

Figure 5. ELISA detection of local mucosal IgA responses. Local mucosal IgA antibody responses were detected in BALB/c mice immunized with rEm-TSP3+CpG or rEm-TSP3-FBP intranasally after the third immunization. Mice were sacrificed and nasal washes, liver extracts and intestinal washes were collected for measurement of nasal IgA (A), intestinal IgA (B), liver IgA (C), lung IgA (D) and spleen IgA (E) antibody responses. Significant differences between the vaccinated groups and the PBS control group are denoted by an asterisk over the bar. The S.D. is indicated by vertical lines. Significant differences between any of two groups are denoted by an asterisk over the line connecting them. $n = 3$ per group; * $p < 0.05$ (significant); ** $p < 0.01$ (very significant); *** $p < 0.001$ (extremely significant). doi:10.1371/journal.pntd.0001842.g005

flexible peptide in biofunctional fusions [35]. Hydrophobicity analysis showed that there was no significant change in solubility between the unfused and fused forms of Em-TSP3. Three-dimensional structure prediction of Em-TSP3 suggested that the exposure of the C-terminal linked with short FBP might improve the attachment of fusion protein to epithelial M cells and trigger DC activation [20].

Echinococcus metacystodes form a laminated layer which protects them from host immune attack after the infection established on the liver of intermediated host. Therefore, it may be more feasible to kill *Echinococcus* oncospheres in the early stage of infection in the intestine and blood before they develop into metacystode. As was suggested that antibodies form a critical part of the immune response against taeniid metacystodes, with IgG1, IgG2 α , IgG2 β and IgE playing a major role in oncosphere killing, although the involvement of other mechanisms should not be ruled out [36].

The tendency of Th1 or Th2 cell immune responses were assessed via detecting the IgG1/IgG2 α ratio after the second and the third immunization. Immunization with rEm-TSP3-FBP resulted in an increased IgG1/IgG2 α ratio (a tendency towards Th2), while rEm-TSP3+CpG showed an early Th1-dominated response that shifted towards a Th2 response later. T cells regulate Ig γ isotype switching on the basis of their ability to secrete cytokines. In mice, IL-4 (inducing IgG1 and IgE), IFN- γ (inducing IgG2 α and IgG3) and TGF- β (inducing IgA and IgG2b) are the

most important cytokines involved in Ig isotype switching [37,38]. It is suggested that the Th1-polarized cytokine response plays an important role in killing *Echinococcus* metacystodes during the initial stage of development in liver. The response shifts to a predominantly non-protective Th2 response during the chronic stage [36,39–47]. Although FAP was previously shown to induce a Th1-like response [34], in our study, the fusion of FBP to Em-TSP3 induced a predominantly Th2 response. Studies indicate that *E. granulosus* has developed strategies for immune evasion using molecules such as antigen B, whereby DCs differentiation is impaired, resulting in polarization towards a Th2 cell response [48]. Tetraspanin of *Schistosoma* was also shown to serve as an important molecule in immune evasion by masking their nonself status [49,50]. Based on these and our recent studies, we believe that although FBP facilitated targeting of M cells by the fusion protein to stimulate stronger mucosal immune responses, it also caused tetraspanins to impair DCs functions [48]. This is the most likely explanation for the failure of rEm-TSP3-FBP to induce a high IgG2 α response. We speculated that Em-TSP3 might be one of the most important molecules for regulating host immune responses by *Echinococcus* metacystode to benefit their long-term survival in their intermediate host [13].

Mucosal IgA responses were also detected by ELISA. Remarkably, immunization with rEm-TSP3-FBP evoked significantly strong IgA antibody responses in intestine, lung and spleen

compared to that by rEm-TSP3+CpG. Research on mucosal immunological responses over the past decades has suggested that mucosal IgA plays a crucial role by neutralizing parasite ES (excretory-secretory) products. This leads to attenuation of the parasite-host interaction and interferes with parasite feeding and survival [51–53], inducing eosinophil degranulation [54] and tolerance induction to the parasite [32]. Secretory (intestinal) IgA is thought to be one of the first lines of defences against infections by parasites such as *Giardia* [55], *Trichinella* [56] and *Echinococcus* [32]. Moreover, in this study, higher liver IgA response was induced by rEm-TSP3-FBP compared to rEm-TSP3+CpG ($p < 0.05$), which is thought to be one of the important immune-associated factors during the chronic stage of *Echinococcus* metacestode infection [39,57,58].

In. administration of the Em-TSP3 fused with FBP (rEm-TSP3-FBP) induced both systemic and local antibody responses, indicating that this is a novel, prospective model for the development of an efficient, non-toxic human vaccine. Since both the CpG and FBP did not induce the expected Th1 response against *Echinococcus* metacestode, we speculated that the early systemic (IgG) and mucosal (IgA) antibody responses are crucial for oncosphere killing and thus provided protection in our experimental model [13,22]. It appears to be very difficult to exclude metacestodes completely once infection is established in the host liver, although the liver IgA may play an important role in anti-echinococcosis [39,57,58].

We chosen an i.n. administration route in this study because it is the most appropriate for inducing the full range of local immune responses (so-called ‘common mucosal immune system’) [59]. However, it is notable that although both the CpG and FBP provoked strong intranasal IgA responses, there was a significant difference in intestinal IgA production. It is clear that FBP is more efficient to induce IgA production at certain remote sites, e.g., intestine, lung and spleen. We noticed a swallowing behavior during the i.n. administration of Ags in all BALB/c mice which means antigens were partially administrated orally. Thus, FBP might be more efficient than CpG if orally administered. This

should be confirmed by performing an oral vaccination experiment for further evaluation of their vaccine efficacy. Another important consideration for developing vaccines against *E. multilocularis* established its infection in the liver is to find a more efficient adjuvant that is able to offset the undesired effect of proteins like antigen B and tetraspanin which is believed to cause a shift from protective Th1 response to non-protective Th2 response [13,48], or fuse FAP with other protective Ags.

Supporting Information

Figure S1 Schematic representation of mucosal anti-rEm-TSP3 specific IgA production against *Echinococcus* oncospheres enhanced by rEm-TSP3-FBP. FBP of Em-TSP3-FBP (T-F) facilitates binding of fusion protein to fibronectin (F) of microfold cells (M), a subepithelial dome rich in dendritic cells (DC), B cells (B) and plasma cells (P). After Em-TSP3-FBP is transported into M cells, DCs take up and present it directly to B cells and T cells (T), which induces IgA (I) class-switching and differentiation *in situ*. Secreted IgA is transported across the epithelium (E), where it serves as a first line of defences against *Echinococcus* oncospheres (O). A blue arrow indicates the enhanced binding of fusion protein to fibronectin of M cells.

(III)

Table S1 List of Genbank accession numbers for the genes referred to in the text.

(DOC)

Acknowledgments

We are grateful to Dr. Chantal Boulard for her suggestions regarding immunology and for her critical reading of the manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: ZD KY CS YO. Performed the experiments: ZD KY. Analyzed the data: ZD YO. Contributed reagents/materials/analysis tools: ZD JF WL YO. Wrote the paper: ZD YO.

References

- Holmgren J, Czerkinsky C, Lycke N, Svennerholm AM (1992) Mucosal immunity: implications for vaccine development. *Immunobiology* 184(2–3): 157–179.
- McGhee JR, Mestecky J, Dertzbaugh MT, Eldridge JH, Hirasawa M, et al. (1992) The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development. *Vaccine* 10(2): 75–88.
- Holmgren J, Lycke N, Czerkinsky C (1993) Cholera toxin and cholera B subunit as oral-mucosal adjuvant and antigen vector systems. *Vaccine* 11(12): 1179–1184.
- Roberts M, Bacon A, Rappuoli R, Pizzi M, Cropley I, et al. (1995) A mutant pertussis toxin molecule that lacks ADP-ribosyl transferase activity, PT-9K/129G, is an effective mucosal adjuvant for intranasally delivered proteins. *Infect Immun* 63(6): 2100–2108.
- Borges O, Lebre F, Bento D, Borchard G, Junginger H (2010) Mucosal vaccines: recent progress in understanding the natural barrier. *Pharm Res* 27(2): 211–223.
- Harandi AM, Sanchez J, Eriksson K, Holmgren J (2003) Recent developments in mucosal immunomodulatory adjuvants. *Curr Opin Investig Drugs* 4(2): 156–161.
- Hopkins SA, Kraehenbuhl JP, Schodl F, Potts A, Peterson D, et al. (1995) A recombinant *Salmonella typhimurium* vaccine induces local immunity by four different routes of administration. *Infect Immun* 63(9): 3279–3286.
- Krieg AM, Davis HL (2006) CpG ODN as a Th1 immune enhancer for prophylactic and therapeutic vaccines. *Vaccine Adjuvants: Immunological and Clinical Principles* (Hackett C. and Harn, DA, Jr., eds.). Totowa: Humana Press Inc. pp.87–110.
- Giddings OK, Eickhoff CS, Sullivan NL, Hoff DF (2010) Intranasal vaccinations with the trans-sialidase antigen plus CpG adjuvant induce mucosal immunity protective against conjunctival *Trypanosoma cruzi* challenges. *Infect Immun* 78(3): 1333–1338.
- Aldridge JR, Johnson EC, Kuhn RE (2010) CpG stimulates protective immunity in BALB/cj mice infected with larval *Taenia crassiceps*. *J Parasitol* 96(5): 920–928.
- Kringel H, Dubey JP, Beshah E, Hecker R, Urban JF Jr (2004) CpG-oligodeoxynucleotides enhance porcine immunity to *Toxoplasma gondii*. *Vet Parasitol* 123(1–2): 55–66.
- Verhelyi D (2006) Adjuvant properties of CpG oligonucleotides in primates. *Methods Mol Med* 127: 139–158.
- Dang ZS, Yagi K, Oku Y, Kouguchi K, Kajino K, et al. (2012) A pilot study of the intranasal recombinant tetraspanin vaccine in BALB/c mice against *Echinococcus multilocularis* infection. *PLoS Negl Trop Dis* 6(3): e1570.
- Schulze K, Medina E, Chhatwal GS, Guzmán CA (2003) Stimulation of long-lasting protection against *Streptococcus pyogenes* after intranasal vaccination with non adjuvanted fibronectin-binding domain of the SfbI protein. *Vaccine* 21(17–18): 1958–1964.
- Guzman CA, Talay SR, Molinari G, Medina E, Chhatwal GS (1999) Protective immune response against *Streptococcus pyogenes* in mice after intranasal vaccination with the fibronectin-binding protein SfbI. *J Infect Dis* 179(4): 901–906.
- Medina E, Talay SR, Chhatwal GS, Guzmán CA (1998) Fibronectin-binding protein I of *Streptococcus pyogenes* is a promising adjuvant for antigens delivered by mucosal route. *Eur J Immunol* 28(3): 1069–1077.
- Schulze K, Guzmán CA (2003) Identification of the domains of the fibronectin-binding protein I of *Streptococcus pyogenes* responsible for adjuvanticity. *FEMS Immunol Med Microbiol* 37(2–3): 173–177.
- Talay SR, Valentin-Weigand P, Jerlstrom PG, Timmis KN, Chhatwal GS (1992) Fibronectin-binding protein of *Streptococcus pyogenes*: sequence of the binding domain involved in adherence of streptococci to epithelial cells. *Infect Immun* 60(9): 3837–3844.
- Scott TE, Lin TL, Wu CC (2002) Fibronectin attachment protein is necessary for efficient attachment and invasion of epithelial cells by *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*. *Infect Immun* 70(5): 2670–2675.
- Scott TE, Lin TL, Wu CC (2004) *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* fibronectin attachment protein facilitates M-cell targeting and invasion through a fibronectin bridge with host integrins. *Infect Immun* 72(7): 3724–3732.

