

## 7 野生イノシシの豚熱及びアフリカ豚熱検査体制整備

○八町慶史 竹内美穂 高野真帆

### 要 約

豚熱ウイルスをはじめ、多数の病原体を保有している可能性があるため、野生イノシシの豚熱及びアフリカ豚熱検査における交差汚染防止対策を徹底した検査体制を整備した。

第一に、専用の検査区域を設定した。野生イノシシ検査を家畜保健衛生所立川庁舎（立川庁舎）で実施することで、家畜保健衛生所日の出庁舎で実施する飼養豚の病性鑑定と分離した。第二に、専用の検査機器・器具を配備した。豚熱及びアフリカ豚熱検査で必要となるものをリスト化し、立川庁舎へ配備した。第三に、交差汚染を防ぐ検査手法を確立した。検体処理、核酸抽出、PCR法及びELISA法を一室で行うこと、立川庁舎に安全キャビネットが1つしかないことを考慮し、交差汚染防止を念頭に置いた検査工程及び検査スペースを設定した。第四に、検査技術の高位平準化に取り組んだ。作業マニュアルの作成及び精度管理の実施を通して、作業員の技術向上に努めた。

上記取り組みを徹底し、令和2年度では4月から2月までの間で、野生イノシシ計36頭検査を実施し、豚熱PCR陽性8頭、豚熱抗体検査陽性4頭であった。また、偽陽性事例を1検体認めた。本事例は、検体間での交差汚染が疑われたため、担当内で協議し、検体の取り扱いに注意した対策を講じた上で再検査をした結果、陰性となり、検査マニュアルを変更した。令和3年度以降、検体数の増加が見込まれるが、今回構築した体制を維持、強化していくことで、都内におけるウイルスの浸潤順状況を的確に把握、監視していく。

平成30年9月、岐阜県で初めて野生イノシシの豚熱感染が確認されて以来、野生イノシシにおける感染は拡大し、令和3年1月27日時点では、23都府県にて陽性事例が確認されている。科学的な分析・評価により豚熱の感染経路の究明等を行うために設置される「拡大豚コレラ疫学調査チーム」の調査より、野生イノシシにおける豚熱の感染拡大は、養豚場への豚熱ウイルスの侵入に大きく関与していることが示唆されている<sup>1)</sup>。そこで、野生イノシシにおける豚熱の感染拡大防止及び環境中

のウイルス濃度低減を図り、いち早く本病の清浄化を達成するため、国主導のもと野生イノシシへの豚熱経口ワクチンの野外散布が実施されている。都内における野生イノシシの豚熱ウイルス浸潤状況を正確に把握し、飼養者へ速やかに情報提供を行うため、そして散布した経口ワクチンの有効性評価のため、当所では野生イノシシの豚熱検査を行っている。

また、アフリカ、ヨーロッパ及びアジアを中心にアフリカ豚熱の感染が拡大している。海外での本病の感染拡大にも、野生

イノシシの関与が示唆されている。現在、日本は清浄国ではあるが、本病のウイルスの侵入リスクは非常に高まっている。令和3年2月時点では、水際検疫により輸入畜産物より本病のウイルス遺伝子が94例検出されており、そのうち3例から感染性のあるウイルスが分離された。豚熱同様、輸入畜産物等を介して国内へ持ち込まれた本病のウイルスが野生イノシシに感染するリスクがあるため、野生イノシシを検査し本病のウイルスの侵入を監視・把握する必要がある。

また、野生イノシシの検査にあたっては、様々な病原体を保有している可能性を考慮して、採材及び検査を行う必要がある。日本の野生イノシシでは、豚熱ウイルスをはじめとして、表1のような病原体が検出されている<sup>2) 3)</sup>。

表1 日本の野生イノシシが保有している病原体

ウイルス性疾患	豚熱ウイルス 日本脳炎ウイルス オーエスキュー病ウイルス 豚繁殖・母体障害症候群ウイルス 急性肝炎ウイルス 重症熱性血小板減少症候群ウイルス など
細菌性疾患	豚丹毒菌 豚胸腺肺炎菌 サルモネラ属菌 腸管出血性大腸菌 御座性レプトスピラ 日本紅斑熱リケッチア など
寄生虫性疾患	トキソプラズマ 住肉胞子虫 有膜糸虫 肺吸虫 など

豚での報告ではあるが、豚熱ウイルスに関して、豚熱ウイルス接種後6日目から15日目までの間、血液、唾液、鼻汁及び糞便から豚熱ウイルス遺伝子が検出されたこと<sup>4)</sup>、中毒性・強毒性株の豚熱ウイルス接種群からエアロゾル中より $10^{1.6} \sim 10^{3.8}$ TCID<sub>50</sub>相当/m<sup>3</sup>のウイルスRNAが検出されたことより<sup>5)</sup>、多量に排出された豚熱ウイルスが検体や環境が汚染する可能が示唆される。

