some reports are available for other bat species (Klite and Young, 1965; Hoff and Bigler, 1981; Mok *et al.*, 1982; Taylor *et al.*, 1999; Taylor *et al.*, 2000; Ulloa *et al.*, 2006). It is possible that the seven species of bats tested were either resistant or not susceptible to the pathogen. All species of bats in Philippines have not been tested against histoplasmosis. The absence of precipitating antibodies against *H. capsulatum* suggests that the tested bats had no previous exposure to the pathogen. However, the presence of infection in other bats in the natural population in the Philippines cannot be ruled out.

Literature on cave ecology have correlated cave conditions with the presence of *H. capsulatum* in bats (Taylor *et al.*, 1999). However, only 25% of the tested bats in the study were cave dwellers. The absence of antibodies to *H. capsulatum* in test bats suggests that they have not mounted an immune response to the pathogen or may not have been previously exposed to the pathogen. In case of previous exposure, it may be that the bats have not passed

the three to five-week period needed for the development of detectable levels of antibodies.

Immunodiffusion assay is a diagnostic test acceptable as a screening method. However, other methods of detection such as enzyme-linked immunosorbent assay, radioimmunoassay and polymerase chain reaction assay are recommended for confirmation.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge the assistance given by the Japan Health Sciences Foundation through Prof. Yasuhiro Yoshikawa (University of Tokyo, Graduate School of Agriculture and Life Sciences) and UPLB Museum of Natural History.

## REFERENCES

- Bulmer, A.C. and Bulmer, G. (2001). Incidence of histoplasmin hypersensitivity in the Philippines. *Mycopathologia* **149** (2): 69-71.
- Dobson, G.E. (1871). On the Asiatic species of Molossi. *Journal and Proceedings of the Asiatic Society of Bengal* **43**: 142-144.
- Geoffroy, É. (1810). Description des roussettes et des céphalotes, deux nouveaux genres de la famille des chauve-souris. *Annales du Muséum National d'Histoire Naturelle Paris* **15**: 96.
- Green, J.H., Harrell, W., Gray, S., Johnson, J., Bolin, R., Gross, H. and Malcolm, G. (1976). H and M antigens of *Histoplasma capsulatum*: preparation of antisera and location of these antigens in yeast-phase cells. *Infection and Immunity* **14** (3): 826-831.
- Guedes, H.L., Guimaraes, A.J., Medeiros, Muniz, M., Pizzini, C., Hamilton, A.J., Peralta, J.M., Deepe, G.S. and Zancoppe-Oliveira, R. (2003). PCR assay for identification of *Histoplasma capsulatum* based on the nucleotide sequence of the M antigen. *Journal of Clinical Microbiology* **41** (2): 535-539.
- Guimaraes, A.J., Nosanchuk, J.D. and Zancoppe-Oliveira, R. (2006). Diagnosis of histoplasmosis. *Brazilian Journal of Microbiology* **37** (1): 1-13.
- Hoff, G.L. and Bigler, W.J. (1981). The role of bats in the propagation and spread of histoplasmosis: a review. *Journal of Wildlife Diseases* **17** (2): 191-196.
- Hook, W.A. and Fife, E.H. (1967). Soluble antigens for immunofluorescence detection of

- Histoplasma capsulatum* antibodies. *Applied Microbiology* **15** (2): 350-356.
- Houston, S. (1994). Histoplasmosis and pulmonary involvement in the tropics. *Thorax* **49** (6): 598-601.
- Ingle, N.R. and Heaney, L.R.H. (1992). A key to the bats of the Philippine islands. *Fieldiana: Zoology* **69**: 1-44.
- Klite, P.D. and Young, R.V. (1965). Bats and histoplasmosis. *Annals of Internal Medicine* **62** (6): 1263-1271.
- Kuhl, H. (1817). *Die deutschen Fledermäuse*. Hanau **67**: 2.
- Leach, W.E. (1821). The characters of seven genera of bats with foliaceous appendages to the nose. *Transactions of the Linnean Society of London* **13**: 73-82.
- Lyon, G.M., Bravo, A.V., Espino, A., Lindsley, M.D., Gutierrez, R., Rodriguez, I., Corella, A., Carrillo, F., McNeil, M., Warnock, D. and Hajjeh, R. (2004). Histoplasmosis associated with exploring a bat-inhabited cave in Costa Rica. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **70** (4): 438-442.
- Mickleburgh, S.P., Hutson, A.M. and Racey, P.A. (2002). A review of the global conservation status of bats. *Oryx* **36** (1): 18-34.
- Mok, W.Y., Luizão, R.C. and Barreto da Silva, M.D.S. (1982). Isolation of fungi from bats of the Amazon basin. *Applied and Environmental Microbiology* **44** (3): 570-575.
- Müller. (1838). Tijdschrift voor natuurlijke geschiedenis en physiologie **5**: 146.
- Navarro, E., Tupasi, T., Verallo, V., Romero, R. and Tuazon, C. (1992). Disseminated histoplasmosis with unusual cutaneous lesions in a patient from the Philippines. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **46** (2): 141-145.
- Navy, K.B., Prey, S.P., Lynen, L., Sovanno, P., Bell, J.D. and Harwell, J.I. (2005). The first reported cases of disseminated histoplasmosis in Cambodia, complicated by multiple opportunistic infections. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine Public Health* **36** (5): 1272-1274.
- Peters, W. (1861). Monatsberichte Koeniglich Preussische Akademie der Wissenschaften Berlin, p. 707.
- Taylor, M.L., Chávez-Tapia, C.B., Vargas-Yañes, R., Rodriguez-Arellanes, G., Peña-Sandoval, G.R., Toriello, C., Perez, A. and Reyes-Montes, M.R. (1999). Environmental conditions favoring bat infection with *Histoplasma capsulatum* in Mexican shelters. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **6** (16): 914-919.
- Taylor, M.L., Chávez-Tapia, C.B. and Reyes-Montes, M.R. (2000). Molecular typing of *Histoplasma capsulatum* isolated from infected bats captured in Mexico. *Fungal Genetics and Biology* **30**: 207-212.
- Tomes, R.F. (1858). A monograph of the genus *Miniopteris*. *Proceedings of the Zoological Society of London* **26** (1): 115-128.
- Ulloa, M., Lappe, P., Aguilar, S., Park, H., Perez-Mejia, A., Toriello, C. and Taylor, M.L. (2006). Contribution to the study of the mycobiota present in the natural habitats of *Histoplasma capsulatum*: an interactive study in Guerrero, Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad* **77** (2): 153-168.
- Yeo, S.F. and Wong, B. (2002). Current status of noncultural methods for diagnosis of invasive fungal infections. *Clinical Microbiology Reviews* **15** (3): 465-484.