21. Schorey JS, Holsti MA, Ratliff TL, Allen PM, Brown EJ, et al. (1996) Characterization of the fibronectin-attachment protein of *Mycobacterium avium* reveals a fibronectin-binding motif conserved among mycobacteria. *Mol Microbiol* 21(2): 321–329.
22. Zhao W, Schorey JS, Groger R, Allen PM, Brown EJ, et al. (1999) Characterization of the fibronectin-binding motif for a unique mycobacterial fibronectin attachment protein, FAP. *J Biol Chem* 274(8): 4521–4526.
23. Dang Z, Yagi K, Oku Y, Kouguchi H, Kajino K, et al. (2009) Evaluation of *Echinococcus multilocularis* tetraspanins as vaccine candidates against primary alveolar echinococcosis. *Vaccine* 27(52): 7339–7345.
24. Kelley LA, Sternberg MJ (2009) Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat Protoc* 4(3): 363–337.
25. Krieg AM, Yi A-K, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, et al. (1995) CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374(6522): 546–549.
26. Sparwasser T, Koch ES, Vabulas RM, Heeg K, Lipford GB, et al. (1998) Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells. *Eur J Immunol* 28(6): 2045–2054.
27. Roman M, Martin-Orozco E, Goodman JS, Nguyen MD, Sato Y, et al. (1997) Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1-promoting adjuvants. *Nat Med* 3(8): 849–854.
28. Chu RS, Targoni OS, Krieg AM, Lehmann PV, Harding CV (1997) CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity. *J Exp Med* 186(10):1623–1631.
29. McCluskie MJ, Davis HL (1998) CpG DNA is a potent enhancer of systemic and mucosal immune responses against hepatitis B surface antigen with intranasal administration to mice. *J Immunol* 161(9): 4463–4466.
30. Horner AA, Ronaghy A, Cheng PM, Nguyen MD, Cho HJ, et al. (1998) Immunostimulatory DNA is a potent mucosal adjuvant. *Cell Immunol* 190(1):77–82.
31. Moldoveanu Z, Love-Homan L, Huang WQ, Krieg AM (1998) CpG DNA, a novel immune enhancer for systemic and mucosal immunization with influenza virus. *Vaccine* 16(11–12): 1216–1224.
32. Pater C, Müller V, Harraga S, Lianco M, Godot V, et al. (1998) Intestinal and systemic humoral immunological events in the susceptible BALB/c mouse strain after oral administration of *Echinococcus multilocularis* eggs. *Parasite Immunol* 20(12): 623–629.
33. Schorey JS, Li Q, McCourt DW, Bong-Mastek M, Clark-Curtiss JE, et al. (1995) A *Mycobacterium leprae* gene encoding a fibronectin binding protein is used for efficient invasion of epithelial cells and Schwann cells. *Infect Immun* 63(7): 2652–2657.
34. Lee JS, Shin SJ, Collins MT, Jung ID, Jeong YI, et al. (2009) *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* fibronectin attachment protein activates dendritic cells and induces a Th1 polarization. *Infect Immun* 77(7): 2979–2988.
35. Xue Y, O'Mara MI, Surawski PP, Trau M, Mark AE (2011) Effect of poly (ethylene glycol) (PEG) spacers on the conformational properties of small peptides: a molecular dynamics study. *Langmuir* 27(1): 296–303.
36. Zhang W, Ross AG, McManus DP (2008) Mechanisms of immunity in hydatid disease: implications for vaccine development. *J Immunol* 181(10): 6679–6685.
37. Radwanska M, Magez S, Michel A, Stijlemans B, Geuskens M, et al. (2000) Comparative analysis of antibody responses against HSP60, invariant surface glycoprotein 70, and variant surface glycoprotein reveals a complex antigen-specific pattern of immunoglobulin isotype switching during infection by *Trypanosoma brucei*. *Infect Immun* 68(2): 848–860.
38. Snapper CM and Mond JJ (1993) Towards a comprehensive view of immunoglobulin class switching. *Immunol Today* 14(1): 15–17.
39. Vuitton DA, Gottstein B (2010) *Echinococcus multilocularis* and its intermediate host: a model of parasite-host interplay. *J Biomed Biotechnol* 2010: 923193.
40. Vuitton DA (2003) The ambiguous role of immunity in echinococcosis: protection of the host or of the parasite? *Acta Trop* 85(2): 119–132.
41. Gottstein B, Haag K, Walker M, Matsumoto J, Mejri N, et al. (2006) Molecular survival strategies of *Echinococcus multilocularis* in the murine host. *Parasitol Int* 55(Suppl): S45–S49.
42. Gottstein B, Mesarina B, Tanner I, Ammann RW, Wilson JF, et al. (1991) Specific cellular and humoral immune responses in patients with different long-term courses of alveolar echinococcosis (infection with *Echinococcus multilocularis*). *Am J Trop Med Hyg* 45(6): 734–742.
43. Gottstein B (1992) *Echinococcus multilocularis* infection: immunology and immunodiagnosis. *Adv Parasitol* 31: 321–380.
44. Gottstein B, Wunderlin E, Tanner I (1994) *Echinococcus multilocularis*: parasite-specific humoral and cellular immune response subsets in mouse strains susceptible (AKR, C57BL/6J) or resistant (C57BL/10) to secondary alveolar echinococcosis. *Clin Exp Immunol* 96: 245–252.
45. Vuitton DA, Zhang S, Yang Y, Godot V, Beurton I, et al. (2006) Survival strategy of *Echinococcus multilocularis* in the human host. *Parasitol Int* 55(Suppl): S51–55.
46. Mourglia-Etlin G, Marqués JM, Chabalgoity JA, Dematteis S (2011) Early peritoneal immune response during *Echinococcus granulosus* establishment displays biphasic behavior. *PLoS Negl Trop Dis* 5(8): e1293.
47. Nono JK, Pletinckx K, Lutz MB, Brehm K (2012) Excretory/secretory-products of *Echinococcus multilocularis* larvae induce apoptosis and tolerogenic properties in dendritic cells *in vitro*. *PLoS Negl Trop Dis* 6(2): e1516.
48. Rigano R, Buttari B, Profumo E, Ortona E, Delunardo F, et al. (2007) *Echinococcus granulosus* antigen B impairs human dendritic cell differentiation and polarizes immature dendritic cell maturation towards a Th2 cell response. *Infect Immun* 75(4): 1667–1678.
49. Tran MH, Pearson MS, Bethony JM, Smyth DJ, Jones MK, et al. (2006) Tetraspanins on the surface of *Schistosoma mansoni* protective antigens against schistosomiasis. *Nat Med* 12(7): 835–840.
50. Cai P, Bu L, Wang J, Wang Z, Zhong X, et al. (2008) Molecular characterization of *Schistosoma japonicum* tegument protein tetraspanin-2: Sequence variation and possible implications for immune evasion. *Biochem Biophys Res Commun* 372(1): 197–202.
51. Woof JM, Kerr MA (2006) The function of immunoglobulin A in immunity. *J Pathol* 208(2): 270–282.
52. Kilian M, Mestecky J, Russell MW (1988) Defense mechanisms involving Fc-dependent functions of immunoglobulin A and their subversion by bacterial immunoglobulin A proteases. *Microbiol Rev* 52(2): 296–303.
53. Underdown BJ, Schiff JM (1986) Immunoglobulin A strategic defense initiative at the mucosal surface. *Annu Rev Immunol* 4: 389–417.
54. Abu-Ghazaleh RI, Fujisawa T, Mestecky J, Kyle RA, Gleich GJ (1989) IgA-induced eosinophil degranulation. *J Immunol* 142(7): 2393–2400.
55. Eckmann I. (2003) Mucosal defences against *Giardia*. *Parasite Immunol* 25(5): 259–270.
56. Inaba T, Sato H, Kamiya H (2003) Monoclonal IgA antibody-mediated expulsion of *Trichinella* from the intestine of mice. *Parasitology* 126(Pt6): 591–598.
57. Sardinha LR, Mosca T, Elias RM, do Nascimento RS, Gonçalves LA, et al. (2010) The liver plays a major role in clearance and destruction of blood trypanomastigotes in *Trypanosoma cruzi* chronically infected mice. *PLoS Negl Trop Dis* 4(1): e578.
58. Gottstein B, Felleisen R (1995) Protective immune mechanisms against the metacystode of *Echinococcus multilocularis*. *Parasitol Today* 11: 320–326.
59. Harandi AM, Sanchez J, Eriksson K, Holmgren J (2003) Recent developments in mucosal immunomodulatory adjuvants. *Curr Opin Investig Drugs* 4(2): 156–161.

多包条虫の終宿主診断と感染源対策

奥 祐 三 郎

鳥取大学 農学部 獣医寄生虫病学教室

Diagnosis and countermeasure for *Echinococcus multilocularis* in fox

Yuzaburo Oku

Laboratory of Veterinary Parasitology, Faculty of Agriculture, Tottori University

1. はじめに

多包条虫 *Echinococcus multilocularis* は北半球に広く分布し、好適な終宿主はアカギツネ（キタキツネはこの亜種）、犬、オオカミ、コヨーテ、ホッキョクギツネなどの犬科動物で、主な中間宿主は齧歯類（ハタネズミ類などの様々なネズミ、ナキウサギ、リス類）である [3]。国内では主にアカギツネとエゾヤチネズミ間で伝播している [19]。

世界的には北半球に広く分布し、約 30 万人ほどの多包虫症の患者が見積もられている。国内では 1928 年の宮城の人体症例が初報告であるが、現在は北海道でのみ伝播（キツネと野鼠のサイクル）が知られている。1937 年からは礼文島、1966 年からは道東（根室、別海地方）の風土病の原因寄生虫として知られてきたが（皆川, 1997）、1980 年代に全道への流行地の拡大が判明し、さらに 1990 年代にはキツネにおける感染率が全道的に上昇し、近年は約 40% となっている [20]。本州からは 1999 年に青森県から感染豚が発見され、2005 年には埼玉県の捕獲犬からのエキノコックス虫卵検出が新聞の紙面を賑わし [29]、多包条虫の本州への侵入・定着も危惧されている [2]。すでに本州からも原発例と考えられる患者も多く報告されてきた [25]。本州の人体症例の感染経路は全く不明である。現在も多包条虫が本州において定着している証拠はないが、今後とも監視が必要である。

