

A群	公衆衛生の見地から確実に検査を実施する動物 ・咬傷事故を起こした野生動物であって捕獲された後に殺処分されたもの
B群	狂犬病の可能性を否定するために検査を実施する動物 ・地方公共団体の指定する保護施設等に救護された傷病野生動物のうち、保護期間中に死亡したもの又は予後不良等の理由により処分されたもの ・交通事故死したもの
C群	狂犬病でないことを確認するために検査を実施する動物 ・有害捕獲により捕獲された後に殺処分されたもの ・狩猟により捕獲されたもの

A群に該当する個体は、犬と同様に狂犬病を発症している可能性があるため、確実に狂犬病感染の有無を確認する必要がある。ただし、野生動物による咬傷事故は発生頻度が低いため、地域によっては検査対象が確保されないと予想される。また、日本産野生動物における狂犬病発症時の行動異常について、ほとんど知見がないことから、A群に該当する個体のみをモニタリング対象と設定すると感染個体を見逃しにつながるおそれがある。

一方で、C群に該当する個体は比較的容易に収集できることから、検査頭数を安定的に維持することが可能である。しかし、これらの個体の多くは健康であることが予想され、さらに野生動物個体群における狂犬病ウイルスの保有率が低いことから、仮に感染が広がっていてもモニタリング効率が悪く、また感染個体を見逃してしまうおそれがある。

このように考えると、現実的かつ実務的には、B群として示した救護個体および交通事故死個体がモニタリング対象としては適当である。狂犬病に罹患した個体では、行動異常を起こしやすい可能性があるため、人間に救護されることや交通事故に遭遇する機会が多いと予想されるからだ。

各自治体においては、検査体制や検査個体の回収システムの整備が進むまでは、モニタリング対象を広げることは

難しいかもしれない。野生動物を対象とするモニタリング調査は、当面、A群に該当する個体に限定されるだろう。しかし、病原体侵入モニタリングという目的を達成するには、B群及びC群に該当する動物の検査計画を立てておくことが望ましい。

一方で、日本産哺乳類は約150種（陸棲動物に限る）が確認されており、また地域的な分布の偏りもある。そこで、実施要領では、検査の対象となる野生動物種について、その生態や人との接触機会の多寡等を考慮して、下記のように、優先度の高い順に3つの種類に分類した。

第一優先種	アライグマ、タヌキ、アカギツネ、フイリマンゲース
第二優先種	アナグマ、ハクビシン、チョウセンイタチ、テン
第三優先種	コウモリ

これまで、世界的にも狂犬病の流行が報告されている動物種は、犬、オオカミ、キツネ、タヌキ、アライグマ、スカンク、マンゲース、コウモリなどに限られる。そこで、国内に生息する野生の食肉目と翼手目のうち、個体数密度が小さく狂犬病を蔓延させるおそれが無い絶滅危惧種を除く種を対象に、生息分布の拡大傾向、人間や家畜との接触機会、国外での狂犬病流行への関与について定性的な評価を行い、狂犬病モニタリング調査の優先度を判断した（表1）。

絶滅危惧種を除外した結果、食肉目では12種、翼手目では5種がリストされた。これらの種を対象に、前述の3つの評価基準ごとに3ランクに評価し、生息分布の拡大傾向および人間や家畜との接触機会のいずれかが高ランク（高または大）であり、なおかつ国外での狂犬病流行への関与も高ランクと評価された種を狂犬病調査の第一優先種と判断した。

同様に、生息分布の拡大傾向および人間や家畜との接触機会のいずれかが高ランクであり、なおかつ国外での狂犬病流行への関与が中ランクと評価された種を狂犬病調査の第二優先種と判断した。

現在、コウモリの狂犬病ウイルス（リッサウイルス血清型I）感染事例はアメリカ大陸でのみ報告されており、狂犬病調査の優先度は高いと評価される種が日本にも生息している。しかし、アジアに生息しているコウモリについて

表1 狂犬病の調査対象動物種の優先リスト（暫定版，ガイドラインより引用）

No.	種名	学名	英名	生息分布の 拡大傾向	人間や 家畜との 接触機会	国外での 狂犬病流行 への関与	狂犬病 調査の 優先度
■食肉目（ネコ目）CARNIVORA Carnivores							
クマ科 <i>Ursidae</i> (Bears)							
1	ヒグマ	<i>Ursus arctos</i>	Brown Bear	中	中	低	低
2	ツキノワグマ	<i>Ursus thibetanus</i>	Asiatic Black Bear	中	中	低	低
アライグマ科 <i>Procyonidae</i> (Raccoons)							
3	アライグマ	<i>Procyon lotor</i>	Common Raccoon	大	高	高	高
イヌ科 <i>Canidae</i> (Dogs and Foxes)							
4	タヌキ	<i>Nyctereutes procyonoides</i>	Raccoon Dog	大	高	高	高
5	アカギツネ	<i>Vulpes vulpes</i>	Red Fox	中	高	高	高
イタチ科 <i>Mustelidae</i> (Weasels)							
6	テン	<i>Martes melampus</i>	Japanese Marten	小	中	中	低
		<i>Martes zibellina</i>	Sable				
7	ニホンイタチ	<i>Mustela itatsi</i>	Japanese Weasel	小	低	中	低
8	チョウセンイタチ	<i>Mustela sibirica</i>	Siberian Weasel	大	高	中	中
9	アメリカミンク	<i>Mustela vison</i>	American mink	中	低	中	低
10	アナグマ	<i>Meles anakuma</i>	Japanese Badger	大	中	中	中
ジャコウネコ科 <i>Viverridae</i> (Civets)							
11	ハクビシン	<i>Paguma larvata</i>	Masked Palm Civet	大	高	中	中
12	ファイリマングース	<i>Herpestes auropunctatus</i>	Small Indian Mongoose	大	低	高	高
■翼手目（コウモリ目）CHIROPTERA Bats							
オオコウモリ科 <i>Pteropodidae</i> (Fruit Bats)							
1	クビワオオコウモリ	<i>Pteropus dasymallus</i>	Ryukyu Flying Fox	小	低	低	低
キクガシラコウモリ科 <i>Rhinolophidae</i> (Horseshoe Bats)							
2	キクガシラコウモリ	<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	Horseshoe Bat	中	低	中	低
ヒナコウモリ科 <i>Vespertilionidae</i> (Vespertilionid Bats)							
3	クロアカコウモリ	<i>Myotis formosus</i>	Hodgson's Mouse-eared Bat	小	低	高	低
4	アブラコウモリ	<i>Pipistrellus abramus</i>	Japanese pipistrelle	中	中	高	低
5	ウサギコウモリ	<i>Plecotus auritus</i>	Long-eared Bat	小	低	高	低

は狂犬病ウイルスが分離された報告はいまのところない。1999年から開始されている台湾の狂犬病調査でも、コウモリは全て陰性であり、日本のコウモリから狂犬病ウイルスが見つかる確率も低いと考えられる。ただし、これまでコウモリについては十分な調査が行われていないことも踏まえ、日本国内でも狂犬病の調査を行うことが望ましいとして、第三優先種としてコウモリを加えた。

野生動物を対象とした 狂犬病モニタリング調査の進め方

今後、各地域で野生動物を対象とした狂犬病モニタリング調査計画を立てるに当たっては、この分類を参考にしつつ、それぞれの地域の状況（野生動物の生息分布や密度等）に応じて、優先順位の変更や対象種の追加を行うことが望ましい。本項では、地域ごとにおける調査の進め方を解説

する。

1) 優先種の生息状況の把握

野生動物の生息状況は常に変化しているため、検査対象となる優先種の生息状況について、図鑑等の知見のみならず、最新の情報を得た上で調査計画を策定する必要がある。動物種によっては、生息分布図が公表されているものもあるが（参考資料、参照）、必ずしも最新のものと限らない。自治体によっては、環境部局の鳥獣担当部署で野生動物の生息状況調査等を実施し、現状を把握している。また、地域の大学や博物館等の試験研究機関、あるいは高校等の生物系クラブ、地元自然保護団体などでは、野生動物の情報を独自に収集している場合が多い。さらに、農政部局や市町村、農業関係団体等では、野生動物による農作物被害等の実態把握をしているので、被害場所のリアルタイムな変化から最新の分布動向を知ることができる。

とくに、検査対象種の分布が人の生活圏や家畜と重複すると予想される場合は、公衆衛生的な観点から優先的に検査する重要度が高まる。

2) 野生動物検体の確保

検査の優先順位が確定したら、対象種の検体を確保するネットワークづくりに着手する。詳細は次節で述べるが、地域によってはA～C群のそれぞれで情報の入手経路が大きく異なることがあるので、調査計画を策定するに先立ち、優先種ごとに情報提供者リストを作成しておくことが望ましい。

3) 検査個体の情報収集

検体の確保に協力いただける機関や個人（地域の自然観察者や開業獣医師等）に対し、検査個体の収容状況に関する情報収集も合わせて依頼しておくことが必要である。とくに、咬傷事例や救護個体などは生体で確保されることが予想されるので、収容時に個体の口腔周囲の状態や行動異常の有無等を観察することが望ましい。

収容場所が動物病院や動物園等の野生動物救護施設の場合、個体ごとのカルテを作成しているため、あらかじめ狂犬病特有の神経症状等を確認できるカルテへの記載事項を盛り込むよう、依頼する。野生動物用のカルテについては、『野生動物救護ハンドブック』（文永堂出版）等が参考にな

る。

また、個体の発見場所に関わる情報は、行動異常や周囲の環境との関連性を検証する上で重要となるため、発見（捕獲）地点を地図上に記録する必要がある。

検査個体を確保する方法

野生動物の捕獲や所持等の取扱いについては、「鳥獣の保護及び管理並びに狩猟の適正化に関する法律」（以下「鳥獣法」）および「特定外来生物による生態系等に係る被害の防止に関する法律」（以下「外来生物法」）により規制され、多くの自治体では環境部局により所管されており、また狂犬病担当部局による野生動物個体の確保は通常行われていない。

現状では、野生動物の個体を管理する体制は、自治体により多様であり、一般化することが困難である。したがって、実施要領で選定した検査優先種の個体を一定数以上確保する場合には、担当部局や、その他の関係機関と連携して検査個体を確保する仕組みを構築する必要がある。