野生イノシシの検査により実験器具や実験室を汚染すると、試薬や他の検査材料が汚染されてしまう可能性がある。また、実験室の汚染は、病原体を当所から都内飼養者へ伝播してしまうリスクにもつながりかねない。そのため野生イノシシ検査の交差汚染防止対策が必須と考え、4つの取り組みを通し検査体制を再整備した。

### 取り組み① 専用検査区域を設定

当所は令和2年4月に西多摩郡日の出町の新庁舎（日の出庁舎）へ移転したが、移転前の立川庁舎では、共通の検査室で飼育豚及び野生イノシシの検体処理を行っていたため、動線が交差していた（図1）。



図1 家保立川庁舎での作業動線

移転後は、飼養豚の病性鑑定は日の出庁舎、野生イノシシ検査は立川庁舎で行うことで、検査区域を確実に分離した。その他対応として、汚染を都内飼養者へ上げないように、野生イノシシ対応専用の車両を設定した。また、人を介して病原体を拡散しないよう、野生イノシシ検査日は検査担当者が日の出庁舎に立ち寄らないようにするとともに、野生イノシシ採材及び検査に従事した職員は3日間豚農家へ訪問しないこととした。

## 取り組み② 専用検査機器を配備

豚熱及びアフリカ豚熱検査では、血清分離、臓器乳剤作成、核酸抽出及びコンベンショナルPCR法による遺伝子検査を行う。加えて、豚熱検査ではELISA法及び中和試験による抗体検査も行う。それぞれの検査に必要な機械器具を立川庁舎に配備し、野生イノシシ検査専用とした。

## 取り組み③

### 交差汚染を防ぐ検査手法の確立

第一に、交差汚染を防ぐ検査工程を考案した。そもそも、バイオハザード対策から、感染性を有する病原体を扱う検体処理及び核酸抽出は、安全キャビネット内で行う必要がある。一方、PCRの試薬調整は、クリーンな環境で行い、試薬への交差汚染を防がなければならない。検査区画には安全キャビネットが1台しかないため、まず検体を取り扱う前のクリーンな安全キャビネット内でPCRの試薬調整を行った後に、図2のとおり検査を実施していくこととした。また、作業の間には紫外線消毒や作業スペースの清拭を行い、清浄性を確保した。

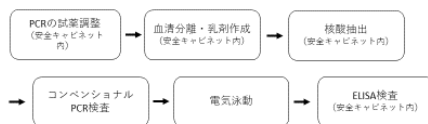


図2 交差汚染を防ぐ作業工程

第二に、ELISA法は安全キャビネット内で検査を実施することとした。感染個体の血清中に含まれるウイルスは、非特異反応

低減のための補体非働化処理では、完全には不活化できないためである<sup>6) 7)</sup>。

第三に、検査スペースの設定について、一方通行で遺伝子検査を行うこととした。PCR法の遺伝子増幅産物の汚染は検査結果に大きな影響を及ぼすためである。そこで、図3のとおり検査スペースを確実に区分することとした。

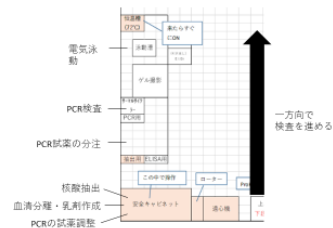


図3 検査スペースの区分

## 取り組み④ 検査技術の高位平準化

当所では、野生イノシシ検査担当を4名設定し検査を行っているが、全検査員で同等の検査精度を維持するため、さきに述べた取り組みも踏まえた作業マニュアルを作成した。その内容は、1日の作業工程、検査室の機械器具の配置図、各検査の標準作業手順書等である。また、機械器具の校正、内部精度管理の実施及び検査員の教育訓練を通して、精度管理を実施することとした。

## 令和2年度 検査実績

令和2年4月から令和3年2月末日までの豚熱検査の結果は表2及び図4のとおり。計36頭検査を実施し、7月には都内初のPCR検査陽性事例が確認された。また、捕獲イノシシと比較し、死亡イノシシのPCR検査陽性率は高い結果となった。アフリカ

豚熱については死亡イノシシに対して検査を実施し、計 10 頭 PCR 検査陰性を確認した。

表2 豚熱検査結果①(R2.4月～R3.2月)

	PCR検査 (陽性数/検査数)	ELISA検査 (陽性数/検査数)
死亡イノシシ	7 頭/10頭	—
捕獲イノシシ	1 頭/26頭	4 頭/26頭
計	8 頭/36頭	4 頭/26頭

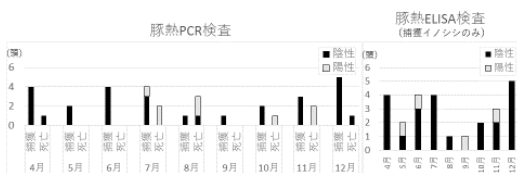


図4 豚熱検査結果②(R2.4月～R3.2月)