2. キツネの多包条虫の感染状況

北海道（行政）により、道東では 1966 年から、全道的には 1983 年からキツネの剖検調査が毎年行われてお

り、このような長期間にわたる調査結果は世界的にも貴重なデータとなっている。1983 年以降では、同一の検査法（小腸下部 1/6 の腸粘膜検査）で実施されており、1983～1992 年は約 20%、1993 年以降は約 40% の感染率と上昇している。これらの年毎の調査データは道庁のホームページにも掲載されている。

寄生虫の流行状況を把握するためには、感染率だけでなく、寄生虫体数や排泄する虫卵数も重要であるが、これらについては一部のみ調べられている。1999 年の小樽における 67 頭のキツネの剖検調査（全小腸検査）では、38 頭（57%）が多包条虫陽性で、1 万虫体以上の寄生は 42%（16/38）であった [30]。現在まで報告されているドイツやスイスのデータと比べて小樽の結果はかなり高い値である。キツネによる虫卵の排泄量についての野外の定量的データはないが、この小樽の検査材料の直腸便を用いた虫卵検査では、EPG 1～100 が 6 頭、101～10,000 が 7 頭、10,001 以上が 3 頭で、感染動物でも半数は EPG 1 以下で、一部の感染キツネのみが多数の虫卵を排泄していることが示されている [30]。

以上のキツネの調査結果は、農村部に生息する個体のデータであるが、人への感染源としては都市部におけるキツネの情報も重要である。1997 年の札幌市（市街地）におけるキツネの繁殖巣調査では、主に市街地辺縁部および中心部で 19 の繁殖巣が見つかり、辺縁部の 11 箇所（テニア科）でエキノコックス抗原陽性（後述）の糞便が採取された。さらにこの 11 箇所中 7 箇所において虫卵（テニア科）も検出された。市街地におけるエゾヤチネズミの生息密度は低いが、都市の辺縁部ではキツネが繁殖・生息し、多包条虫に感染していることが示されている [26]。

3. 終宿主（キツネおよび犬）の診断法

終宿主におけるエキノコックスの診断法としては様々な方法が行われている。剖検は小腸内の成虫を直接観察し、虫体を検出する最も信頼できる方法である。さらに、寄生している虫体数も把握できるが、飼犬や飼猫の診断には適用できない。また、解剖検査のためには、虫卵が人へも感染力を有することから、特別な施設が必要となる。なお、この剖検でも、腸管を全部検査すると高感度で信頼できる結果が得られるが、労力と時間を要する。したがって、大量の検体の検査を行う場合は、省力化した方法が用いられている [3]。すなわち、小腸の数カ所から粘膜を一部ずつサンプリングする方法と、北海道の行政検査のように小腸の一部のみを検査する方法であり、当然、これらの方法では感度がやや低下する。しかし、いずれの方法も成虫を直接観察し、他の寄生虫との鑑別は容易なことから特異度はほぼ 100%と考えられる。

一般に生時の寄生虫診断法としては、糞便内の虫卵の検出が行われるが、多包条虫とその近縁なテニア科条虫（猫条虫・豆状条虫・胞状条虫・ヒツジ条虫など）の虫卵の形態的な鑑別は不可能であることが重大な欠点とされている。この特異性に関する欠点に加えて、寄生虫体数が少ない場合や、虫卵を排泄するまでの期間内での虫卵検出は不可能で、さらに、多包条虫感染では、感染 1～2 か月において脱片節が周期的に行われるので、排泄虫卵数が極端に変動する。我々の用いている蔗糖液遠心浮遊法では 0.5g の糞便を検査しているが、自然感染ギツネの直腸便を用いた検査では 40～45%の感度であった [30]。検査に用いる糞便の量や検査回数を増やすことによって、さらにフィルターペーパーを用いることなどによって、虫卵検出法の感度を上げる改善が必要である。

テニア科条虫の虫卵の新たな鑑別については、近年 PCR 法が実施されている。糞便中に虫卵が検出された場合は、虫卵を分離し、PCR で多包条虫に特異的な DNA 領域（多くの場合ミトコンドリアの遺伝子）を増幅し検出できる。したがって、陽性反応が出た場合の特異度は 100%である。この感度は虫卵検出の感度に依存するが、虫卵が検出されても、虫卵が変性した場合などは PCR による DNA 増幅が出来ないことがあり、陰性結果の判定には注意を要する。糞便から虫卵を分離せず、糞便から直接多包条虫に特異的な DNA を検出する試みもなされているが、感度が低い。終宿主（犬、狐等）にはテニア科（単包条虫、多包条虫、羊条虫、多頭

条虫、胞状条虫など）の成虫が同時に複数種感染することがある。我々は多数のテニア科条虫を用いて、PCR/Dot blot 法により種特異的および属特異的なプローブをミトコンドリアの *nad1* 遺伝子を用いて構築した [1]。Reverse line blot 法では、一枚の膜に多数の種のプローブを配置し、同時に多数のテニア科条虫が鑑別可能であり、今後の開発が期待される。

現在、北海道においてもっとも多く使用されている方法として、成虫が排泄・分泌する代謝産物を、糞便内抗原として検出する方法がある。国内では、*Echinococcus* 属に特異的な抗原に対するモノクロナール抗体 EmA9 を利用した糞便内の多包条虫抗原を検出するサンドイッチ ELISA 法とインムノクロマト（犬用のキット）が行われている。特に、後者はキットが市販されている。EmA9 の認識する抗原は成虫の体表から分泌される糖蛋白で、耐熱性である [9]。EmA9 はほぼエキノコックス特異的で、猫条虫、有線条虫、裂頭条虫、*Taenia crassiceps* などとは全く反応しないが [9, 23]。胞状条虫感染例で一部交差反応が認められることがある [11]。なお、国内では、胞状条虫感染は極めてまれであることから、この交差反応については重要な欠点とはなっていない。糞便内抗原はキツネへの実験感染後 1 週以内に検出されはじめるので、感染早期の診断が可能である。また、キツネの糞便内抗原の OD 値と剖検による検出虫体数にはある程度の相関があり [13, 30]、感染強度の目安になる。感染虫体数に対する検出限界については、少なくとも 10-100 虫体程度の感染であれば検出できると推定される。

なお、感染犬およびキツネの感染後経時的な抗原と虫卵の陽性率の推移を調べたところ、虫卵は感染後 1 か月～2 か月間のみ陽性であるが [28]、抗原の陽性は感染後 1 週から感染後 2 から 4 か月間続いた [15]。キツネの剖検による寄生虫陽性キツネの直糞便の検査では、抗原陽性率は 90%以上であるが、一方、前述したように虫卵陽性率は 40～45%と低い [14, 30]。

4. 現在の多包条虫に対する対策

現在、北海道ではキツネが人里に来ないように畜産廃棄物や生ゴミを適切に処理することや、水道の完備、キツネを触ったりしないこと、山菜や野菜をよく洗うこと、手洗いを励行することなどが注意点としてあげられている（皆川 1997）。さらに、早期診断のための住民の血清検査も行われているが、近年の受診者は北海道民約 548

万に対して年間4万人程度である。

また、北海道では飼犬から時折多包条虫が検出されており、特に、放し飼いの犬および散歩時に犬をリードから放すと野鼠を捕食する可能性がある。犬の放し飼いについては狂犬病予防法ですでに禁止されているが、北海道ではさらに多包条虫について飼い主への啓蒙活動が必要である [21]。ペットによっては、例えば飼い主がしばしばリードからはなすような犬については、定期的な駆虫が必要な場合も考えられる。

5. 多包条虫の感染源対策(キツネの駆虫)

上述したような、受動的な対策ではなく、多包条虫を積極的にコントロールするという試みも行われている。駆虫薬のブラジカンテルが終宿主において、ほぼ100%の駆虫効果があることから、駆虫薬入りのエサ(ベイト)を作成し、キツネの生息地に定期的にばらまくことが海外でも試みられている [4, 6, 10, 24]。

我々も北海道において感染源対策の研究を行ってきた。毎月定期的にベイトを散布することで虫卵排泄開始前に駆虫され、外界への虫卵排泄が減少し、それによって野ネズミの感染する機会が減少し、さらに野ネズミをキツネが食べたとしてもキツネへの感染機会がより減少する効果を期待している。ただし、この方法はベイト散布場所の選定の成否、散布地域の大きさ、定期的散布の持続などが重要であり、ベイト散布を中止するとキツネの感染率が徐々に元に戻る。また、散布するベイト数が少なかったり、散布間隔が長すぎたりしてキツネの駆虫が不十分であったり、また大規模に行わないと周辺から感染キツネが侵入し、効果があまりないことも予想される。したがって、我々は効果を確認しながらベイト散布を行っている。

5-1. 感染源対策の評価法

駆虫効果の判定については、ハンターが捕獲したキツネを用いた剖検調査も行われているが、国内では散布地域の多数のキツネの糞便採取が容易で、これらの糞を用いて糞便内抗原や虫卵の有無の検査を行うことによっても、判定が可能である [13, 16, 22]。特に、野外採取された多数のキツネの糞便の検査により、地域の全体的な流行状況の推移が把握可能で、前述したように各糞便の採取ポイントのGPS記録により感染キツネの生息場所なども特定可能である。現在、北海道ではこの野外で採取された多数のキツネ糞便の抗原および虫卵検査により

駆虫効果の判定が行われている [7, 8, 20]。

なお、ベイト散布だけでなく終宿主に対して効果的なワクチン開発も望まれるが、自然感染では若干の再感染防御が示唆されているだけである。今後、顕著な感染防御を付与するためにはさらなる研究が必要である。

我々は駆虫薬入りのベイトを作成し、キツネの生息地に定期的(5-11月まで毎月)にばらまくことを試みてきた(100-200個/km²)。まずは、小清水町において、1998年-2000年に、キツネの繁殖巣の場所が特定できる場合は巣穴の周辺に [27]、それ以降はキツネの生息する地域一帯で、自動車から道路縁へベイトを散布したり(例えば50mに1個ずつ)、キツネが通りそうな場所、例えば防風林と道路の交点などに散布することなどで、キツネの感染率が顕著に減少することを示してきた。

2000年以降のベイト散布は地域住民によって行われている。このような感染源対策の試みは地域住民の理解と住民の参加が必要であり、継続する必要がある。行政による支援も不可欠である。北海道(行政)はこれに関するガイドライン「キツネの駆虫に関するガイドライン」を作成し、北海道庁のホームページからダウンロード可能となっている。

5-2. 駆虫薬入りベイト

我々のベイトは、魚のすり身と魚粉が主成分で、ブラジカンテル(50mg/個)を添加し、重量は約10gである。なお、魚粉は臭いでキツネを誘引するためのものである。小樽におけるキツネのこのベイトの摂取率を調べるために、テトラサイクリン(蛍光物質)をベイトに添加して、ベイト散布地域で捕獲されたキツネの歯に沈着した蛍光物質のラインの有無を調べた。ベイト散布の継続とともにキツネの歯の蛍光ラインの出現率(ベイト摂取率)は上昇し、ベイト散布4年後の幼獣による摂取率は100%、成獣は40%となった。さらに継続することにより、成獣による摂取率も上昇することが期待される [5]。なお、北海道において、幼獣の多包条虫感染率と感染虫体数は、成獣のそれらより顕著に高いことが知られている [14, 30]。