このような背景を踏まえ、野生動物の狂犬病検査については、「鳥獣法」等関係法令を根拠に多様な目的で捕獲後に殺処分された個体、あるいは交通事故等で回収された個体等を活用することが現実的である。

ここでは、優先種に選定された野生動物のうち、前項で示したA～C群のそれぞれに該当する検査個体の確保に関する留意事項を解説する。

1) A群

これは、人の狂犬病発症予防等のため公衆衛生の見地から検査を行うべき事例で、検査対象となるのは咬傷事故を起こした野生動物で、捕獲・殺処分されたものである。ただし、野生動物による咬傷事故が発生しても、加害個体を確保することは極めて困難であることが想定されるため、事故の発生情報や加害個体に関する情報を収集するための関係機関との連携が必要である。

加害個体の捕獲にあたっては、原則として「鳥獣法」等の法令に基づく捕獲許可が必要である。また、特定外来生物（表1に示した種では、アライグマとファイリマンゲースが該当する、以下同様）の生体は許可なく移動させることはできない。加害個体の捕獲・殺処分については、関係部局との十分な調整が必要である。

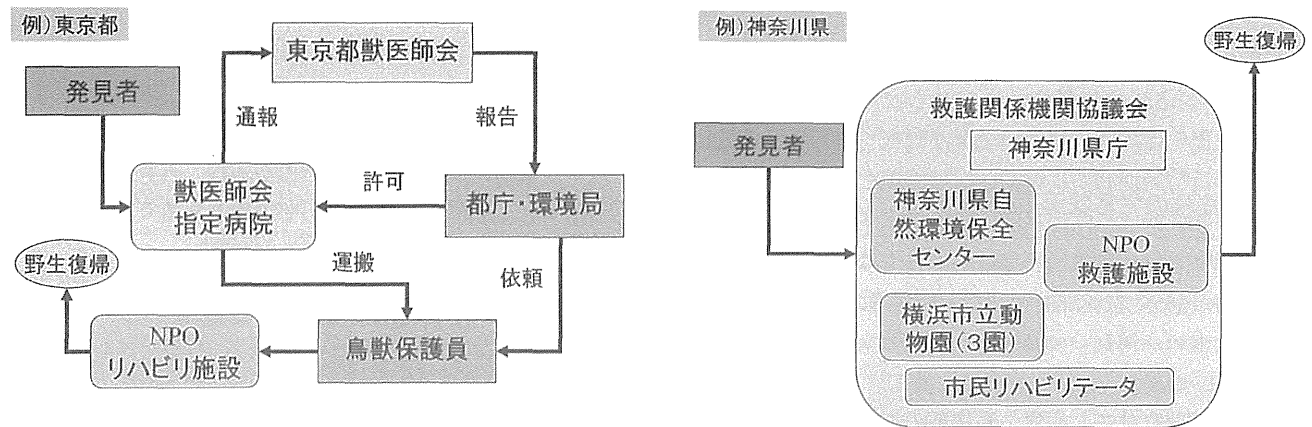


図1 自治体による野生動物救護体制の違い（東京都と神奈川県を比較）

2) B群

これは、狂犬病発生动向調査のために検査を行う事例で、衰弱、事故等の理由により動物病院や保護施設等に救護された野生動物のうち、保護期間中に死亡したものおよび予後不良等の理由により安楽殺処分された個体、あるいは交通事故死した野生動物のうち、道路管理者や自治体の清掃部局等により回収された個体が検査対象となる。

現在、「鳥獣法」に基づき、すべての都道府県が救護された野生動物の保護収容を定めている。ただし、自治体ごとに救護体制が異なるため（図1）、検査個体の確保体制を検討するには、それぞれで策定されている鳥獣保護事業計画（都道府県のホームページで公開、なお2015年度から法改正により鳥獣保護管理事業計画に名称変更）を確認する必要がある。また、救護個体の死体の確保にあたっては、鳥獣関係部局や救護事業の受託者（多くの場合、動物園、地方獣医師会、開業動物病院等）等関係者との十分な調整が必要である。

なお、最近、希少鳥獣以外の野生動物を救護施設で受け入れず、門前払いしている自治体が増えてきた。これは、苦痛を取り除くという医療の原点に反するばかりか、野生動物救護が環境のモニタリングの一環であることを理解していないと言える。これから共通感染症のモニタリングの意義はますます大きくなり、韓国では野生動物救護施設をネットワークさせた全国的なサーベランスシステムの構築

が検討されている。わが国でも今一度、野生動物救護の在り方を再考すべきだろう。

交通事故死個体は、通常、道路管理者や自治体の清掃部局等により回収や焼却等の処分がされており、死体の確保については、関係者との十分な調整が必要である。また、交通事故死個体については、事故個体の頭部の損傷度、事故発生から死体確保までの時間により、検査対象として適さない場合も想定される。死体の速やかな回収、保冷が重要であるが、事故個体発見時の通報内容により、死体（とくに脳）の損傷度を推測し、検査実施の可否を判断する必要がある。

3) C群

これは、狂犬病でないことの積極的確認のために検査を行う事例で、狩猟や有害捕獲により捕獲され、殺処分された野生動物の個体が対象となる。ただ、これらの個体は一般に健常であることが想定されるので、狂犬病ウイルスを保有している可能性は低いかもしれない。一方で、捕獲頭数が多い種では、標本数を多くすることで、狂犬病清浄化状態を積極的に示すデータが蓄積できると考えられる。

有害捕獲は、野生動物により農作物や住宅等に被害を受けた者が許可権者（おもに自治体）に申請をして「鳥獣法」等の捕獲許可を受けて実施される。捕獲後の処分方法は自治体ごとに決められているので、関係機関との十分な調整が必要である。また、特定外来生物の生体は許可なく移

動させることはできない。捕獲・殺処分された個体の確保については、環境部局との十分な調整が必要である。

一方、狩猟は、「鳥獣法」に定められた狩猟鳥獣（表1に示した優先種では、食肉目全種が該当する）を各都道府県が定める狩猟期間中に可猟区域で実施される。したがって、非可猟区域（鳥獣保護区、銃猟禁止区域等）に生息する野生動物の個体を確保することはできない。狩猟により捕獲された個体は、捕獲者の所有物となるため、検体提供の協力を求め、検査の実施について、所有者の意思を確認する必要がある。

なお、都道府県ごとの野生動物種の捕獲頭数（救護も含む）等は、環境省鳥獣関係統計として毎年集計され、ホームページ等で公開されている。

参考資料

- 1) 環境省：特定外来生物等一覧, <http://www.env.go.jp/nature/intro/1outline/list/index.html>
- 2) 環境省：鳥獣関係統計, <http://www.sizenken.biodic.go.jp/wildbird/flash/toukei/07toukei.html>
- 3) 環境省生物多様性センター：自然環境情報 GIS 提供システム, <http://www.biodic.go.jp/trialSystem/top.html>
- 4) 環境省生物多様性センター：日本の動物分布図集, <http://www.biodic.go.jp/kiso/atlas/>
- 5) 国立環境研究所：侵入生物データベース, <http://www.nies.go.jp/biodiversity/invasive/>
- 6) 厚生労働省：動物の狂犬病調査ガイドライン, <http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou10/dl/140826-01.pdf>
- 7) 野生動物救護ハンドブック編集委員会（1995）：野生動物救護ハンドブック～日本産野生動物の取り扱い, 文永堂出版。

解説

狂犬病とバイオセーフティ

井上 智

国立感染症研究所 獣医科学部

はじめに

狂犬病は、世界中で毎年 55,000 人以上が死亡しており、いったん狂犬病を発症すると、急性、進行性、致死性の脳炎を示して多くの場合 10 日以内に 100% 致死する動物由来感染症 (Zoonosis、人獣共通感染症) である。患者の 99% 以上は狂犬病を発症した犬による咬傷が原因であり、その 30-50% は 15 歳以下の子供である。しかしながら、国によっては特定の野生動物 (キツネ、タヌキ、アライグマ、スカンク、マングース、コウモリなど) で狂犬病が流行しており、いずれの狂犬病ウイルスもヒトを含む全ての哺乳類に感染可能なことを忘れておきたい。WHO は、東南アジアの 10 億人以上が狂犬病の暴露にさらされており、毎年の咬傷被害者が 1,900 万人、曝露後予防接種 (PEP: post-exposure prophylaxis) が 400 万人を超えていると推計している。アジアは世界有数の狂犬病流行地域で、毎年 24,000 人以上が死亡しており、中国、インド、インドネシア、フィリピン、ベトナム等の犬や韓国のタヌキで発生が拡大していることを考えるとわが国の狂犬病対策が気になるところである。^{1, 2)}

国内の狂犬病対策

日本では、1958 年以降に国内で感染した狂犬病は人でも動物でも報告がないが、海外で狂犬病の犬に咬まれた際に適切な曝露後のワクチン接種ができず帰国後に狂犬病を発症して死亡した 3 名の輸入狂犬病が報告されている (<http://idsc.nih.go.jp/iasr/28/325/tpc325-j.html>)。現在、狂犬病予防法 (1950 年、厚生労働省)、感染症法 (1998 年、厚生労働省)、家畜伝染病予防法 (1951 年、農林水産省) に基づいた狂犬病の予防対策が、医師・獣医師および犬の飼い主や動物の取扱業者等の協力を得ながら、国・地方自治体によって粛々と行われている。また、自治体では 2001 年に策定された『狂犬病対応ガイドライン 2001』に基づいて狂犬病発生の疑いがある場合の対応マニュアルを準備している。2013 年には『狂犬病対応ガイドライン 2013 ー日本

国内において狂犬病を発症した犬が認められた場合の危機管理対応一』が策定されて、狂犬病と確定された犬等の動物が認められた場合に事態を終息させるための危機管理マニュアルも各自治体で準備されつつある。また、台湾で 52 年ぶりに狂犬病が報告されたことを受けて、「我が国における動物の狂犬病モニタリング調査手法に係る緊急研究 (厚生労働科学特別研究)」が行われて、昨年度末に『動物の狂犬病調査ガイドライン』が報告された。³⁻⁷⁾