### 偽陽性判定事例への対応

令和2年6月3週目、捕獲イノシシ2検体を検査し、偽陽性判定を認めた。コンベンショナルPCR法で2検体中1検体が陽性になりRFLP法を実施したところ、抽出陽性対照(牛ウイルス性下痢ウイルス)と同じサイズの増幅産物を認めた(図5)。

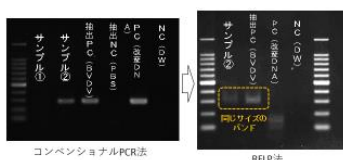


図5 偽陽性判定事例

RFLP法により、豚熱ウイルスと抽出陽性対照のバンドサイズは異なるよう設計されているため、抽出陽性対照が検体へ交差汚染した可能性が示唆された。病性鑑定担

当で対応策を検討したところ、核酸抽出時もしくはPCR検査時での交差汚染が疑われたため、表3のとおり対応策を考案し再検査を実施した結果、豚熱遺伝子検査陰性を確認した。なお、今回考案した対応策は注意事項として作業マニュアルに盛り込んだ。以降、偽陽性判定事例は認めていない。

表3 偽陽性判定事例への対応策

- ・核酸抽出から試験をやり直し
- ・検査スペース及びビベットの、表面汚染除去剤で洗浄 & 紫外線消毒
- ・サンプル間で距離を開ける
- ・サンプル間でチップを共用しない
- ・こまめに手袋を変える
- ・こまめに廃棄物を捨てる

### 考 察

当所では、毎週野生イノシシ検査実施日を設けており、高頻度に検査を行っている。加えて、豚熱感染個体の場合、検体以外の容器などにも多量のウイルスが付着している可能性があり、交差汚染のリスクは非常に高い。また、他の地方自治体でも、野生イノシシ検査による豚熱ウイルスの交差汚染が疑われる事例は報告されていて、早急に交差汚染防止対策を講じる必要があった。対策の中でも基本的かつ重要な対策は一般的な病性鑑定区画と野生イノシシ検査区画の分離であったが、庁舎移転に伴い確実に分離できたのは、非常に有効であり幸運でもあった。しかし、立川庁舎には検査室が1室しかないこと、安全キャビネットが1台しかないことなどにより、検査室、機械器具及び試薬の汚染を防ぐ検査手法を考案する必要があったため、検査員で協力して検査手法の確立及び作業マニ

マニュアルの作成を行った。複数の検査員で協力して作成したことにより、様々な視点が反映された完成度の高い作業マニュアルが完成した。これは、日の出庁舎における一般的な病性鑑定業務にも生かせるものであったため、積極的に取り入れ、一般的な病性鑑定の検査精度の向上のために活用している。

偽陽性判定事例への対応では、当検査には常に交差汚染のリスクがあること、このような事態を想定し予め対策を練る必要性などを実感した。交差汚染について改めて考え直すことができた点、検査手法の見直しやマニュアルの改善につながった点など、本事例は検査体制強化のためのよい契機になったと感じている。また、PDCAサイクルを意識し原因の追究から改善まで繋げることができたため、今後も同様の対応により検査精度を向上させていく。

令和3年度より、東京都野生イノシシ豚熱検体提供事業が発足する。それにともない検査数の増加が見込まれ、検査頻度の増加及び作業工程の複雑化も想定されるが、今回構築した検査体制を維持強化していくことで、的確に豚熱及びアフリカ豚熱の検査を実施し、ウイルスの都内侵入、浸潤状況を監視していく。

#### 引用文献

- 1) 農林水産省拡大豚コレラ疫学調査チーム:豚コレラの疫学調査に係る中間取りまとめ (2019)
- 2) 米満研三、服部志保、鈴木絢子、浜崎千菜美、下田宙、前田健:ニホンイノシシウイルス感染症, 兵庫ワイルドライ

フモノグラフ, 6号, 93-105 (2014)

- 3) 壁谷英明、佐藤真伍、丸山総一:野生動物の食肉利用と人獣共通感染症, 日本獣医師会雑誌, 第69巻第5号, 277-283, (2016)

- 4) Ken-ichiro KAMEYAMA, Tatsuya NISHI, Manabu YAMADA, Kentaro MASUJIN, Kazuki MORIOKA, Takehiro KOKUHO, Katsuhiko FUKAI: Experimental infection of pigs with a classical swine fever virus isolated in Japan for the first time in 26 years, *Journal of Veterinary Medical Science*, 81(9), 1277-1284. (2019)

- 5) Eefke Weesendory, Arjan Stegeman, Willie L A Loeffen: Quantification of classical swine fever virus in aerosols originating from pigs infected with strains of high moderate or low virulence, *Veterinary Microbiology*, 135(3-4), 222-230, (2009)

- 6) 竹内美穂.: CSF 抗体検査における非働化条件の検討, 令和元年東京都家畜保健衛生所業績発表会集録, (2020)

- 7) Denise Meyer, Anja Petrov, Paul Bacher: Inactivation of classical swine fever virus in porcine serum samples intended for antibody detection, *Pathogens*, 8(4), 286-299, (2019)