5-3. キツネの糞便採取

キツネの排便はテリトリーの顯示のためにも行われるが、一般にどこで排便するかなどの詳細については不明である。我々は当初、道路周辺だけでなく農作地の周辺についても糞便を人海戦術で歩いて探索したが、非常に労力を必要とした。現在は、道路際を重点的に探索し、

この方法は北海道では効率的な方法と考えている。当然のことながら、糞便の数はキツネの生息数を反映すると考えられ、糞便の密度は北海道内でも地域により様々である。

なお、キツネの糞便と他のタヌキ、テン、犬、猫などの糞および猛禽類のペリットとの鑑別については、糞便の形状および糞内容物から鑑別しているが、一部困難なことがある。糞主の遺伝子検査による同定結果では、北海道で採取されたキツネの糞便らしきものはほとんどがキツネの糞便であったことが確認されている [18]。

5-4. 住民参加の駆虫薬入りペイト散布効果

まず、散布を予定している団体および市町村と感染源対策実施について相談し、以下のように実施した。

- 1) 散布予定地について、まず、地図（航空写真）を用いて糞便採取ポイントとペイト散布経路を立案した。糞便採取もペイト散布も自動車を利用し、道路周辺で行った。住民や耕作地周辺からのエキノコックス虫卵数の減少を意図しており、人里からはなれた山中にはペイト散布していない。
- 2) つぎに、実際に道路を自動車で行き経路が妥当であるか確認した。特に、キツネの出没しそうな場所を現地で確認した。
- 3) ペイト散布前の状況を知るために、キツネの糞便を採取して（採取地点はGPSでプロット）、糞便検査（虫卵は蔗糖液遠心浮遊法、抗原はEmA9を用いたサンドイッチELISA）を行い、糞便内抗原およびテニア科虫卵の検査結果を地図上にプロットした。採取糞便数は地域によって異なるが、出来るだけペイト散布する地域から全体的にほぼ均等に採取するように試み、採取糞便数は1回当たり40個/100km²程度を目処にした。このようにペイト散布開始前年の7-11月に3回ほどキツネの糞便の調査を行い、ペイト散布前のデータとした。糞便採取は感染の危険を伴うため、限定された人のみで実施した。
- 4) ペイト散布は自動車を利用し、積雪期を除いた5-11月に、毎月道路沿いに10-20個/km²程度で散布した。虫卵陽性糞便の多いところでは散布個数を増やした。このペイト散布は講習後、住民が行なった。ペイト散布は毎月行っているが、前述したように、これは多包条虫のプレパテントピリオドが約1か月であることから、感染キツネからの虫卵排泄を予防するためにこの間隔とした。
- 5) ペイト散布後は7-11月の間に1回糞便採取調査を

行なった。糞便検査を実施し、これでペイト散布効果を判定し、次年度多数ペイト散布する場所、ルート等について住民と協議した。

- 6) なお、ペイト作成時には各団体もしくは各町村から少なくとも1名参加している。これは作成した駆虫薬入りペイトの売買・譲渡は薬事法で規制されているため、散布する人（団体）がペイトを作成することになっている。

5-4-1. 小清水町におけるペイト散布効果

小清水町（全町約200km²、散布地は約100km²）では、農道が整備されており、農地はほぼ碁盤の目のようになっているので、ペイト散布や糞便採取にとって理想的な地域である。1998年からペイト散布を開始し、ペイト散布前におけるキツネ糞便の抗原陽性率は60%、虫卵陽性率は20%で、キツネのエキノコックス感染率が高いことが予想された。2005年からは2010年まで、住民による毎月のペイト散布がほぼ全町（200ポイント）で行われた（2007年のみ2か月に一度）。この間のキツネ糞便の抗原陽性率は10%、虫卵陽性率は0-3%であり、2か月に一度の散布の2007年では陽性率が少し上昇する傾向が見られたが、キツネの感染率は顕著に抑えられた。2010年以降は省力化のために2ヶ月に一度散布とし、一方、ペイト散布量は倍量としてその後の推移を観察している。

5-4-2. ニセコ周辺におけるペイト散布効果

ニセコ周辺ではまず、倶知安町がペイト散布を開始し、その後、京極、蘭越、喜茂別、ニセコ、さらに黒松内においてペイト散布が行なわれてきた。ほぼ、全地域で顕著なペイト散布効果が認められている。ここでは、倶知安、京極およびニセコ町の結果について述べる。

倶知安町：倶知安町（260km²）の中心部は道路が碁盤の目のようになっているが、周辺は山に囲まれ山間部に道路が伸びている。散布前の2005年のキツネ糞便の抗原陽性率は20%、虫卵陽性率は7%で、キツネの感染率が小清水よりかなり低いことが予想された。散布前の調査で町の周辺部のみ陽性糞便が発見されたため、ペイト散布は周辺部のみとし、一方糞便採取は中央部についても行い、検査した。2006年から5-11月まで毎月、約1,400個のペイト散布を町周辺に行なった。ペイト散布後は、2006年から顕著に減少し、特に虫卵陽性率はほぼゼロとなったが、抗原陽性率には変動があり、高い場合は10%となっている。

京極町：京極町（231km²）では2007年にベイト散布前の調査を行い、キツネ糞便の抗原陽性率は40%、虫卵陽性率は15%で、キツネの感染率が小清水よりかなり低いことが予想された。ほぼ全域にベイト散布した。2008年から5-11月まで毎月、約1,200個のベイト散布をほぼ全町に実施しているが、2010年まで顕著にキツネの感染状況が抑えられ、虫卵の陽性率は0%、抗原陽性率も漸減し2%に減少している。

ニセコ町：2008年にベイト散布前の調査を行い、キツネ糞便の抗原陽性率は33%、虫卵陽性率は7%で、キツネの感染率が小清水よりかなり低いことが予想された。ほぼ全町から陽性糞便が発見された。したがって、ほぼ全町に2009年から5-11月まで毎月、約1,200個もしくは1,100個のベイト散布を実施しているが、虫卵陽性率は0%で、抗原陽性率は10%以下となり、キツネの感染率が顕著に抑えられている。

5-5. 今後の課題

以上のように、個々の地域で試行錯誤が必要であるが、駆虫薬入り餌の散布によるキツネ感染率の抑制は可能と思われる [17]。今後この方法の改善と普及に向けた活動が重要と考えられる。改善点としては、さらにキツネによる摂取率の高いベイトの開発、ベイトの散布量と時期の検討（例えばキツネの餌が不足する積雪期のベイト散布）である。なお、町の大きさにより、ベイト散布数や検査するキツネ糞便数に差はあるものの、例えば約250km²の地域では、年間百万から百数十万円ほどの予算が必要で、ベイト散布要員が確保されればこの事業は可能である。また、ベイト散布効果の程度や改善すべき点が不明となるが、ベイト散布効果の判定を行わない場合はかなり予算を削減できる。現在、さらにこの感染源対策を普及させるためには、駆虫薬入りベイトの売買や譲渡禁止も妨げになっている。

ベイト散布は感染率を顕著に低下させられるが、周辺からの感染狐の侵入もあり、止めると、感染率が上昇する。根絶するためには山中の散布および広範囲の散布が不可欠となるが、ドイツで行われたような航空機を用いた散布なども行う必要があると思われる [10, 24]。

6. おわりに

かつて、多包条虫症は礼文島および道東の風土病と見なされていた。礼文島ではキツネの密猟により終宿主がほぼ絶滅していたこと、さらに犬の飼育禁止などの対策に

より多包条虫が根絶できたが、道東ではキツネの駆除により対応しようとしたが、結果的には全道に流行地が拡大してしまった [20]。さらに現在の野生動物における流行状況から、今後の患者数の増加や本州への流行地拡大が恐れられている。現在の受動的な対応では、これらを防ぐことは困難である。人に対してより効果的な治療薬の開発も期待されるが、感染が進行し大きくなった多包条虫を完全に駆虫する（すべての寄生虫細胞を殺滅する）薬剤開発は困難で、外科的な切除と組み合わせることが現実的な治療法となっている。多包条虫は通常の蟯虫とは異なり個体単位で生体を維持しているわけではなく、身体の一部の細胞が生き残ると増殖し、長期間の投与でも完全な駆虫が困難である。終宿主の小腸に寄生する成虫の駆虫とは全く異なる。今後、療養の様々な試みが、多包条虫治療でも応用できるかもしれない。

対策を立てるためには費用対効果の算定が重要であるが、現在の北海道内の20名程度の年間発生例だけでなく、観光・農産物に対する風評被害、将来の患者数の増加や本州への拡大も考慮した上での費用対効果を算定すべきであると考えられる。ベイト散布については住民の理解と参加が必要で、今後、多包条虫についてのさらなるリスク評価・伝達・管理の研究が必要と思われる。

謝 辞

本研究は多くの研究者、院生、学生、地域住民の方々の長期間にわたる協力により行われたものである。また様々な科研費により実施されたものである。ここに謹んで、深謝の意を表したい。

Key words : *Echinococcus multilocularis*, fox, control and prevention

引用文献

1. Armua-Fernandez, M. T., Nonaka, N., Sakurai, T., Nakamura, S., Gottstein, B., Deplazes, P., Phiri, I. G., Katakura, K. and Oku Y. 2011. Development of PCR/dot blot assay for specific detection and differentiation of taeniid cestode eggs in canids. *Parasitol. Int.* 60 : 84-89.
2. 土井陸雄、松田繁、内田明彦、神田栄次、神谷晴夫、紺野圭太、玉城英彦、野中成晃、奥祐三郎、神谷正男。2003. 北海道および海外からの畜犬を介するエキノ