微生物学的な特性等

狂犬病は、ラブドウイルス科リッサウイルス属 (Rhabdoviridae family、Lyssavirus genus) に属するマイナス鎖の 1 本鎖 RNA 型ウイルスによる感染症であり、ウイルスは、「弾丸」様の形態をとる直径 75-80 nm、全長 180-200 nm の大きな RNA 型ウイルスである。成熟粒子は、ゲノム RNA と少なくとも 5 つのウイルス蛋白から構成されており、構造的にヌクレオカプシド (nucleocapsid) がエンベロープ (envelope) に覆われている。狂犬病ウイルスの感染は、ウイルス粒子表面にスパイクとして突出している G 蛋白に対する中和抗体によって阻止することができる。

狂犬病ウイルスのうち、患者や野外等から同定・分離された株 (街上毒) は取り扱いがバイオセーフティレベル 3 (BSL3) ではあるが、ワクチンや実験室で標準株として使用される低病原性の固定毒株 (CVS 株、ERA 株、Flury 株、Fuenzalida S-51 株、Fuenzalida S-91 株、Kelev 株、LEP 株、Nishigahara 株、Paris Pasteur 株、PM (Pilman-Moore) 株、PV 株、SAD (Street-Alabama-Dufferin) 株、Vnukovo-32 株) についてはバイオセーフティレベル 2 (BSL2) での取り扱いとされている。また、狂犬病ウイルスは、感染症法 (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) の感染症分類で 4 類感染症、病原体等の管理に関する規程で三種病原体に分類されている。なお、ワクチン株である HEP 株、RC-HL 株については人を発病させるおそれはほと

んどないものとして規制除外病原体等に指定されている。^{4, 8, 9)}

臨床検体の取り扱いと感染予防

狂犬病を発症したヒトや動物のすべての神経組織にウイルス抗原を見出すことができるが、中枢神経組織と唾液中に高濃度のウイルスが検出される。不慮の事故等による偶発的なウイルス接種、ウイルスが汚染した実験器具による創傷や突き刺し事故、狂犬病の動物による咬傷事故、ウイルスに感染した組織もしくはウイルスが含まれる溶液の粘膜組織や傷口への暴露が最も注意を払うべきウイルスの感染経路である。

狂犬病の疑われる臨床材料や動物検体の取り扱いはBSL2で行う。適切な接触・飛沫感染防止策、暴露部位の洗浄消毒等を行うことによって感染予防が可能である。狂犬病ウイルスや感染した動物の取り扱い、検査・診断、ワクチン製造およびウイルスの試験研究に携わる担当者は作業前に狂犬病のワクチン接種を行うことがWHOによって推奨されている。なお、ワクチンを事前接種した者が作業中にウイルスに暴露された場合には速やかなワクチンの追加接種によって発症予防を行う。¹⁰⁻¹⁵⁾

消毒・滅菌

狂犬病ウイルスは、エンベロープを持っており、石鹼水、エーテル、クロロフォルム、45-70%エタノール、ヨード剤、第4アンモニウム塩によって感染性を失わせることができる。感染症法では、三種病原体等の滅菌等および排水については「摂氏百二十一度以上で十五分以上若しくはこれと同等以上の効果を有する条件で高圧蒸気滅菌をする方法、有効塩素濃度0.01パーセント以上の次亜塩素酸ナトリウム水による一時間以上の浸漬をする方法又はこれらと同等以上の効果を有する方法で滅菌等をする」と記載している。^{3, 9, 10, 12, 16-18)}

おわりに

隣接する台湾では、1947年に発生した中国由来の犬による狂犬病を契機に対策を強化して1959年の人と1961年の動物での報告を最後に台湾島内から狂犬病を駆逐した。ところが、52年が過ぎてイタチアナグマに狂犬病の流行していることが明らかとなり、台湾政府は2013年7月17日に狂犬病の発生を国際獣疫事務局(OIE)に報告した。半世紀にわたって狂犬病の清浄性が維持されていると考えられてきた台湾でイタチアナグマに狂犬病が流行し

ていたことは驚くべき事実である。台湾で狂犬病を摘発できたのは1999年から始めた動物の狂犬病調査によるところが大きい(International Expert Meeting, Taiwan CDC, Taipei, Aug 30, 2013)。現在、日本にイタチアナグマは生息しておらず、感染症法によって輸入も禁止されている。

日本では、条例等に基づき、人に対して咬傷事故を起こした加害犬の検診を行い、その経過観察期間中に加害犬が死亡した場合には、必要に応じて検査が行われている。この対応は、その時々状況に応じて行われているものであり、これまでに一定の基準で、継続的な犬以外も含む動物に対する狂犬病調査は実施されていない。WHO(世界保健機関)は、「狂犬病のない国においても動物の狂犬病調査を実施するのに十分な体制を維持して、国内に存在する感受性の高い飼育動物及び野生動物種について狂犬病を疑う症例のある場合には、標準化された検査法によって陰性を報告すべきである。」としており狂犬病の調査体制を整備することを推奨している。わが国においても、先に策定された狂犬病対応ガイドライン等を活用して、狂犬病の発生がない状況下であっても狂犬病が疑われる動物を積極的に探知し、解剖と実験室内の検査によって狂犬病であるか否かを確認できる体制の構築が期待される。

参考文献

- 1) WHO Expert Consultation on Rabies: First report. 2004. *WHO Technical Report Series 931*.
- 2) WHO Expert Consultation on Rabies: Second report. 2013. *WHO Technical Report Series 982*.
- 3) 厚生労働省 狂犬病 (<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekaku-kansenshou1/>)
◇狂犬病予防法
◇狂犬病対応ガイドライン 2001
◇狂犬病対応ガイドライン 2013
◇狂犬病に関する Q & A
- 4) 厚生労働省 感染症お予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律 (<http://law.e-gov.go.jp/htmldata/H10/H10HO114.html>)
- 5) 厚生労働省 動物の輸入届出制度について (<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekaku-kansenshou12/>)
- 6) 農林水産省 犬等の輸出入検疫規則 (<http://www.maff.go.jp/aqs/hou/52.html#kisoku>)
- 7) 農林水産省 家畜伝染病予防法の解説 (<http://www.maff.go.jp/aqs/hou/36.html>)
- 8) A.C. Rabies. 2nd edition, Academic Press, Elsevier, London, UK, 2007
- 9) 厚生労働省 感染症法に基づく特定病原体等の管理規制について (<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/>)

- kekaku-kansenshou17/03.html)
- 10) Laboratory techniques in rabies. 4th edition, WHO, Geneva, 1996
 - 11) Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL), U.S.Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health, Fifth Edition 2007, U.S.Government Printing Office Washington: 2007 [<http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl5/index.htm>]
 - 12) バイオセーフティの辞典 (病原微生物とハザード対策の実際). みみずく舎発行・医学評論社発売, 2008年
 - 13) CDC, Human rabies prevention - United States, 1999, Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), MMWR, 1999, 48:No. RR-1
 - 14) ウイルス感染症の検査・診断スタンダード. 5. 狂犬病. 羊土社発行. 2011年
 - 15) 感染症予防必携 (第2版). 狂犬病. 日本公衆衛生協会発行. 2005年
 - 16) White L.A. and Chappell W.A. 1982. J.Clin.Microbiol. 16, 253-256.
 - 17) Turner G.S. and Kaplan C. 1967. J.Gen.Virol. 1,537-551.
 - 18) Kaplan M.N., Wiktoy T. and Koprowski H. 1966. Bull.Wld.Hlth.Org. 34,293-297.

狂犬病の予防と対策



国立感染症研究所獣医科学部室長 井上 智

「動物由来感染症」は、現在も知られていない新しい感染症が次々と見つかるなどしている。ダニ媒介性の「重症熱性血小板減少症候群」などは記憶に新しい。本シリーズでは、動物由来感染症に関する知識の普及や普及啓発を図るため、疾病別に各専門家に解説いただく。

はじめに

狂犬病(rabies)は世界中で発生しており、毎年5万人以上が死亡しています(厚生労働省ホームページ <http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekaku-kansenshou10/pdf/03.pdf> 参照)。アジアでは、狂犬病ウイルスに10億人以上が暴露していると推定され、毎年2万1000〜2万4000人が狂犬病で死亡しています。狂犬病で死亡するヒトの

99%は狂犬病を発症したイヌが原因です。海外渡航者への啓発と公衆衛生視点での予防対策が大切です。

疫学

狂犬病ウイルスはヒトを含むすべての哺乳類に感染することが知られていますが、流行を媒介する動物種は限られています。アジア、アフリカでは依然としてイヌが重要な流行・媒介動物ですが、欧米では野生動物(北米: アライグマ、スカンク、コウモリ、東欧: キツネやタヌキ。中南米: 吸血コウモリ等)に狂犬病が流行しています(<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekaku-kansenshou10/pdf/index-map.pdf>参照)。

ヒトが狂犬病の野生動物と遭遇

して狂犬病に感染する機会はきわめてまれですが、狂犬病発生地で素生の明らかでない動物と接触することは避けるべきです。アメリカ大陸ではコウモリに狂犬病が流行しており、毎年、数名がコウモリの狂犬病で死亡しています。

わが国はイヌの狂犬病対策を徹底して、1956年のヒトとイヌ、57年のネコを最後に、狂犬病の撲滅に成功しましたが、これまでネパールから帰国した学生1名(70年)とフィリピンから帰国した男性2名(2006年)が輸入狂犬病で亡くなっています。

予防

狂犬病は、一度発症すると有効な治療法はなく、ほぼ100%が死亡します。ヒトは狂犬病の動物にかまれたり傷口や粘膜面をなめられたりして感染し、通常1〜3か月の潜伏期を経て、発症すると急性、進行性、致死性の脳炎を併発して死亡します。

感染が疑われた場合には、ただちに暴露後の狂犬病ワクチン接種(P E P: post-exposure prophylaxis)

を受けることが死を免れる唯一の方法です。なお、国内で行う暴露後の狂犬病ワクチン接種は健康保険適用です。

啓発

市民の啓発は、最も効果的な予防対策です。狂犬病がヒトも感染する重篤な感染症であることの説明、狂犬病発生地域での動物との接し方や、万が一のときに医療機関を必ず受診するといった啓発が大切です(「狂犬病に関するQ&Aについて」<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekaku-kansenshou10/07.html>参照)。