# GSTT1 is upregulated by oxidative stress through p38-MK2 signaling pathway in human granulosa cells: possible association with mitochondrial activity

Megumu Ito<sup>1</sup>, Misa Imai<sup>2</sup>, Miho Muraki<sup>3</sup>, Kenji Miyado<sup>4</sup>, Junwen Qin<sup>5</sup>, Shigeru Kyuwa<sup>3</sup>, Yasuhiro Yoshikawa<sup>3</sup>, Yoshihiko Hosoi<sup>6</sup>, Hidekazu Saito<sup>1</sup>, and Yuji Takahashi<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> Division of Reproductive Medicine, Department of Perinatal Medicine and Maternal Care, National Center for Child Health and Development, Tokyo 157-8535, Japan,

<sup>2</sup> Department of Biochemistry, Tufts University School of Medicine, Boston, MA 02111, USA,

<sup>3</sup> Department of Biomedical Science, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, Tokyo 113-8657, Japan,

<sup>4</sup> Department of Reproductive Biology, National Center for Child Health and Development, Tokyo 157-8535, Japan,

<sup>5</sup> Institute of Reproductive Immunology and Key Laboratory for Regenerative Medicine, Ministry of Education, Jinan University, Guangzhou 510632, China,

<sup>6</sup> Division of Biological Science, Graduate School of Biology-Oriented Science and Technology, Kinki University, Wakayama, 649-6493 Japan

**Key words:** GSTT1, p38 MAPK, MK2, granulosa cell, aging, mitochondria

**Received:** 12/26/11; **Accepted:** 12/27/11; **Published:** 12/28/11

**Correspondence to:** Yuji Takahashi, PhD; **E-mail:** [ytakahashi@nch.go.jp](mailto:ytakahashi@nch.go.jp)

**Copyright:** © Ito et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited

**Abstract:** We previously reported that GSTT1 was upregulated in human granulosa cells during aging and that activation and localization of p38 MAPK was changed in parallel. Although oxidative stress is responsible for these changes, the age-associated expression of GSTT1 regulated by MAPKs and the role of GSTT1 in aged granulosa cells remain unclear. Therefore, we examined the relationship between the expression of GSTT1 and MAPK signaling pathways using human granulosa-like KGN cells stimulated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the presence or absence of various MAPK inhibitors. Interestingly, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced GSTT1 was only inhibited by a p38 inhibitor. An inhibitor of MK2, a downstream regulator of p38, also diminished H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced GSTT1 upregulation. Notably, both p38 and MK2 were significantly inactivated in cells carrying an shRNA construct of GSTT1 ( $\Delta$ GSTT1 cells), suggesting that the p38-MK2 pathway is essential for age-associated upregulation of GSTT1. The relevance of GSTT1 in mitochondrial activity was then determined.  $\Delta$ GSTT1 cells displayed enhanced polarization of mitochondrial membrane potential without increasing the apoptosis, suggesting that the age-associated upregulation of GSTT1 may influence the mitochondrial activity of granulosa cells.

Collectively, it appears that the age-associated expression of GSTT1 is induced through the p38 signaling pathway and GSTT1 influences homeostatic activities in granulosa cells.