- コックス本州侵入の可能性. *日公衛誌* 50 : 639-648.
3. Eckert, J., Gemmell, M. A., Meslin, F.-X. and Pawłowski, Z. S. 2001. WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: a Public Health Problem of Global Concern, Paris. WHO/OIE. pp.266
 4. Hegglin, D. and Deplazes, P. 2008. Control strategy for *Echinococcus multilocularis*. *Emerg. Infect. Dis.* 14 : 1626-1628.
 5. Inoue, T., Nonaka, N., Kanai, Y., Iwaki, T., Kamiya, M. and Oku, Y. 2007. The use of tetracycline in anthelmintic baits to assess baiting rate and drug efficacy against *Echinococcus multilocularis* in foxes. *Vet. Parasitol.* 150 : 88-96.
 6. Janko, C. and König, A. 2011. Disappearance rate of praziquantel-containing bait around villages and small towns in southern Bavaria, Germany. *J. Wildl. Dis.* 47 : 373-380.
 7. Kamiya, M., Lagapa, J. T., Nonaka, N., Ganzorig, S., Oku, Y. and Kamiya, H. 2006. Current control strategies targeting sources of echinococcosis in Japan. *Rev. Sci. Tech.* 25 : 1055-1065.
 8. Kamiya, M., Nonaka, N., Ganzorig, S. and Oku, Y. 2004. Effective countermeasures against alveolar echinococcosis in the red fox population of Hokkaido, Japan. In: Torgerson, P. R., Shaikenov, B. S. (eds.), *Echinococcosis in Central Asia: Problems and Solutions*. pp. 273-282. Publishing House Daur, Almaty, Russia.
 9. Kohnno, H., Sakai, H., Okamoto, M., Ito, M., Oku, Y. and Kamiya, M. 1995. Development and characterization of murine monoclonal antibodies to *Echinococcus multilocularis* adult worms and its use for the coproantigen detection. *Jpn. J. Parasitol.* 44 : 404-412.
 10. König, A., Romig, T., Janko, C., Hildenbrand, R., Holzhofer, E., Kotulski, Y., Ludt, C., Merli, M., Eggenhofer, S., Thoma, D., Vilsmeier, J. and Zannantonio, D. 2008. Integrated-baiting concept against *Echinococcus multilocularis* in foxes is successful in southern Bavaria, Germany. *Eur. J. Wildl. Res.* 54 : 439-447.
 11. Malgor, R., Nonaka, N., Basmadjian, I., Sakai, H., Carámbula, B., Oku, Y., Carmona, C. and Kamiya, M. 1997. Coproantigen detection in dogs experimentally and naturally infected with *Echinococcus granulosus* by a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay. *Int. J. Parasitol.* 27 : 1605-1612.
 12. 皆川知紀. 1997. エキノコックス症対策の総括と展望. *北海道医誌* 72 : 569-581.
 13. Morishima, Y., Tsukada, H., Nonaka, N., Oku, Y. and Kamiya, M. 1999. Coproantigen survey for *Echinococcus multilocularis* prevalence of red foxes in Hokkaido, Japan. *Parasitol. Int.* 48 : 121-134.
 14. Morishima, Y., Tsukada, H., Nonaka, N., Oku, Y. and Kamiya, M. 1999. Evaluation of coproantigen diagnosis for natural *Echinococcus multilocularis* infection in red foxes. *Jpn. J. Vet. Res.* 46 : 185-189.
 15. Nonaka, N., Iida, M., Yagi, K., Ito, T., Ooi, H. K., Oku, Y. and Kamiya, M. 1996. Time course of coproantigen excretion in *Echinococcus multilocularis* infection in foxes and an alternative definitive host, golden hamsters. *Int. J. Parasitol.* 26 : 1271-1278.
 16. Nonaka, N., Tsukada, H., Abe, N., Oku, Y. and Kamiya, M. 1998. Monitoring of *Echinococcus multilocularis* infection in red foxes in Shiretoko, Japan, by coproantigen detection. *Parasitology* 117 : 193-200.
 17. Nonaka, N., Kamiya, M. and Oku, Y. 2006. Towards the control of *Echinococcus multilocularis* in the definitive host in Japan. *Parasitol. Int.* 55 (Suppl) : S263-S266.
 18. Nonaka, N., Sano, T., Inoue, T., Armua, T.-M., Fukui, D., Katakura, K. and Oku, Y. 2009. Multiplex PCR system for identifying the carnivore origins of faeces for an epidemiological study on *Echinococcus multilocularis* in Hokkaido, Japan. *Parasitol. Res.* 106 : 75-83.
 19. Oku, Y. and Kamiya, M. 2003. Chapter III : 5. Biology of *Echinococcus*. In: *Progress of Medical Parasitology*, Otsuru, M., Kamegai, S. and Hayashi, S. eds., Meguro Parasitological Museum, Tokyo, pp. 293-318.
 20. 奥祐三郎. 2002. 北海道における多包条虫の現状、終宿主診断と感染源対策. *北獣会誌* 46 : 1-13.
 21. 奥祐三郎. 2004. 犬のエキノコックス症. *獣医寄生*

- 虫誌. 3 : 17-19.
22. Sakai, H., Nonaka, N., Yagi, K., Oku, Y. and Kamiya, M. 1998. Coproantigen detection in a routine fox survey of *Echinococcus multilocularis* infection in Hokkaido. Japan. *Parasitol. Int.* 47 : 47-51.
23. Sakashita, M., Sakai, H., Kohno, H., Ooi, H. K., Oku, Y., Ito, M. and Kamiya, M. 1995. Detection of *Echinococcus multilocularis* coproantigens in experimentally infected dogs using murine monoclonal antibody against adult worms. *Jpn. J. Parasitol.* 44 : 413-420.
24. Schelling, U., Frank, W., Will, R., Romig, T. and Lucius, R. 1997. Chemotherapy with praziquantel has the potential to reduce the prevalence of *Echinococcus multilocularis* in wild foxes (*Vulpes vulpes*). *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 91 : 179-186.
25. 高橋昭博、山口富雄、稲葉孝志、林 博昭. 1986. 本州における多包虫症の文献的考察. *寄生虫誌* 35 : 95-107
26. Tsukada, H., Morishima, Y., Nonaka, N., Oku, Y. and Kamiya, M. 1999. Preliminary study of the role of foxes in *Echinococcus multilocularis* transmission in the urban area of Sapporo, Japan. *Parasitology* 120 : 423-428.
27. Tsukada, H., Hamazaki, K., Ganzorig, S., Iwaki, T., Konno, K., Lagapa, J. T., Matsuo, K., Ono, A., Shimizu, M., Sakai, H., Morishima, Y., Nonaka, N., Oku, Y. and Kamiya, M. 2002. Potential remedy against *Echinococcus multilocularis* in wild red foxes using baits with anthelmintic distributed around fox breeding dens in Hokkaido, Japan. *Parasitology* 125 : 119-129.
28. 八木欣平、伊東拓也. 1999. 感染実験による多包条虫の生物学的性状の解析. 北海道のエキノコックス, p.51-63. 北海道立衛生研究所.
29. 山本徳栄、近真理奈、山口正則、丹野瑛喜子、小山雅也、前野直弘、東久、水澤馨、木村弘、森嶋康之、川中正憲. 2005. 埼玉県内の犬の糞便から検出されたエキノコックス (多包条虫) の虫卵. *IASR* 26 : 307-308.
30. Yimam, A. E., Nonaka, N., Oku, Y. and Kamiya, M. 2002. Prevalence and intensity of *Echinococcus multilocularis* in red foxes (*Vulpes vulpes schrencki*) and raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides albus*) in Otaru City, Hokkaido, Japan. *Jpn. J. Vet. Res.* 49 : 287-296.
- その他の参考資料 [ガイドライン]
- 「犬のエキノコックス症対策ガイドライン 2004」厚生労働省
- 「小動物臨床家のためのエキノコックス症対応マニュアル 2003」改訂版 2008 北海道小動物獣医師会
- 「キツネの駆虫に関するガイドライン」北海道庁
- 連絡先責任者：奥祐三郎、鳥取大学農学部獣医寄生虫病学教室、〒680-8553 鳥取市湖山町南 4-101、E-mail : oku@muses.tottori-u.ac.jp
- Correspondence : Y.Oku, Laboratory of Veterinary Parasitology, School of Veterinary Medicine, Tottori University, 4-101 Koyama-Minami, Tottori, 680-8553

犬と猫の 治療ガイド 2012

私はこうしている

[編集]

辻本 元 小山秀一 大草 潔 兼島 孝

エキノкокクス症

Echinococcosis

神谷 正男 Masao Kamiya

環境動物フォーラム / OIE(国際獣疫事務局) エキノкокクス症リファレンスラボラトリー

エキノкокクスは寄生虫(糸虫:サナダムシ)の仲間
でヒトへ感染すると重篤な疾病を引き起こす。公衆衛生
上重要な種類に単包糸虫と多包糸虫があり、日本でとく
に問題となっているのは多包糸虫である。ヒトのエキノ
кокクス症は1999年4月施行の「感染症の予防及び感
染症の患者に対する医療に関する法律」で四類感染症に
分類された。医師が診断した場合、厚労省令で定める事
項(患者の年齢、性別など)を最寄りの保健所長を経由
して都道府県知事に届け出なければならない疾病と
なった。さらに2004年10月には「感染犬の届出」が獣
医師に義務づけられ、翌年1月「第1号の届出」があっ
た。このようにわが国では、世界に先駆けて法律の裏づ
けのもと「エキノкокクス症感染源対策」が整備されつ
つある。一方、流行地において主要な感染源となってい
る。キツネ対策(駆虫薬による)についても地域の住民、
獣医師の参加によって汚染環境の修復が進んでいる(参

照: SA Medicine 36号(2005年4月)特集「ズーノシ
ス」)。

病態

多包糸虫は本来キツネと野ネズミの間で伝播する。
図1に成虫から次の世代の成虫になるまでの過程(生
活環)を示す。生活環は、1. 虫卵(終宿主の糞便ととも
に外界:中間宿主への感染源)、2. 幼虫(多包虫:中間
宿主の内臓)、3. 成虫(終宿主の腸粘膜)の3段階を経
る。幼虫と成虫はそれぞれ異なる種の動物に寄生し、喰
うもの(捕食者:キツネ、犬、猫など)と喰われるもの
(被捕食者:ネズミなど)の関係をを利用して生活してい
る。

犬の場合、成虫はその頭節で小腸粘膜に吸着する程度
で固有層に侵入することはないため、顕著な症状を示さ
ない。まれに、下痢や粘血便がみられる(図2)。その際、

15

感染症

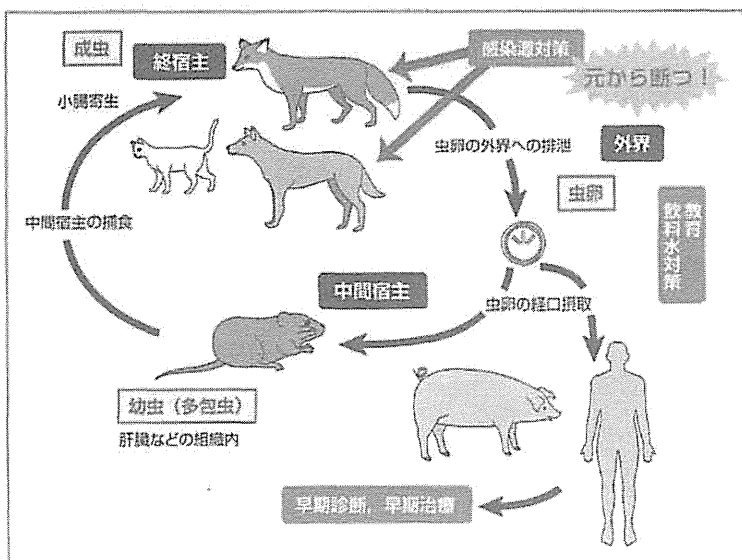


図1 多包糸虫の生活環
(SA Medicine 36号(2005年4月) P.36図3を引用)

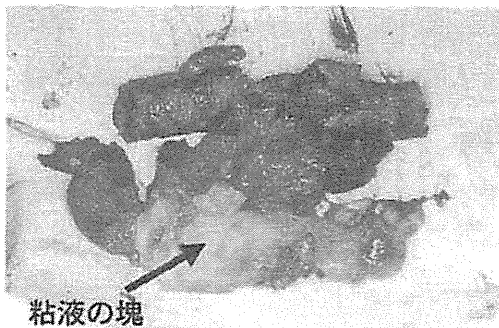


図2 犬における臨床症状

通常は無症状で、普通の硬い便に加えて粘液の塊を排泄したり、まれに下痢便を排泄する。成虫が糞便とともに排泄される場合もあるが、小形の虫体なので、顕微鏡で観察しないと判別不可能である。(SA Medicine 36号(2005年4月) P.36図4を引用)