発生動向の把握 (保健所への届け出)

現在、感染症法に基づき、4類感染症として、患者を狂犬病と診断した医師には全数届出が義務づけられています(<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekaku-kansenshou10/01-04-11.html>参照)。

獣医師が狂犬病予防法に基づいて、狂犬病にかかった、もしくは疑いのあるイヌ等を診断・死体を

検案した場合には、ただちに、その所在地を管轄する保健所長にその旨を届け出なければなりません（<http://law.e-gov.go.jp/htmldata/S25/S25HO247.html>参照）。

検査方法

狂犬病ウイルスは、神経上行性に脳に到達して発症の数日前から唾液中に排出されますが、感染してから発症するまでの数か月（潜伏感染期・通常1〜3か月）ウイルスを検出することができません。また、血液中に抗体も産生されません。

動物では、解剖によって取り出した脳組織を利用して検査を行います。ヒトでは、患者の唾液や髄液、うなじの毛根部皮下織を生検して、ウイルス遺伝子検出（PCR法）、ウイルス抗原検出、ウイルス分離が行われます（<http://idsc.nih.go.jp/iasr/28/325/dj3257.html>参照）。

国の対策

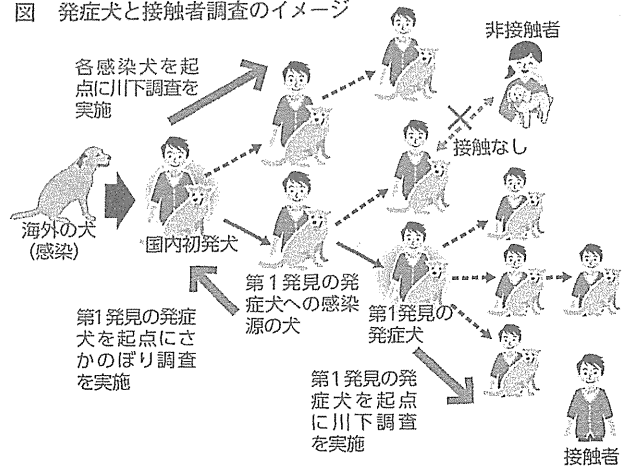
狂犬病が発生した場合に備えて2001年に『狂犬病対応ガイド

ライン2001』が策定され、各自治体は狂犬病発生の疑いがある場合の対応マニュアルを作成しています。また、平成13年には『狂犬病対応ガイドライン2013—日本国内において狂犬病を発症した犬が認められた場合の危機管理対応—』が策定され、狂犬病と確定されたイヌが認められた場合の事態終息マニュアルも各自治体で準備が進んでいます（<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou18/pdf/guideline2013.pdf>参照）。

狂犬病予防法に基づいて市町村では所有者から届け出のあったイヌの登録、所有者への鑑札交付、予防注射を受けたイヌの注射済票交付が行われています。これは、国内で狂犬病が発生した場合に、狂犬病に感受性の高いイヌの頭数と所在地を把握して、感染源となつたイヌ等からの感染拡大を阻止するために必要なデータベースとなります。

また、狂犬病等の動物由来感染症では、感染源となる動物の対策に並行してヒトの対策を進めなければなりません（図）。

図 発症犬と接触者調査のイメージ



おわりに

欧米では、検疫をすり抜けて持ち込まれたり海外旅行に同行したイヌで狂犬病がたびたび摘発されています。これは、狂犬病の疑われる動物を獣医師が関係機関に報告して実験室内で確定診断を行う体制が整備されていることにより

ます。台湾で、2013年7月に在来の野生動物（イタチアナグマ）に狂犬病が流行していることが報告され

ましたが、これも、1999年から行われている動物の狂犬病調査による成果です。平常時から、『動物の狂犬病を監視・摘発することのできる狂犬病調査』が行われていることの重要性に改めて気づくところ です。

公衆衛生における動物由来感染症の対策は、感染源対策によってヒトの健康危害を防止することが目的です。わが国で、狂犬病が疑われた場合も、ヒトの対策に並行して、動物の狂犬病調査等が行われ、ヒトで狂犬病が発生すること

参考文献等

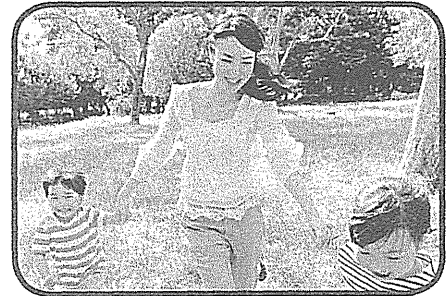
- ・感染症予防必携、第2版。日本公衆衛生協会、2005年。
- ・ウイルス感染症の検査・診断スタンダード。羊土社、2011年。
- ・狂犬病ガイドライン2001（<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou18/pdf/05-01.pdf>）。
- ・狂犬病ガイドライン2013（<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou18/pdf/guideline2013.pdf>）。
- ・狂犬病検査マニュアル、第2版（http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/rabies_%2020120608.pdf）。
- ・専門家啓発用DVD。狂犬病（男児症例の記録、学術映像：昭和25年（1950年））。平成19年度厚生労働科学研究費補助金 新興・再興感染症研究事業「動物由来感染症の生態学的アプローチによるリスク評価等に関する研究」（狂犬病のサーベイランス及び診断に関するワーキンググループ）。第2版、2009年11月。
- ・厚生労働省：狂犬病（<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou10/>）。
- ・狂犬病2006年現在（IASR）（<http://idsc.nih.go.jp/iasr/28/325/tpc325-j.html>）。

01 巻頭言

垣添忠生／公益財団法人日本対がん協会 会長

03 特集 時々刻々

周産・子育て期における 母子保健の課題と展望



11 保健所活動最前線②

地域医療連携・地域医療再生における 保健所関与の充実に関する研究事業からの報告

石丸泰隆／山口県萩健康福祉センター所長

14 期待の若手シリーズ 私にも言わせて！②

公衆衛生医を選択した自分を振り返って

服部希世子／熊本県健康福祉部健康危機管理課 主幹

16 【新連載】みんなでつくるソーシャル・キャピタル①

住民との協働による生活習慣病予防

秋好満重／大分県玖珠町福祉保健課健康対策係

18 【新シリーズ】渡航医学①

渡航前相談における感染症のリスク評価

加藤康幸／国立国際医療研究センター 国際感染症対策室医長

20 「WHO世界自殺レポート会議および関連行事」開催報告 第3回

関連行事③ シンポジウム

竹島正、小高真美、山内貴史

(独) 国立精神・神経医療研究センター 精神保健研究所 自殺予防総合対策センター

24 【新連載】過去の事例から学ぶ健康危機管理事例①

「白菜浅漬による腸管出血性大腸菌O157食中毒事例」

矢野公一／札幌市保健所長(現 札幌市手稲区保健福祉部長)

32 【新シリーズ】動物由来感染症①

狂犬病の予防と対策

井上智／国立感染症研究所獣医科学部室長

37 市町村活動自画自賛③

「人とのつながりが入浴事故予防につながる」

高橋友子／山形県庄内保健所保健企画課 栄養士

公衆衛生 TOPICS.....	27
全国保健師長会だより.....	34
次号予告.....	36

公衆衛生情報

特集
時々刻々

周産・子育て期における 母子保健の課題と展望

新連載・新シリーズ

みんなで作るソーシャル・キャピタル

渡航医学

過去の事例から学ぶ健康危機管理事例

動物由来感染症

日本公衆衛生協会

Vol.44 / No.1 2014

4



First detection of *Echinococcus multilocularis* infection in two species of nonhuman primates raised in a zoo: A fatal case in *Cercopithecus diana* and a strongly suspected case of spontaneous recovery in *Macaca nigra*



Kimiaki Yamano ^{a,*}, Hirokazu Kouguchi ^a, Kohji Uraguchi ^a, Takeshi Mukai ^b, Chikako Shibata ^b, Hideaki Yamamoto ^b, Noboru Takaesu ^b, Masaki Ito ^b, Yoshinori Makino ^c, Mitsuyoshi Takiguchi ^d, Kinpei Yagi ^a

^a Department of Infectious Diseases, Hokkaido Institute of Public Health, North 19, West 12, Kitaku, Sapporo 060-0819, Hokkaido, Japan

^b Sapporo Maruyama Zoo, Miyagaoka 3-1, Chuoku, Sapporo 064-0959, Hokkaido, Japan

^c Hamamatsu Zoological Gardens, Kanzanjicho 199, Nishiku, Hamamatsu 431-1209, Shizuoka, Japan

^d Laboratory of Veterinary Internal Medicine, Department of Veterinary Clinical Sciences, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, North 18, West 9, Kitaku, Sapporo 060-0818, Hokkaido, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 May 2013

Received in revised form 31 March 2014

Accepted 17 April 2014

Available online 26 April 2014

Keywords:

Cercopithecus diana

Macaca nigra

Echinococcus multilocularis

Spontaneous recovery

Zoo

ABSTRACT

The causative parasite of alveolar echinococcosis, *Echinococcus multilocularis*, maintains its life cycle between red foxes (*Vulpes vulpes*, the definitive hosts) and voles (the intermediate hosts) in Hokkaido, Japan. Primates, including humans, and some other mammal species can be infected by the accidental ingestion of eggs in the feces of red foxes. In August 2011, a 6-year-old zoo-raised female Diana monkey (*Cercopithecus diana*) died from alveolar echinococcosis. *E. multilocularis* infection was confirmed by histopathological examination and detection of the *E. multilocularis* DNA by polymerase chain reaction (PCR). A field survey in the zoo showed that fox intrusion was common, and serodiagnosis of various nonhuman primates using western blotting detected a case of a 14-year-old female Celebes crested macaque (*Macaca nigra*) that was weakly positive for *E. multilocularis*. Computed tomography revealed only one small calcified lesion (approximately 8 mm) in the macaque's liver, and both western blotting and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) showed a gradual decline of antibody titer. These findings strongly suggest that the animal had recovered spontaneously. Until this study, spontaneous recovery from *E. multilocularis* infection in a nonhuman primate had never been reported.