## INTRODUCTION

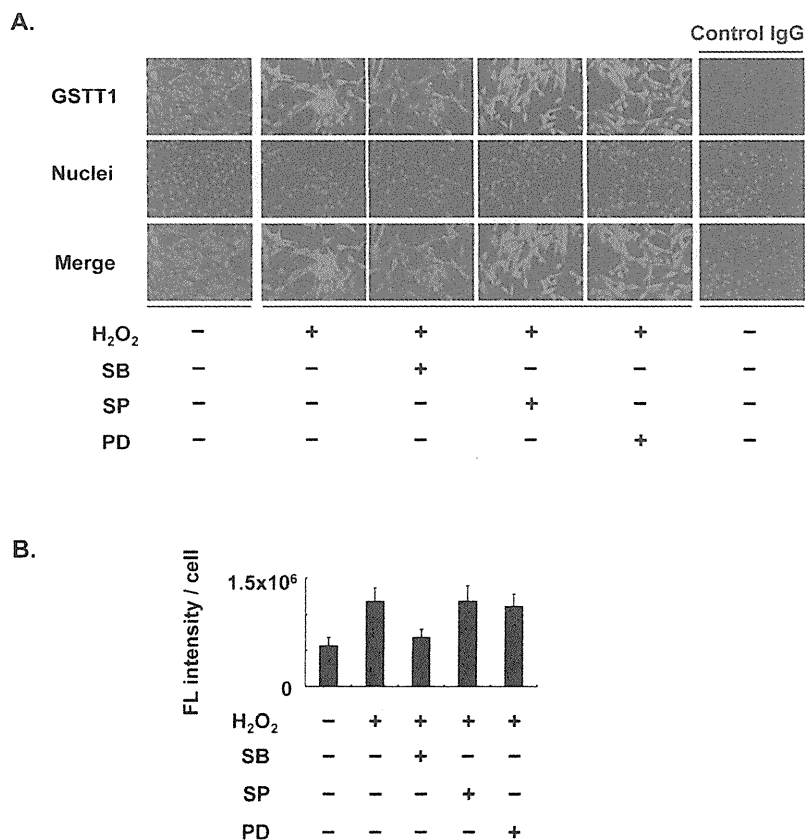
Glutathione S-transferases (GSTs) are well known for removing environmental pollutants and endogenous toxic compounds as part of the phase II detoxification process through glutathionylation of diverse electrophilic substrates. This self-defense system is

highly conserved among all organisms including prokaryotes and eukaryotes [1]. Because of their well-known characteristics, the polymorphism of GSTs causing point or null mutations are often associated with certain diseases [2, 3]. There are 8 subclasses of GSTs in mammals [4], and some of these have been shown to act as antioxidants against reactive oxygen species

(ROS). Overexpression of GSTA4 has been shown to protect cells from 4-hydroxynonenal (4-HNE)-induced apoptosis by inhibition of JNK signaling [5]; GSTP has also been associated with JNK and protects cells from death signals or oxidative stress [6]. Therefore, it is plausible that GSTs have a strong link to aging and are assured longevity [7]. This hypothesis has been proven in *Caenorhabditis elegans* in which CeGSTP2-2 belonging to the pi-class of GSTs was reported to conjugate 4-HNE and its overexpression was shown to elongate lifespan [8, 9]. In contrast, genetic disruption of GSTA4 in mice showed unexpected elongation of lifespan, probably due for compensation of the GSTA4 loss by other NRF2-dependent antioxidants [10].

The expression level of GSTs is decreased in various tissues and organs during aging [11], indicating that the cells have less protection against a number of toxins and oxidative stress at this time. However, GSTT1 is highly

upregulated in aged human granulosa cells [12], although its relevance in reproductive aging remains to be elucidated. GSTT1 is thought to be the most ancient of GST classes and it possesses unique bilateral features [13]. It acts as a scavenger toward electrophiles of various toxins and protects cells and tissues as well as other GST classes. Susceptibility to certain cancers has been proposed to occur in conjunction with the GSTT1-null genotype, [14]. In contrast, GSTT1 produces formaldehyde hazardous for DNA from several halogenated compounds, such as dichloromethane, during its metabolism [15]. Indeed, endogenous formaldehyde levels have been reported to be elevated during aging [16]. GSTT1 has also been shown to induce significant decrease in cell viability in aortic endothelial cells in conjunction with oxidative stress [17]. Collectively, these results suggest that GSTT1 as a candidate molecule associated with aging, regardless of whether this molecule is useful or harmful for living organisms.



**Figure 1.** Effects of MAPK inhibitors on the expression of GSTT1 in KGN cells stimulated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cells were treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at 200 μM in the presence or absence of SB203580, SP600125 or PD98059 at 10 μM for 24 h and then subjected to the immunofluorescence analysis (A). The primary antibody against GSTT1 was probed with anti-rabbit IgG-Alexa488 (Green). Cells were counterstained with Hoechst 33342 at 10 μM (Blue). Magnification: ×200. A bar graph represent the mean fluorescence intensity per cell ± SEM (B, C). One-way ANOVA: (B) P < 0.05; (C) P < 0.01.