1~4mm程度の細い白色の虫体を排泄することがある。糞便中にエキノコックス様の虫体が発見された場合は、生殖孔、頭節、片節および虫卵の形態観察により同定が可能である。

猫の場合、野ネズミを捕食する機会が多いため感染する可能性は高いが、犬やキツネに比べて感受性は低く成虫に発育し虫卵を排泄する例は少ない。しかし最近、欧米や国内でも飼い猫での虫卵排出例が報告されるようになった(Nonaka *et al.*, 2008)。猫がFIVなどで免疫抑制状態になると虫卵排出する可能性があるため、注意する必要がある。

診断

犬の場合、通常は感染しても無症状なため、流行地においては野ネズミを食べた、あるいはその可能性のある犬は「感染した可能性のある犬」と考えられ、以下の検査が勧められる。なお、野ネズミのすべてが感染しているわけではないが、野ネズミの捕食頻度が高いほど感染する確率も高い。猫の場合も同様である。

問い合わせ先

- 1) 犬の迅速診断キット「エキット」による陽性例の確認検査：
実験動物中央研究所 ICLAS モニタリングセンター
(〒216-0001 川崎市宮前区野川1430 TEL 044-754-4455) <http://www.iclasmonic.jp/aisatu.html>
- 2) 野生動物、キツネを含む犬、猫などの検査(寄生虫卵の確認を含む)ならびに感染源対策一般(環境修復)：
環境動物フォーラム
(〒065-0020 札幌市東区北20条東2丁目2-32 TEL 011-731-6767) <http://www.k3.dion.ne.jp/~fea/>



図3 犬の糞便中のエキノコックス虫体由来抗原の検出用キット「エキット」

糞便を用いた院内検査が可能で、1ステップ操作、30分で目視判定でき、早期の感染をスクリーニングできる。

検査/感染源対策の項目

検査	糞便の抗原検査(サンドイッチELISAプレート法)による抗原価の測定	
	糞便の虫卵検査	シヨ糖浮遊法で集卵し顕微鏡下で判定(テニア科条虫卵)
	虫卵のDNA検査(確定診断)	PCR法、PCR-RFLP法
感染源対策	流行地における野生動物(キツネなど)へ駆虫剤散布と効果判定(糞便内の抗原価の推移の測定)	

検査のポイント

犬の糞便中にテニア科条虫卵が検出された場合は、エキノコックスの可能性があるので、検査者も飼い主も注意を要する。エキノコックス様の虫体が発見された場合、生殖孔の位置は種同定に重要である。

糞便内抗原検査で陽性となった例については虫卵検査し、虫卵が検出されたものについてはPCR法により確定診断する。抗原陽性であるが、虫卵陰性のものについては、試験的に駆虫薬を投与し、駆虫の前後に採便し、その糞便内抗原の推移をみる。駆虫前後に糞便内抗原が陰転しない例については、偽陽性と判定する。

なお、確定診断のためのPCR実施まで時間を要することがあるので、ヒトへの感染リスクを未然に防ぐために虫卵排泄前に駆虫することが重要である。確定診断前であっても、糞便内抗原検査で陽性の場合にはできるだけすみやかに駆虫薬を投与する。

これまで犬の診断は環境動物フォーラムにおいて虫卵検査とプレートELISAによる糞便内抗原検査を併用して行われてきたが、2008年に犬用エキノコックス迅速診断キット「エキット(図3)」が発売(製造販売:わかもと製薬, 頒布:インビボサイエンス)され、動物病院内での迅速検査が可能となった。この「エキット」はプレートELISA(従来法)と同じく糞便内抗原を検出するキットであり、感染早期や少数感染における診断で従

来法と同等の信頼性をもつ。従来法と比べて偽陽性反応を示すことが若干観察されるが、陽性反応がでた場合の確認検査システムが整っており、判定の迅速性を考え合わせると、「エキット」は、スクリーニング検査キットとして、犬のエキノコックス感染検出が可能となり獣医師による届出実績に貢献している。これまで動物病院限定販売であったが、その後、国および地方公共団体、大学、研究機関、動物園でも使用できるようになった。

治療

駆虫薬ブラジクアンテルは、犬、猫、キツネなどの小腸に寄生する条虫、とくにエキノコックス成虫に対して有効で安全域も広く、副作用も報告されていない。とくに飼い犬の感染はヒトへの感染源として危険なので、完全に駆虫する必要がある。通常のブラジクアンテル投与量(5 mg/kg)で、ほぼ100%の駆虫効果があるが、より確実に駆虫するために倍量もしくは2回投与する。これらの駆虫薬は虫卵に対する殺滅効果はないので、虫卵が糞便中に含まれていることを想定して(駆虫しない場合は感染性の高い虫卵排出があり、より危険)、2~3日間は糞便の適正な処置(例:焼却、熱湯消毒、感染性廃棄物として業者に委託、また、室内の清掃およびシーツなどの洗濯、加熱・乾燥)が必要である。

予防

流行地における飼い主の家族および感染犬に密接に接したヒトについては、地域の保健所に相談し血清診断を受けることができる。感染経験のある犬、猫は以前と同様の野ネズミの捕食しやすい環境下で飼育され続けると、再感染する可能性が高いので注意を要する。

おわりに

1999年、青森のブタからエキノコックスの幼虫が発見された。それ以前から本州でも北海道と関係のない患者が報告されてはいたが、わが国でこの寄生虫の生活環が維持されるのは北海道だけというのが通説であった。その後、本州への侵入について、青函トンネルをキツネなどが通過するとか、北海道の産物によって感染源(虫卵)が移送されているなどのさまざまな風評があった。多数の犬が北海道から本州へ移動する(旅行者の同伴犬を含む)。北海道ではキツネのほぼ半数が感染し、飼育されている犬や猫からもエキノコックスが検出されている状況では、少数であるが感染犬が北海道から本州に持ち込まれていると考えられる。また、海外から多数の犬がエキノコックスの検疫なしで輸入されている。これらを

処方例

—ブラジクアンテル(各社)の投与は、①~④のいずれかを投与する。基本的には5 mg/kg(経口)で犬、猫、キツネなどのエキノコックス成虫に有効。ブラジクアンテルは安全域が広く確実な駆虫のために投与量は上記の2倍量を1回、または上記の量で2回とする。ただし虫卵殺滅効果はないので駆虫後の糞便処理に要注意(本文参照)。

- ①ブラジクアンテル [ドロンシット錠]
体重に応じて1回下記量を経口または飼料に混ぜて投与 [犬/猫]
5 kgまでの犬/猫:1/2錠、5~15 kgの犬:1錠、16 kg~30 kgの犬:2錠、30 kg以上の犬:3錠
- ②ブラジクアンテル(エモデブシド・ブラジクアンテル配合) [モナリート錠]
体重に応じて下記量を滴下 [猫7週齢以上]
0.5 kg以上2.5 kg未満:0.35 mL ビベット1個全量
2.5 kg以上5 kg未満:0.7 mL ビベット1個全量
5 kg以上8 kg未満:1.12 mL ビベット1個全量
8 kg以上:適切なビベットの組み合わせ
- ③ブラジクアンテル(エモデブシド・ブラジクアンテル配合) [プロフェンダー スポット錠]
体重に応じて下記量を滴下 [猫7週齢以上]
0.5 kg以上2.5 kg未満:0.35 mL ビベット1個全量
2.5 kg以上5 kg未満:0.7 mL ビベット1個全量
5 kg以上8 kg未満:1.12 mL ビベット1個全量
8 kg以上:適切なビベットの組み合わせ
- ④ブラジクアンテル(ミルベマイシン・ブラジクアンテル配合)
体重に応じて下記を食事と同時または食後に経口 [猫6週齢以上]
[小型・子猫用ミルベマックスフレーバー錠]
0.5 kg以上1 kg以下:1/2錠、1 kgを超え2 kg以下:1錠
[猫用ミルベマックスフレーバー錠] 2 kgを超え4 kg以下:1/2錠、4 kgを超え8 kg以下:1錠
* 効能効果として国内では猫回虫、猫鉤虫及び瓜実条虫の駆除と記されているが海外では多包条虫を含む。

放置すると、本州にもエキノコックスが定着し、患者発生リスクは増大する。これまでの調査では本州の野生動物間でエキノコックス生活環が維持されている事実は確認されていない。早急に感染レベルの高い北海道の感染源であるキツネ対策と海外からの感染犬侵入防止策を実施することで、エキノコックス症に対する危機管理は可能である。

また、感染源診断法が確立され、感染源動物を特定し、駆虫薬で防除することが可能となった。駆虫薬を入れた魚肉ソーセージをオホーツク海に面した地域でキツネを

対象に散布し、この診断方法を組み合わせた作業を行った結果、糞便内抗原は低減し、虫卵は検出されず、地域(200km²)のエキノコックス汚染環境が修復されている。2011年には北海道の2,000km²を超える地域でキツネから虫卵が検出されていない。スイス・チューリッヒ市内でも、この浄化法によって効果をあげている。イギリスなどは、エキノコックス症流行国からの犬の持ち込み前の駆虫を義務づけている。わが国でも犬の移動前の検査・駆虫が必要である。また、これらの関連技術は、今後、わが国に

侵入が危惧される森林型の狂犬病など、野生動物が関与する場合の動物由来感染症に対する危機管理へも応用できる。

2004年10月の感染症法改正で、世界に先駆けてエキノコックス症は感染源対策の一部である「感染犬の届出」が実現することになった。2005年1月には「第1号の届出」があり、法的裏づけを得てリスク管理が実施された。これらの情報・成果は、OIE(国際獣疫事務局)を通じて世界へ発信されている。

Review:

Viral Infectious Diseases in Wild Animals in Japan

Hiroshi Shimoda, Yumiko Nagao, Masayuki Shimojima, and Ken Maeda

Laboratory of Veterinary Microbiology, Faculty of Agriculture, Yamaguchi University

1677-1 Yoshida, Yamaguchi 753-8515, Japan

E-mail: kmaeda@yamaguchi-u.ac.jp

[Received July 19, 2011; accepted October 5, 2011]

Even limited to mammals, there exist more than 5,000 species of wild animals. Because each wild animal is the natural host of specific viruses, the total number of viruses in wild animals is enormous. Although it is impossible to cover all the infectious diseases caused by such viruses, accumulation of data on viral infectious diseases is important. In this paper, some of the latest findings acquired from our studies on viral infectious diseases in wild animals will be introduced.

Keywords: wild animal, viral infectious diseases

1. Introduction

The number of viruses which infect more than 5,000 species of wild mammals is enormous, as in the case of viruses in humans. Although humans are unlikely to be directly infected with the viruses which wild animals are infected with, there is a possibility that the viruses would be transmitted through other animals. However, we have little information on the viruses in wild animals. Table 1 shows the list of infectious diseases of wild animals designated by the World Organisation for Animal Health, OIE. The circled items in the list indicate infectious diseases caused by viruses.