© 2014 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The genus *Echinococcus* includes two species of tapeworms that cause echinococcosis: *Echinococcus multilocularis* and *E. granulosus*. While the former, which is limited to the Northern Hemisphere, causes alveolar echinococcosis, the latter, which is distributed worldwide, causes cystic echinococcosis [1]. Both cause serious zoonotic disease. Alveolar echinococcosis is endemic in Hokkaido, Japan, and *E. multilocularis* maintains its life cycle between canines (definitive hosts: red foxes and sporadically dogs) and voles (intermediate hosts) [2]. Humans and some other primates can become intermediate hosts by the accidental ingestion of eggs excreted in canine feces [3–9]. Larvae form tumor-like tissue mainly in the liver [10,11].

Since 2004, Japanese veterinarians are required to report the case of a dog infected with *E. multilocularis* in accordance with the “Law Concerning Prevention of Infectious Diseases and Medical Care for Patients of Infections”. As a result, concern has surfaced over the risk

of *E. multilocularis* transmission from domestic dogs to humans. As 12 cases of *E. multilocularis* infection in dogs were reported in the period 2004–2013 (data reported by the Hokkaido Echinococcosis Conference, Hokkaido Government), it is important to pay attention to the risk of infection from domestic dogs to their owners. Even animals under well-managed conditions can spread an infection, because the degree of the contact is high among domestic animals and owners.

Here we report two cases of *E. multilocularis* infection in nonhuman primate species in captivity in Hokkaido, Japan. In 2011, a female Diana monkey (*Cercopithecus diana*) raised in a zoo died from alveolar echinococcosis (Case 1). This case led us to conduct a field survey in the zoo and serodiagnosis for other primates. Consequently, it was strongly suspected that a female Celebes crested macaque (*Macaca nigra*) had been infected with *E. multilocularis* (Case 2). Infection with members of the genus *Echinococcus* has been previously reported in some primates [5–9], but this is the first report of a confirmed *E. multilocularis* infection in these two species. Most of previously reported cases were of fatal ones similar to the Case 1 in this report. However, the characteristics of the Case 2 strongly suggest that spontaneous recovery could occur.

* Corresponding author. Tel.: +81 11 747 2769; fax: +81 11 736 9476.
E-mail address: yamano@iph.pref.hokkaido.jp (K. Yamano).

2. Materials and methods

2.1. Animals and blood samples

This study included two female nonhuman primates with *E. multilocularis* infection: a 6-year-old (at the time of death) female Diana monkey (*C. diana*, Case 1) and a 14-year-old female Celebes crested macaque (*M. nigra*, Case 2). Both of them were born and raised in the Sapporo Maruyama Zoo (Maruyama Zoo) in Hokkaido, Japan. The female Diana monkey was loaned to Hamamatsu Zoological Gardens (Hamamatsu Zoo) in Shizuoka, Japan for breeding purposes in June 2011 and died there in August 2011. No characteristic symptoms were recognized during the animal's lifetime. On the other hand, the Celebes crested macaque survived and had been subjected to blood sampling for serological examination at the Maruyama Zoo in December 2011, January 2012 and September 2012.

All other primate species kept in the Maruyama Zoo were also serologically screened for *E. multilocularis* infection: *C. diana* ($n = 7$, excluding Case 1), *M. nigra* ($n = 2$, including Case 2), *Cercopithecus neglectus* ($n = 1$), *Papio anubis* ($n = 3$), *Macaca silenus* ($n = 4$), *Mandrillus sphinx* ($n = 2$), *Hylobates moloch* ($n = 2$), *Hylobates lar* ($n = 1$), *Cebus paella* ($n = 3$), *Lemur catta* ($n = 2$), *Varecia variegata* ($n = 2$), *Pan troglodytes* ($n = 4$), and *Macaca fuscata* ($n = 9$). All blood samples were collected for serodiagnosis under anesthesia.

2.2. Autopsy of Case 1

As there were no characteristic symptoms during the lifetime in Case 1, the cause of death had to be confirmed by autopsy, histopathology, and detection of the DNA of pathogen. Some of the lesions collected during the autopsy were fixed in neutral-buffered formalin, embedded in paraffin, cut and stained with hematoxylin and eosin (HE).

2.3. Detection of the *E. multilocularis* DNA in Case 1

Three separate pieces of the cyst tissue were cut out and approximately 50 mg each from three pieces was used for genomic DNA extraction. Genomic DNA was isolated from the cyst tissue using the QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Gaithersburg, MD) according to the manufacturer's instructions. The *E. multilocularis* DNA was detected by polymerase chain reaction (PCR) using two specific primer sets targeting the 12S rRNA gene (5'-TTA AGA TAT ATG TGG TAC AGG ATT AGA TAC CC-3' and 5'-AAC CGA GGG TGA CGG GCG GTG TGT ACC-3') [12] and the U1 snRNA gene (5'-GTG AGG CGA TGT GTG GTG ATG GAG A-3' and 5'-GAA GGC AAG TGG TCA GGG GCA GTA G-3') [13]. PCR was performed with 60 ng of genomic DNA in a total volume of 25 μ L using the Gene Amp® PCR system 9700 (Applied Biosystems, Branchburg, NJ). Amplification of the 12S rRNA gene was performed under the following thermal cycling conditions: 12 min at 95 °C followed by 45 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 58 °C and 30 s at 72 °C, and a final extension of 7 min at 72 °C. After PCR amplification, 8 U of *Ssp* I (TaKaRa Bio, Otsu, Shiga, Japan) was added, and the amplified DNA fragments were digested for 1 h at 37 °C in a total volume of 10 μ L. Amplification of the U1 snRNA gene was performed under the following thermal cycling conditions: 12 min at 95 °C followed by 45 cycles of 60 s at 94 °C, 60 s at 62 °C and 60 s at 72 °C, and a final extension for 7 min at 72 °C. The PCR products were electrophoresed on a 2% agarose gel. The separated PCR products were visualized by staining with ethidium bromide.

2.4. Western blotting of Case 2 and other nonhuman primates

Crude antigen used for western blotting was extracted from *E. multilocularis* protoscoleces as previously described [14,15]. Serodiagnoses for monkeys were performed using the diagnostic methods for humans, with some modifications [16].

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed using an *E. multilocularis* crude antigen preparation according to the Laemmli method [17]. Crude antigen (about 0.5 μ g per gel) was electrophoretically separated on 15% SDS-PAGE and was electroblotted onto a nitrocellulose membrane. The membrane was subsequently blocked in 5% skimmed milk in PBS for 1 h at room temperature and then incubated with the primate sera (1:100 in PBS containing 0.05% Tween 20 and 5% skimmed milk) for 1.5 h at room temperature. After washing, the membrane was treated with anti-monkey IgG alkaline phosphatase-conjugated antibody (A-1929; Sigma, St Louis, MO) diluted at 1:2500 in 0.05% Tween-PBS for 1 h at room temperature. After further washing, the membrane was exposed to phosphatase substrate solution (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate/nitroblue tetrazolium; PerkinElmer Life Sciences, Gaithersburg, MD) for color development.

In this study, we adopted multiple diagnostic markers including 26–28-, 18-, and 7–8-kDa bands [14,18–23]. The diagnostic criteria were as follows: typical positive (26–28-, 18- and 7–8-kDa); atypical positive (26–28- and 7–8-kDa); and quasi-positive (26–28-kDa only) [14].

2.5. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for Case 2

Flat-bottomed microplates (No. 2580; Corning, NY) were coated with the crude antigen (12 μ g per mL; 100 μ L per well) for 4 h at 37 °C. After non-bound components had been discarded, the surface of each well was blocked for 1 h at 37 °C with 5% skimmed milk in PBS. Serum samples from Case 2 diluted 1:250 in 0.05% Tween-PBS (100 μ L per well) were then added to the microplate wells and incubated overnight at 4 °C. After washing with 0.05% Tween-PBS, 100 μ L of anti-monkey IgG alkaline phosphatase-conjugated antibody (A-1929; Sigma; 1:1000 in 0.05% Tween-PBS) was added and the microplates were incubated for 4 h at 37 °C. After further washing, bound antibody was detected by the presence of a reaction for alkaline phosphatase on *p*-nitrophenyl phosphate (0.1 mg per well) in 10% diethanolamine buffer (pH 9.8) following an incubation period of 8 min at 37 °C (100 μ L per well). The reaction was stopped with the addition of 50 μ L 3 N NaOH, and the absorbance was read at 405 nm with a microplate reader (iMark; BIORAD, Hercules, CA).

2.6. Computed tomography of Case 2

In January 2012, computed tomography (CT) images were taken using a multi-detector row helical CT scanner (Activion 16 TSX-031A; Toshiba Medical Systems Co., Tochigi, Japan). Acquisition parameters were 2.0-mm slice thickness with a 1.0-mm slice interval, 120 kV, and 150 mA.

2.7. Field survey

The Maruyama Zoo does not keep red foxes. To identify the carrier of *E. multilocularis* in the Maruyama Zoo, we investigated wild red fox intrusion into the zoo premises. Searches for fox trails on the snow were conducted at the zoo six times between December 2011 and April 2012. Eight camera traps were also set in the zoo premises, which recorded the frequency of fox sightings from January to June, 2012. Furthermore, we identified fox feces by shape, color, and size when we found animal feces outside of the cages during routine zoo work.

3. Results

3.1. Confirmation of alveolar echinococcosis in the Diana monkey (Case 1)

Case 1: In the post-mortem dissection, many tumor-like lesions were identified in the liver and neighboring organs (Fig. 1). Histopathological



Fig. 1. Alveolar echinococcosis of the Diana monkey (*Cercopithecus diana*; Case 1).

examination revealed multiple cysts and laminated layers characteristic of the genus *Echinococcus* (Fig. 2a). Protoscolices with hooks were also detected (Fig. 2b).

As shown in Fig. 3, target DNA was detected by PCR amplification of a 373-bp product of the 12S rRNA gene in all samples from several parts of the same cyst (lanes 1 and 2) and a control sample prepared from adult *E. multilocularis* (Hokkaido isolate). The amplified DNA fragments digested by *Ssp I* produced two bands (approximately 175 bp and 106 bp; lanes 4 and 5). This result was consistent with the specific banding pattern derived from the *E. multilocularis* 12S rRNA gene [24]. In addition, target DNA was detected by PCR amplification of a 337-bp product of the U1 snRNA gene in all samples (lanes 7 and 8). From these results, it was concluded that the cyst was of *E. multilocularis*.

3.2. Serodiagnosis for other nonhuman primates

A total of 42 sera were collected from other nonhuman primates ($n = 42$) in the Maruyama Zoo. All nonhuman primates, except Case 2, were negative for *E. multilocularis* infection by western blotting.

Case 2: The first western blotting test of Case 2 in December 2011 identified 26–28-, 7–8-, and 12-kDa bands (Fig. 4, lane 1). Therefore, Case 2 was diagnosed as positive (atypical pattern). No characteristic symptoms were observed at that time. During the follow-up process, the antibody response gradually weakened (Fig. 4, lanes 1–3). At the third examination conducted in September 2012, the 26–28- and 7–8-kDa bands had almost disappeared (Fig. 4, lane 3). Accordingly, the ELISA absorbance value showed a corresponding decrease (Fig. 5). The dotted line in Fig. 5 shows the provisional cut-off value (0.21) as a reference, which was determined in the previous study on the outbreak in *Macaca fuscata* in 1998 [16].

3.3. Computed tomography of Case 2

Fig. 6 shows a transverse CT image of Case 2. Only one small calcified lesion (approximately 8 mm) was detected in the liver.

3.4. Field survey

Despite the fact that the Maruyama Zoo is enclosed with 2.5 m-high chain-link fencing, many fox intrusion routes were found within the zoo in the field survey carried out over the winter season. Fox trails along the zoo's animal cages were also detected. Furthermore, fox feces were found on the snow near the primate cages. The camera trap survey showed that foxes intruded into the zoo through the places where the fence was relatively low with the piled up snow. Foxes also intruded through gaps where small streams were running under the fence. During the observation period in 2012 red foxes were detected on 163 of 476 working camera-days. At certain camera sites, red foxes were recorded in 25 out of 30 camera-days, revealing that red foxes intruded into the zoo frequently.

4. Discussion

Infection with the members of the genus *Echinococcus* has previously been reported in a number of nonhuman primate species [5–9]. Indeed, in Hokkaido, Japan, nonhuman primate deaths due to alveolar echinococcosis have already occurred in three of the four main zoos to date. These include a gorilla (*Gorilla gorilla*) and a lemur (*Lemur catta*) in the Asahiyama Zoo in 1994 [3]; a chimpanzee (*Pongo pygmaeus*) [25] and a Japanese macaque (*M. fuscata*) in the Kushiro Zoo in 1992; and a Japanese macaque in the Obihiro Zoo in 1998 [4,16,26]. Of these, the last case in the Obihiro Zoo was an outbreak in which 12 monkeys in a colony ($n = 57$) were infected with *E. multilocularis*. The 12 infected monkeys were treated with albendazole without surgical resection. These monkeys died one after another over 10 years and the last one died 13 years later (unpublished data). Alveolar echinococcosis of all the monkeys was confirmed by post-mortem dissection and pathological examination.

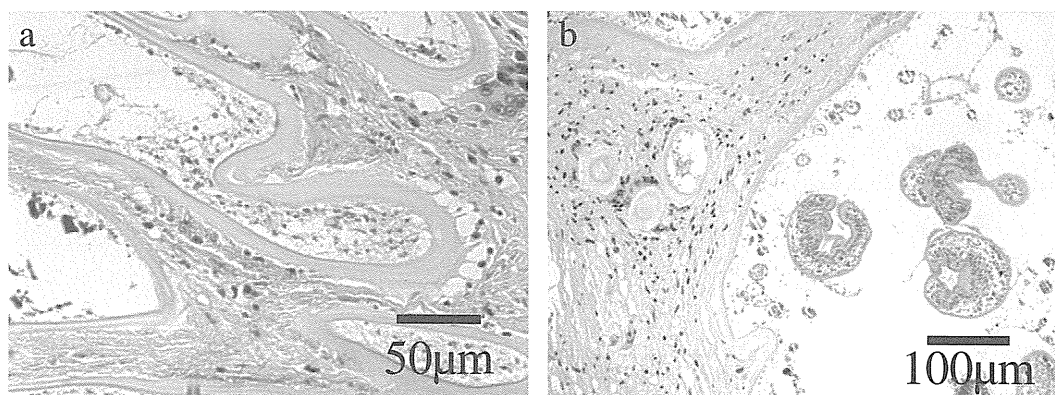


Fig. 2. Histopathological findings of liver lesion in Case 1. (a) Laminated layers (hematoxylin and eosin [HE] staining); (b) Protoscolex with hooks (HE staining).

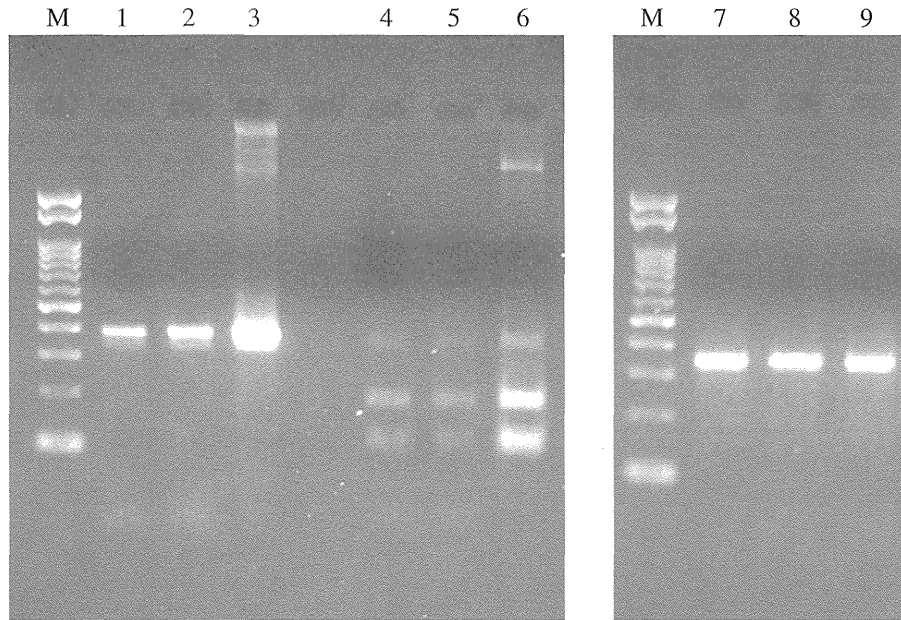


Fig. 3. Detection of *E. multilocularis* DNA in the cyst tissue obtained from Case 1 by PCR amplification. DNA fragments of the 12S mitochondrial rRNA gene (lanes 1–3) and the U1 snRNA gene (lanes 7–9) were amplified by PCR using specific primer pairs. Amplified DNAs for 12S rRNA were digested with *Ssp* I restriction enzyme (lanes 4–6). Lanes: M, 100 bp ladder size marker; lanes 1, 2, 4, 5, 7, and 8, genomic DNA isolated from the cyst tissue; lanes 3, 6, and 9, *E. multilocularis* (Hokkaido strain) genomic DNA as a control.

The present study describes two cases of *E. multilocularis* infection detected for the first time in the Maruyama Zoo. From this and other studies, primates are likely to be susceptible to infection with *E. multilocularis*, even if they were brought from non-endemic areas. The source of *E. multilocularis* infection was suspected to be the feces of red foxes which were occasionally observed near the cages. Although the Maruyama Zoo is enclosed by fencing with an angled overhang, we found some fox intrusion routes along the fence. Although exposure of the primates to *E. multilocularis* eggs was not confirmed, animals in the cages could reach those fox feces left near by the cages. To protect

against possible infection, straw bedding had not been used in primate cages because it might be contaminated by fox feces, and animal feed given to the primates had been kept indoors. The reported prevalence of *E. multilocularis* among red foxes across Hokkaido is approximately 40% (1998–2010, data reported by the Hokkaido Echinococcosis Conference, Hokkaido Government). Therefore, frequent intrusion of these foxes into the Maruyama Zoo is likely to carry an infection risk not just for caged animals, but also for zoo staff and visitors.

Two cases reported here were not naturally infected with *E. multilocularis*, as both infected animals were born and raised in the Maruyama Zoo. Although Case 1 died in the Hamamatsu Zoo, *E. multilocularis* infection is not endemic in that region. Furthermore, considering the time of the stay in the Hamamatsu Zoo (approximately 2 months) and the progression of the lesion, the infection seems to have occurred while she was in the Maruyama Zoo.

In the present cases, infection had happened in the highly-managed situations. This suggests that even animals in the zoos in Hokkaido, Japan are at the risk of accidental infection with *E. multilocularis* by red fox feces contaminated by eggs. It is essential not to allow red foxes to

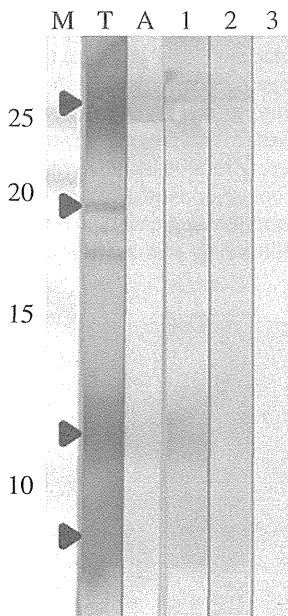


Fig. 4. Western blotting of the Celebes crested macaque (*Macaca nigra*; Case 2). Lanes: M, molecular weight marker; T, typical pattern of human alveolar echinococcosis patient; A, atypical pattern of human alveolar echinococcosis patient; 1, Celebes crested macaque in December 2011; 2, Celebes crested macaque in January 2012; 3, Celebes crested macaque in September 2012. Diagnostic bands are indicated by arrowheads.