Rabies virus should be first referred to in considering the viral infectious diseases in wild animals. In Europe, foxes, and in the US, raccoons, bats, foxes, coyotes, skunks, etc. are infected with rabies viruses, being the source of infection to domestic animals, companion animals and humans. Japan became one of the few countries which succeeded in exterminating rabies with the Rabies Prevention Act. The extermination was achieved owing to the fact that the animals infected with rabies viruses cannot easily intrude into Japan, because it is surrounded by sea, and that import of animals has been strictly regulated under the quarantine system. However, rabies is still prevalent in Southeast Asia and thus it is considered as one of the viral infectious diseases that might intrude into Japan in the future. Rabies is the most well-known viral infectious disease which wild animals are involved in, and preventive measures such as vaccination to wild animals have been already taken.

The important issue we have to address regarding viral infectious diseases in wild animals is emerging infectious

diseases. They are infectious diseases transmittable to humans which were discovered or which causes were identified after the 1970s. Many of such diseases are caused by viruses originating in wild animals, as a result of the process where the viruses which had been parasitic on wild animals found new host by chance, consequently triggering problems for humans. Such viruses as Ebola virus, Marburg virus, SARS coronavirus, Nipah virus and Hendra virus are considered as the parasite on bats. In examining the outbreak of such emerging infectious diseases, the knowledge on viruses in wild animals is indispensable.

The motto of "One World, One Health" in the Manhattan Declaration of 2004 stresses that the health of humans, companion animals and wild animals are closely linked and should be addressed at an international level. In this review paper, we will introduce our studies on viral infectious diseases in wild animals in Japan. We hope this paper would be instrumental in working out the measures against the possible outbreak of viral infectious diseases originating in wild animals.

2. Infection with Japanese Encephalitis Virus (JEV)

Japanese encephalitis virus (JEV) belonging to family *Flaviviridae*, genus *Flavivirus*, causes infectious diseases transmitted via arthropod. JEV can also be grouped under the Japanese encephalitis virus serocomplex, because it is closely related genetically and antigenically to the West Nile virus (WNV) and St. Louis encephalitis virus etc.. In the life cycle of JEV in Japan, mosquitoes play a central role as shown in Fig. 1. A mosquito sucks blood of a pig and is infected with JEV contained in the blood of the pig. The transmitted JEV multiply in the body of the mosquito. Then, when the mosquito sucks blood of another animal, JEV is transmitted to the animal. Accordingly, a mosquito is termed vector and a pig is termed amplifier. JEV does not trigger serious damages or diseases for pigs except for abortion, but in rare cases, if the mosquito infected with JEV sucks blood of a horse or a human, the horse or human sometimes suffers from encephalitis and even die. Horses or humans do not play a central role in the life cycle of JEV because, even if they are infected with JEV, the viruses seldom appear in the blood, and thus the mosquito sucking the blood of the horses or humans does

Table 1. OIE listed diseases affecting wild animals.

Anthrax African horse sickness ^o African swine fever ^o Aujeszky's disease ^o Avian chlamydiosis Avian infectious bronchitis ^o Avian infectious laryngotracheitis ^o Avian mycoplasmosis (<i>Mycoplasma gallisepticum</i>) Avian mycoplasmosis (<i>Mycoplasma synoviae</i>) Bluetongue ^o Bovine anaplasmosis Bovine babesiosis Bovine genital campylobacteriosis Bovine spongiform encephalopathy Bovine tuberculosis Bovine viral diarrhoea ^o Brucellosis due to <i>Brucella abortus</i> Brucellosis due to <i>Brucella melitensis</i> Brucellosis due to <i>Brucella suis</i> Caprine arthritis/encephalitis ^o Classical swine fever ^o Contagious agalactia Contagious bovine pleuropneumonia Contagious caprine pleuropneumonia Contagious equine metritis Crimean Congo haemorrhagic fever ^o Dourine Echinococcosis/hydatidosis Enzootic abortion of ewes (ovine chlamydiosis) Enzootic bovine leukosis ^o Epizootic haemorrhagic disease ^o Equine encephalomyelitis (Eastern) ^o Equine encephalomyelitis (Western) ^o Equine infectious anaemia ^o Equine influenza ^o Equine piroplasmiasis Equine rhinopneumonitis ^o Equine viral arteritis ^o Foot and mouth disease ^o Fowl cholera Fowl typhoid Glanders	Haemorrhagic septicaemia Heartwater Highly pathogenic avian influenza ^o Infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis ^o Infectious bursal disease (Gumboro disease) ^o Japanese encephalitis ^o Leishmaniasis Leptospirosis Lumpy skin disease ^o Maedi-visna ^o Marek's disease ^o Myxomatosis ^o Nairobi sheep disease ^o New world screwworm due to <i>Cochliomyia hominivorax</i> Newcastle disease ^o Nipah virus encephalitis ^o Old world screwworm due to <i>Chrysomya bezziana</i> Ovine epididymitis due to <i>Brucella ovis</i> Paratuberculosis Peste des petits ruminants ^o Porcine cysticercosis Porcine reproductive and respiratory syndrome ^o Pullorum disease Q fever Rabbit haemorrhagic disease ^o Rabies ^o Rift Valley fever ^o Rinderpest ^o Salmonellosis due to <i>S. abortusovis</i> Scrapie Sheep pox and goat pox ^o Surra (<i>Trypanosoma evansi</i>) Swine vesicular disease ^o Theileriosis Transmissible gastroenteritis ^o Trichinellosis Trichomonosis Trypanosomiasis (tsetse-transmitted) Tularemia Venezuelan equine encephalomyelitis ^o Vesicular stomatitis ^o West Nile fever ^o
---	---

not become infected with JEV. Such animals as horse and human are termed dead-end host.

The typical mosquito as the vector of JEV in Japan is *Culex tritaeniorhynchus* which breeds in rice paddies. The mosquito appears when the rice paddies begin to be filled with water, and then the prevalence of JEV becomes noticeable. The incidence of JE in humans and horses reaches a peak from August to September. From the 1940s to the 1950s in Japan, more than 5,000 human JE patients and more than 3,000 horses showing the symptoms were annually reported. However, by the effect of the vaccination program against JEV, the number of human patients has decreased to less than 10. And there has been no case of infection in horses in Japan since 2003, when two horses were infected with JEV in Tottori Prefecture.

Where does JEV exist after summer, during the period from winter to the beginning of spring? The following are possible answers: 1) in the bodies of wintering mosquitoes; 2) in the bodies of wild animals; and 3) brought from the continent in some way. Recently, Dr.

Morita et al. at Nagasaki University pointed out that the JEV isolated in Japan can be divided into two groups, namely, the viruses which are assumed to have intruded from China into Japan and those indigenous to Japan [1]. Moreover, Dr. Takasaki et al. at the National Institute of Infectious Diseases succeeded in isolation of JEV from the wild boar captured on 12 December, and in detection of the JEV gene from the wild boar captured at the beginning of May [2]. The fact that JEV was detected from the wild boars captured in December and May, when there had been no report of detection of JEV from pigs, indicates the possibility that wild boars are involved in wintering of JEV. It is now thought that some of the viruses prevalent in Japan may be held in the bodies of wild animals such as wild boars, and there is a high possibility that some others may be brought in from abroad.

What species of animals are infected with JEV besides pigs and wild boars? In Japan and China, JEV was isolated from bats. Furthermore, it has been pointed out that wild birds may also play a role as amplifiers. We conducted a survey on the prevalence of JEV antibodies in

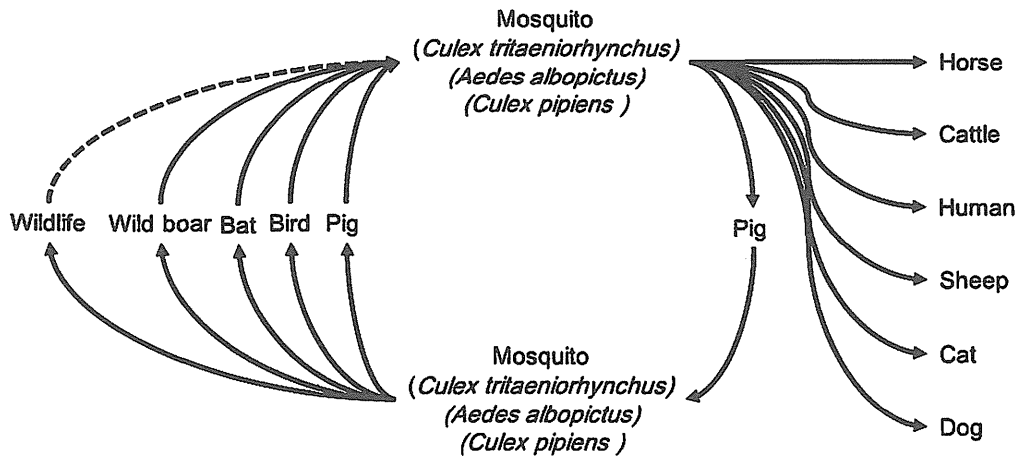


Fig. 1. Life cycle of JEV.

raccoons in the prefectures of Wakayama, Osaka, Hyogo and Hokkaido [3]. According to the findings, the antibody prevalence in western Japan was 41% to 69%, and 0% in Hokkaido, where almost JE patient had not been reported. In Wakayama Prefecture, 63% of the raccoon dogs had antibodies against JEV, while wild boars marked the antibody-prevalence of 83%, which was higher than raccoons and raccoon dogs. Moreover, as a result of surveys on the prevalence of JEV antibodies in various species of wild animals in Wakayama Prefecture, many wild animals including deer, foxes, weasels and badgers were antibody-positive, while the antibody-prevalence of bent-winged bats (*Miniopterus fuliginosus*) of one year or over inhabiting in Wakayama Prefecture was only 33%, which was lower than expected (manuscript in preparation). We also confirmed that the antibody prevalence of cats was low, while that of dogs was extremely high [4]. At the same time, we confirmed by experimental infection to dogs with JEV that dogs might not show any clinical symptoms [5]. Although in rare cases, JE has been reported to appear in animals other than horses and humans, such as cows and sheep; thus, there is a possibility that many wild animals are infected with JEV but only some of them show the symptoms. JE has the infectious cycle involving not only humans and domestic animals but also many wild animals. Wild animals may suffer from JE and die secretly, unknown to people. In particular, further surveys are needed on bats and wild boars which are regarded as amplifiers of JEV.

In Japan, because of widespread use of vaccines, the number of incidence of JE in humans and horses has decreased. However, in Korea, the annual number of patients increased to 26 in 2010, although the number had been less than 10 as with Japan. The sudden increase in the number of patients in Korea, which had been in a similar condition to Japan, means that we should continue to be attentive to JE as zoonosis. Although pigs have been exclusively focused in the discussions on host of JEV, attention must be also paid to wild boars which are close to pigs, because wild boars are more likely to appear in

residential area and near urban area. Lastly, since JEV is closely related with WNV, which is prevalent in non-Asian countries, it is difficult to distinguish the both. To prepare the intrusion of WNV into Japan, the survey on JE in wild animals and wild birds in Japan is significant.