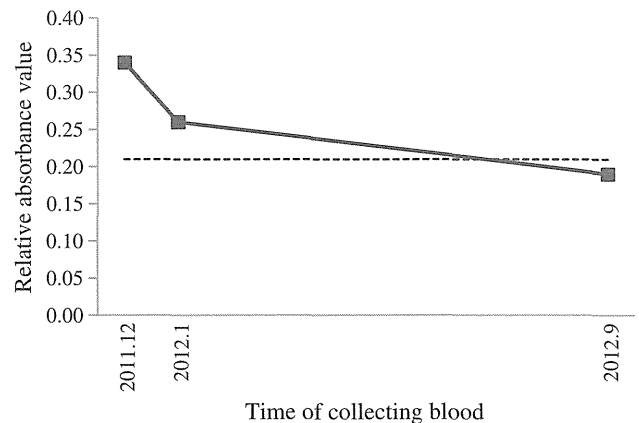


Fig. 5. Time course of ELISA absorbance values in Case 2. The dotted line in Fig. 5 shows the temporary cut-off value (0.21) as a reference, which was determined in the previous study on the outbreak in *Macaca fuscata* in 1998 [16].

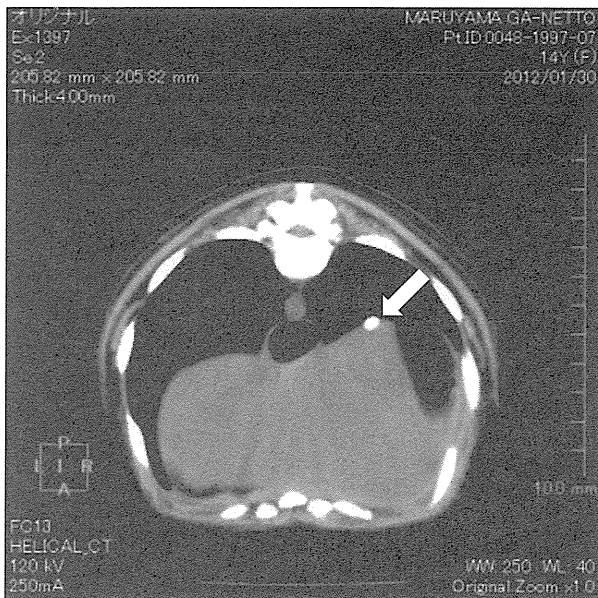


Fig. 6. Transverse CT image of Case 2. The calcified lesion is indicated by the arrow.

intrude into the zoos in Hokkaido. Preventive measures against infection of potential mammalian hosts are necessary. Furthermore, the measures taken in a zoo are important to get rid of the infection risk for visitors (humans).

In Case 2, computed tomography revealed only one small calcified lesion in the liver. Therefore, no veterinary treatment was deemed necessary at the time of diagnosis, and the monkey has been followed-up by antibody titers. The result of computed tomography corresponded with the time course of the antibody response (Figs. 4 and 5). Therefore, the animal was strongly suspected to have a spontaneous recovery. There have been no previous reports on the spontaneous recovery of nonhuman primates with *E. multilocularis* infection, although some human cases of the spontaneous recovery have been reported so far [27,28].

Usually, the 18-kDa band is a main diagnostic marker in typical positive cases of human patients in western blotting. Therefore, it is interesting that western blotting in Case 2 showed an atypical pattern. This atypical pattern of Case 2 has several possible causes. The first possibility is that sero-negativity against the 18-kDa antigen may be a characteristic feature of immune response of the Celebes crested macaque. However, no conclusive evidence is available as it is the only one confirmed case to date, and further investigation will be necessary. Susceptibility against *E. multilocularis* has already been shown to vary in species of mice in experimental infections [29,30], so it is conceivable that it also varies according to the species of nonhuman primates. The second possibility is that the timing of the blood sampling might take place after the disappearance of the antibody response in the process of the recovery. In general, the 18-kDa band is known to disappear first after surgical resection of cysts in a western blotting analysis of human alveolar echinococcosis patients [31]. Therefore, the disappearance of the 18-kDa band in the antibody response of Case 2 may simply reflect the stage of the recovery process.

In summary, we found two cases of *E. multilocularis* infection in non-human primates that were raised in a zoo and became infected while they were under a managed situation. Infection of the Diana monkey was identified by autopsy, while the Celebes crested macaque seems to be the first case of a nonhuman primate exhibiting spontaneous recovery. Although alveolar echinococcosis is one of the most dangerous diseases for primates including humans, the findings of Case 2 suggest that not all cases of alveolar echinococcosis are fatal. Relationship

between spontaneous cure and host immune defense should be explored in future.

Acknowledgments

The authors are grateful to Professor K. Yamada of Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Japan, for his valuable advice in interpreting CT images.

References

- [1] Torgerson PR, Budke C. Echinococcosis—an international public health challenge. *Res Vet Sci* 2003;74:191–202.
- [2] Kimura H, Furuya K, Kawase S, Sato C, Yamano K, Takahashi K, et al. Recent epidemiologic trends in alveolar echinococcosis prevalence in humans and animals in Hokkaido. *Jpn J Infect Dis* 1999;52:117–20.
- [3] Kondo H, Wada Y, Bando G, Kosuge M, Yagi K, Oku Y. Alveolar hydatidosis in a gorilla and a ring-tail lemur in Japan. *Jpn Vet Med Sci* 1996;58:447–9.
- [4] Sato C, Kawase S, Yano S, Nagano H, Fujimoto S, Kobayashi N, et al. Outbreak of larval *Echinococcus multilocularis* infection in Japanese monkey (*Macaca fuscata*) in a zoo, Hokkaido: western blotting patterns in the infected monkeys. *J Vet Med Sci* 2005;67:133–5.
- [5] Brack M, Tackmann K, Conraths FJ, Rensing S. Alveolar hydatidosis (*Echinococcus multilocularis*) in a captive rhesus monkey (*Macaca mulatta*) in Germany. *Trop Med Int Health* 1997;2:754–9.
- [6] Deplazes P, Eckert J. Veterinary aspects of alveolar echinococcosis—a zoonosis of public health significance. *Vet Parasitol* 2001;98:65–87.
- [7] Rehmann P, Gröne A, Lawrenz A, Pagan O, Gottstein B, Bacciarini LN. *Echinococcus multilocularis* in two lowland gorillas (*Gorilla g. gorilla*). *J Comp Pathol* 2003;129:85–8.
- [8] Bacciarini LN, Gottstein B, Pagan O, Rehmann P, Gröne A. Hepatic alveolar echinococcosis in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Vet Pathol* 2004;41:229–34.
- [9] Tappe D, Brehm K, Frosch M, Blankenburg A, Schrod A, Kaup FJ, et al. *Echinococcus multilocularis* infection of several old world monkey species in a breeding enclosure. *Am J Trop Med Hyg* 2007;77:504–6.
- [10] Wen H, New RRC, Craig PS. Diagnosis and treatment of human hydatidosis. *Br J Clin Pharmacol* 1993;35:565–74.
- [11] Torgerson PR, Schweiger A, Deplazes P, Pohar M, Reichen J, Ammann RW, et al. Alveolar echinococcosis: from a deadly disease to a well-controlled infection. Relative survival and economic analysis in Switzerland over the 35 years. *J Hepatol* 2008;49:72–7.
- [12] Dinkel A, Nickison-Rosenegk M, Bilger B, Merli M, Lucius R, Romig T. Detection of *Echinococcus multilocularis* in the definitive host: coprodiagnosis by PCR as an alternative to necropsy. *J Clin Microbiol* 1996;36:1871–6.
- [13] Bretagne S, Guillou JP, Morand M, Houin R. Detection of *Echinococcus multilocularis* DNA in fox faeces using DNA amplification. *Parasitology* 1993;106:193–9.
- [14] Yamano K, Goto A, Miyoshi M, Furuya K, Sawada Y, Sato N. Diagnosis of alveolar echinococcosis using immunoblotting with plural low molecular weight antigens. *J Helminthol* 2009;83:57–61.
- [15] Yamano K, Goto A, Nakamura-Uchiyama F, Nawa Y, Hada N, Takeda T. Galβ1-6Gal, antigenic epitope which accounts for serological cross-reaction in diagnosis of *Echinococcus multilocularis* infection. *Parasite Immunol* 2009;31:481–7.
- [16] Yamano K, Kanetoshi A, Goto A, Kishimoto M, Kobayashi N, Fujimoto S, et al. Japanese monkey (*Macaca fuscata*) with alveolar echinococcosis after treatment with albendazole for 10 years: serodiagnosis and determination of albendazole metabolites. *Parasitol Res* 2009;106:69–74.
- [17] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680–5.
- [18] Liance M, Janin V, Bresson-Hadni S, Vuitton DA, Houin R, Piarroux R. Immunodiagnosis of Echinococcus infections: confirmatory testing and species differentiation by new commercial Western blot. *J Clin Microbiol* 2000;38:3718–21.
- [19] Ito A, Nakao M, Kutsumi H, Lightowler MW, Itoh M, Sato S. Serodiagnosis of alveolar hydatid disease by Western blotting. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1993;87:170–2.
- [20] Ito A, Schantz PM, Wilson JF. EM18, a new serodiagnostic marker for differentiation of active and inactive cases of alveolar hydatid disease. *Am J Trop Med Hyg* 1995;52:41–4.
- [21] Ito A, Sako Y, Yamasaki H, Mamuti W, Nakaya K, Nakao M, et al. Development of Em18-immunoblot and Em18-ELISA for specific diagnosis of alveolar echinococcosis. *Acta Trop* 2003;85:173–82.
- [22] Leggatt GR, Yang W, McManus DP. Serological evaluation of the 12 kDa subunit of antigen B in *Echinococcus granulosus* cyst fluid by immunoblot analysis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1992;86:1–4.
- [23] de la Rue ML, Yamano K, Almeida CE, Iesbich MP, Fernandes CD, Goto A, et al. Serological reactivity of patients with *Echinococcus* infections (*E. granulosus*, *E. vogeli*, and *E. multilocularis*) against three antigen B subunits. *Parasitol Res* 2010;106:741–5.
- [24] Yagi K, Ohyama T, Okamoto M, Oku Y, Kamiya M, Kimura H. PCR-RFLP for identification of *Echinococcus multilocularis* and related Taeniid cestodes based on the determination of partial mitochondrial 12S rRNA gene. *Rep Hokkaido Inst Pub Health* 1995;49:163–6.
- [25] Taniyama H, Morimitsu Y, Fukumoto SI, Asakawa M, Ohbayashi M. A natural case of larval echinococcosis caused by *Echinococcus multilocularis* in a zoo orangutan (*Pongo pygmaeus*). In: Uchino J, Sato N, editors. Alveolar echinococcosis of the liver 1st ed. 1996. p. 65–7.

- [26] Kishimoto M, Yamada K, Yamano K, Shimizu J, Lee K, Kobayashi N, et al. Significance of imaging features of alveolar echinococcosis in studies on nonhuman primates. *Am J Trop Med Hyg* 2009;81:540–4.
- [27] Rausch RL, Wilson JF, Schantz PM, McMahon BJ. Spontaneous death of *Echinococcus multilocularis*: cases diagnosed serologically (by Em2 ELISA) and clinical significance. *Am J Trop Med Hyg* 1987;36:576–85.
- [28] Gottstein B, Mesarina B, Tanner I, Ammann RW, Wilson JF, Eckert J, et al. 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* 1991;45:734–42.
- [29] Matsumoto J, Yagi K. Experimental studies on *Echinococcus multilocularis* in Japan, focusing on biohazardous stages of the parasite. *Exp Parasitol* 2008;119:534–41.
- [30] Matsumoto J, Kouguchi H, Oku Y, Yagi K. Primary alveolar echinococcosis: course of larval development and antibody responses in intermediate host rodents with different genetic backgrounds after oral infection with eggs of *Echinococcus multilocularis*. *Parasitol Int* 2010;59:435–44.
- [31] Yamano K, Miyoshi M, Goto A, Kawase S. Time course of the antibody response in humans compared with rats experimentally infected with hepatic alveolar echinococcosis. *J Helminthol* Nov. 9 2012;86:1–8. <http://dx.doi.org/10.1017/S0022149X12000685>.

ブタのエキノコックス症 -その検出の疫学的重要性-

八木欣平¹、浦口宏二¹、作井睦子²

¹北海道立衛生研究所 感染症センター 感染症部

²北海道 上川総合振興局 保健環境部 富良野地域保健室

要約

1982年末、当時多包条虫（エキノコックス）の流行が確認されていなかった網走地方の養豚場のブタから多包虫（多包条虫の幼虫に対する呼称）が検出された。多包虫の有蹄家畜への自然感染例としては世界初の報告であり、その後、養豚場周辺の野ネズミの調査でも多包虫陽性例が検出された。これらのことにより、ブタの多包虫感染の検出が、その地域のエキノコックスの流行を把握する上で有効であることが確認された。北海道は全道の食肉検査機関に、ブタの屠畜検査時に多包虫病巣を明確に区別し報告するよう指示し、その結果、北海道における流行地域の拡大が明らかになっていった。現在、本症の本州への拡大が懸念されており、その浸淫の早期摘発のためには、ブタ屠畜検査の重要性は強調されなければならない。

Keywords: エキノコックス、多包条虫、ブタ、食肉検査、疫学的監視。

1. 北海道での多包条虫の流行

日本における多包虫症の最初の患者は、1936年に診断された北海道礼文島に居住歴のある28才の女性である。北海道の多包条虫は、道外から人為的もしくは媒介動物の移動により侵入した外来生物と考えられている[27]。礼文島における流行は1924年から26年にかけて、千島列島より導入されたキツネに寄生していた多包条虫が、キツネの繁殖に伴い流行が拡大、患者の発生へと繋がった[40]。礼文島の流行は、島内のすべての終宿主動物の殺処分によって撲滅に至ったとされている。1940-50年代の野犬の調査では、僅か2頭のイヌに各1匹の虫体を確認したに過ぎず、すでにこの地域の流行は終息しつつあったことが伺える[6]。北海道東部では、1965年に根室市で最初の患者が報告され、その後、根室市周辺でキツネと野ネズミでの感染が確認された[9]。根室地域における流行は、根室半島近辺の島に移入された養孤が、流氷上をわたって侵入してきたものと推測されており[40]、北海道東部の流行も人為的な移入と言っても過言ではない。北海道

は1965年より毎年100頭を超えるキツネの解剖検査を行い、この寄生虫の流行が北海道東部に限局しているとしてきた。しかしながら、1982年に、屠畜検査により、これまで流行地域とされていなかった網走地方のブタに多包虫の寄生を認め、周辺地域への流行の拡大が確認された[25, 26, 34]。北海道衛生部(当時)は、食品衛生課長通知(1983年6月15日付け食品第534号)により、屠畜検査で確認したブタの多包虫病巣を他の寄生虫病巣と区別して報告することとし、その結果、1984年までに北海道全域に散発的に流行が拡大していることが明らかになった[12]。ブタの調査、それに続く野ネズミの調査、北海道全域のキツネの調査と、主としてこれら動物3種の疫学調査により、1993年には北海道のほぼ全域での多包条虫の流行が確認されるに至った。キツネの解剖検査による流行状況調査は、北海道全域で多包条虫が確認されてからも継続され、近年は北海道のキツネの30-40%が感染していることを明らかにしている。ヒト患者は上記の1936年の患者より2013年末までに650人が報告され、近年は新規患者

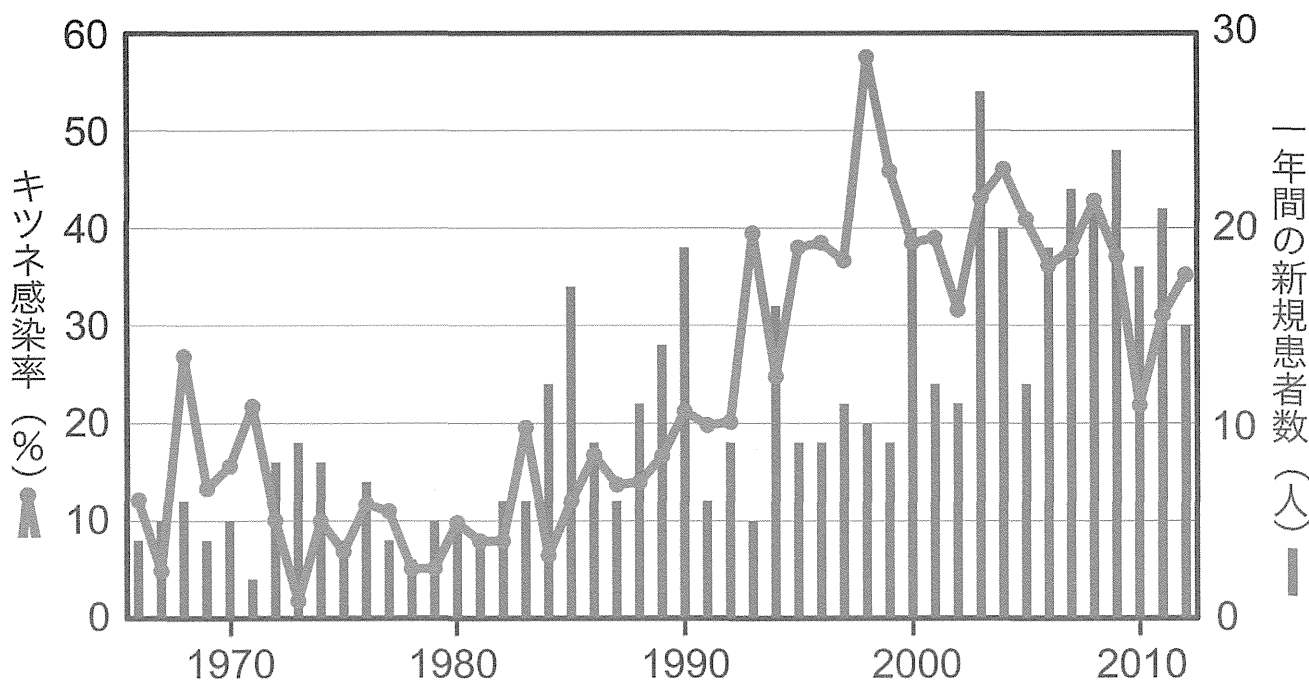


図1. 北海道の多包虫症の1年間の新規患者数とキツネの多包条虫感染率の年次推移。棒グラフは新規患者数(人)折れ線グラフはキツネの感染率(%)を示す。

数が年20名前後で推移している(図1)。

2. 本州での流行状況

本州におけるヒトの多包虫症は、数10例が報告されているが、北海道もしくは海外での感染がその原因と考えられるケースが多い[6]。動物での検出は、1998年と2008年に青森県のブタ[13, 15, 16]、2005年に埼玉県で捕獲されたイヌ[38]、2007年に山形県の米沢市営屠畜場に搬入されたウマ[8]、同様に2013年、2014年に福岡の屠畜場に搬入されたウマ[11]、そして2014年愛知県で捕獲されたイヌ(愛知県ホームページ2014年5月12日付け「犬におけるエキノコックス症の発生に伴う注意喚起について」<http://www.pref.aichi.jp/0000071035.html>)等が知られている。しかしながら、これらの検出はイヌや家畜からのものであり、それに続く野生動物の調査では陽性例は検出されず、地域での流行の定着は、確認されていない[21, 28, 39]。すなわち、現在までに本州では野生動物間での生活環が成立していることが確認された地域はまだない。

3. ブタの多包虫症

ブタへの多包条虫の最初の実験感染は Lukashenko [17, 18] により行われ、感染は成立するが包虫の発育は極めて悪く、自然界では中間宿主の役割を果たさないと報告された。自然感染例は Sakui et al. [26]の報告が世界で初めてであり、その後リトアニア、ポーランド、ドイツ等で報告されている[1, 3, 14]。

3-1. 病理

ブタの多包虫は、1982—1983年にかけて北海道網走保健所東藻琴食肉検査事務所(現：北海道東藻琴食肉衛生検査所)において、当時は未流行地域とされていた網走地方の養豚場から搬入されたブタから検出された。作井ら[25]の記載を以下に示す。なお、図については、本総説に際して新たに用意したものである。

【肉眼的所見】(図2参照)

結節は包膜面より半球状又は、軽く膨隆し、円形あるいはブドウ房状の境界明瞭な灰黄白色を呈する結節として認められる。結節の断面は、中心部灰黄白色膿瘍