3. Infection of Wild Boars with Aujeszky's Disease Virus (ADV)

Aujeszky's disease (AD) is an infectious disease caused by suid herpesvirus 1 belonging to family *Herpesviridae*, subfamily *Alphaherpesvirinae*, genus *Varicellovirus*. Aujeszky's disease virus (ADV) is latently infected in pigs as the natural host and triggers abortion in pregnant pigs and respiratory symptoms in new-born pigs, causing a major economic damage to pig farming. Accordingly, for the purpose of eradicating the AD, vaccines have been administered to prevent the outbreak of the disease, and ELISA to detect gE-antibody, which are induced in vaccinated pigs, has been used to detect and monitor the pigs infected with wild virus. As a result, many prefectures succeeded in eradicating the disease in Japan. It is expected that eradication of AD from pigs will be achieved all over Japan in the near future.

Another problem of AD is the high fatality rate in case animals other than pigs are infected with the virus. Although such infection seldom occurs, if cows, cats, dogs and so on, are infected with the virus, they suffer from neurological disorder including pruritus and almost 100% of them die. For this reason, AD disease is also termed pseudorabies, like rabies. In 1997, in Nara Prefecture, 24 hunting dogs which had eaten raw meat of wild boars died of AD [6]. It has been also confirmed that wild boars which are closely related with pigs can be the host of ADV.

The situation of infection of wild boars with ADV in Japan has been unclear so far. We conducted a survey on the situation of seroprevalence against ADV in the wild boars captured in three prefectures, where AD had

not appeared in pigs [7]. First, using a ten-fold diluted serum, which was not supposed to cause nonspecific reaction, a virus neutralization (VN) test was carried out by 80% plaque reduction test. As a result, the antibody-positive wild boars were found in two out of three prefectures surveyed. The antibody-positive rate of wild boars in each prefecture ranged from 4% to 6%. Next, those positive sera were further tested using ELISA to distinguish between infection with wild strains and vaccination. As a result, it was proven that all the positive reactions were caused not by vaccination but by infection with wild strains of ADV. In VN test, we adopted the screening method under strict conditions to raise the degree of peculiarity, in order to prevent a false positive reaction. Therefore, it is considered that more individuals are actually infected with ADV than in our findings.

Then, what kind of measures should be taken against infection of wild boars with ADV? ADV infects latently their natural host, a characteristic of herpesviruses. Thus, the antibody-positive wild boars in the above-mentioned survey may have been latently infected with ADV. Accordingly, we must keep in mind that several percent of wild boars retain ADV and they can become the source of infection to other animals including other wild boars. As a matter of course, we also must keep in mind the possibility of transmission of ADV from wild boars to pigs. Especially in the prefectures where vaccination has not been administered, attention must be paid to such possible transmission. Furthermore, raw meat of wild boars should not be given to animals including dogs as food.

4. Canine Distemper (CD) in Wild Animals

Canine distemper virus (CDV) belongs to order *Mononegavirales*, family *Paramyxoviridae*, subfamily *Paramyxovirinae*, genus *Morbillivirus*. Genus *Morbillivirus* includes Measles virus (MeV) causing measles in humans, and rinderpest virus (RPV) causing rinderpest in cattle. As for RPV, eradication was declared by OIE in 2011. This was a brilliant achievement following that of smallpox. The latest genetic analysis indicated that MeV diverted from RPV during the period between the 11th and 12th centuries [8]. In other words, MeV is the virus whose host range mutated from that of RPV. In my personal view, MeV, RPV and CDV are different only in the host range, but have similar strong pathogenicity.

What kind of animals are the hosts for CDV, while RPV infects cattle and water buffaloes, and MeV infects humans and monkeys? Various species of carnivora are infected with CDV, but especially canids including dogs can be the natural host of CDV. CDV has triggered fatal epidemics in many animals. As the most well-known example, about 1,000 lions out of about 3,000 inhabiting at the Serengeti National Park in Tanzania died of infection with CDV [9]. In addition, the number of island foxes inhabiting in California, USA decreased drastically to one tenth because of infection with CDV and this species of fox was designated as endangered species [10, 11]. In

2008, there was an epidemic of CDV in rhesus monkeys in China and moreover, more than 30 cynomolgus (crab-eating) monkeys imported from China were reported to have died of infection with CDV at an animal quarantine station in Japan [12, 13]. The host range of CDV may be expanding to primates.

In Japan, some cases of the CDV epidemic in wild animals have been reported. We will introduce three examples of such epidemic of CDV on which surveys have been conducted: 1) case in Tanabe City, Wakayama Prefecture [14]; 2) case in Kochi Prefecture [15, 16]; 3) case in Yamaguchi Prefecture [17].

1) Case in Tanabe City, Wakayama Prefecture

In around March, 2007, raccoon dogs in the area around Tenjinzaki Cape in Tanabe City, Wakayama Prefecture, were reported to have died of asthenia. As a result of examination, it was proven that those raccoon dogs had been infected with CDV [14]. We succeeded in isolation of CDV from seven raccoon dogs and one weasel in total. According to the results of comparison of the viruses, they were identified as the same origin. After the outbreak, we conducted a survey on the retention rate of CDV antibodies in wild animals in the area around Tanabe City, Wakayama Prefecture, and confirmed that about 50% of raccoons and about 20% of raccoon dogs were CDV-positive. Besides, CDV-positive animals were also found in badgers, a weasel and martens. Among carnivora inhabiting in this area, foxes were the only species that we did not find any CDV-positive one, although only one fox was tested. The surprising findings were that 26% of wild boars and 40% of sika deer were CDV-positive. Infection of wild boars with CDV was not the first case, because the infection of peccary similar to wild boars had been already reported in the US [17], but infection of deer was the first case reported, to our knowledge.

2) Case in Kochi Prefecture

In 2005, many raccoon dogs which were infected with CDV died at Katsurahama Beach in Kochi Prefecture, and thereafter, deaths of badgers and palm civets caused by infection with CDV were continuously reported in the area around Kochi City [15, 16]. We had the opportunity to isolate the viruses after 2008, and succeeded in isolation of KochiO1A strain from the affected palm civet, in determination of its complete genome sequence and also in the development of pathogenicity in dogs through experimental infection (Manuscript in preparation). The homology in the sequence of hemagglutinin genes between this virus and Onderstepoort strain used as vaccines was less than 90%. Afterward we continued the surveys on CDV in this area. In 2010, relatively many cases of infection were reported and thus the tendency of CDV epidemic was recognized again. It has been confirmed that the viruses prevalent in this area were similar to KochiO1A and kept spreading among wild animals in this area.

3) Case in Yamaguchi Prefecture

In Yamaguchi Prefecture, there was an epidemic of CDV in wild raccoon dogs beginning from the end of 2009 [19]. CDV was successfully isolated from those raccoon dogs. Then, in January, 2010, diarrhea, stomach-ache and coughing were recognized in 12 tigers kept at the zoo in the same area, and CDV genomes were detected from the diarrheal stools examined. Two of the tigers died of unknown reason, while many of the others recovered. However, in March, one tiger died of neurological disorder and CDV was isolated from the tiger. The result of comparison between the strains isolated from the raccoon dogs and from the tigers showed that the both viruses were closely related. These findings indicate that the CDV prevalent in wild animals including raccoon dogs were transmitted to the tigers kept at the zoo. Furthermore, as a result of examination on three lions kept at the zoo, one lion was found to be highly CDV-positive. In addition, after examining nine Asian black bears captured in Yamaguchi Prefecture, it was confirmed that one bear out of nine was CDV-positive.

The above findings suggest that, although the infection with CDV was previously thought to be limited to canids or felids belonging to *Carnivora*, the host range of CDV is now spreading to other animals.

Then, what kind of measures should be taken against CD which has been prevalent among wild animals? Based on our findings, vaccines are effective for dogs and vaccination might be also recommended to the other companion animals. However, as for such animals highly sensitive to CDV as ferrets, the safer method of vaccination should be considered. In addition, as for such rare species of animals as tigers in the CDV-infected area, vaccination is strongly recommended. And there might be a possibility that humans are also infected with CDV, because CDV has been already transmitted to non-human primates. Thus, it would be necessary for those who may have frequent contacts with wild animals to confirm whether or not they have been vaccinated against MeV. The vaccination against MeV is strongly recommended for those who have not been vaccinated against MeV nor infected with MeV, because the immune response to the MeV vaccine may be also effective to CDV. Moreover, based on the fact that CDV infects wild boars and deer, we can assume that CDV can also infect pigs and cattle. Therefore, prevention against invasion of wild animals into livestock farms is important, although it is also needed to prevent viruses other than CDV. Moreover, in protecting weakening wild animals, separation from other animals is necessary, because such wild animals are highly suspicious to have been infected with CDV. There is a report of possible transmission of CDV from a protected palm civet to a pet dog (manuscript in preparation).

5. Viruses Originated from Bats

As mentioned above, bats are the natural host of viruses causing emerging infectious diseases. In the case of Nipah virus, it is believed that virus transmitted from bats to pigs because pig farms were kept away from urban areas for various reasons and were obliged to relocate near the wood where bats originally inhabited. Nipah virus excreted from bats were transmitted to pigs and consequently spread from the infected pigs to humans. Meanwhile, in the case of Hendra virus, when bats were forced to leave their original habitats and moved near the stables for horses, the virus was transmitted from bats to horses, and consequently from the infected horses to humans. This was the result of the increased opportunities for humans, pets and livestock to have contacts with bats due to progressing deforestation etc., although there had been few opportunities for such contacts before. The viruses infected bats as the natural host had coexisted with bats quietly in forests before, however, since humans or other species of animals intruded into the area, some viruses caused emerging infectious diseases as new problems for humans. Thus, bats are not to blame as the cause. We should consider why so many viruses as the cause of the emerging infectious diseases originate in bats. Domestic or companion animals have had many opportunities to have contacts with humans in their long history of domestication process. Therefore, even if such domestic animals had viruses which could cause emerging infectious diseases, those viruses must have already been transmitted to humans in the long history, triggering some problems to humans. Contrarily, wild animals have had fewer opportunities to have contacts with humans and the viruses parasitic on the wild animals have also had fewer opportunities for transmission to humans. This is the reason why so many emerging infectious diseases originate in wild animals. In mammals, there exist more than 1,000 species of bats belonging to *Chiroptera*, which is the second largest number of species after *Rodentia*. If each species of bat is natural host of specific viruses, the total number of viruses should be enormous. A tiny part of them possesses infectious capacity to humans and appears as the viruses to cause emerging infectious diseases. More important point is that bats are regarded as relatively close to horses according to the genetic classification [20]. Thus, the viruses which can be transmitted to bats may be likely to be transmitted to horses. On the other hand, because rodents are considerably far from humans genetically, infection of humans and other animals with the viruses carried by rodents is thought to be difficult.

It has been made clear that the viruses carried by bats are likely to be the cause of emerging infectious diseases. Then, what kind of viruses do bats carry? We have had too little knowledge on bats; there has been almost no cultured cell to isolate the viruses originating in bats. We succeeded in the establishment of cultured cells from the following species of bats: *Rhinolophus ferrumequinum*, *Pteropus dasymallus yayeyamae*, and *Miniopterus fuliginosus*, and isolated some viruses in the process of estab-