

10 野生いのしし検査体制の効率化及びリアルタイムPCR法における溶血検体の条件検討

仙台家畜保健衛生所

齋藤拓海, 千葉直幸

1 はじめに

平成30年9月、国内養豚場で26年ぶりに豚熱が発生し、その後野生いのししにおける豚熱感染が拡大継続している。本県では平成30年9月より死亡野生いのししの豚熱検査を開始していたが、令和2年9月、隣県の福島県の死亡野生いのしし1頭において豚熱遺伝子陽性が確認されたことにより、改めて本県での野生いのししの検査体制の解決すべき課題を抽出して整理し、効率的な検査体制構築し、改善したのでその概要を報告する。また、令和3年10月から新たに使用が可能となった豚熱のリアルタイムPCR法は核酸抽出が簡易な一方、検体の溶血程度が検査結果に影響を及ぼす可能性があるとの報告があり¹⁾、野生いのししの検体は豚と比べて溶血検体が多かったことから、溶血検体の核酸抽出(前処理)条件の影響について検討したので、併せて報告する。

2 野生いのしし検査体制の課題と改善

本県の野生いのしし検査体制を見直したところ、課題として、①野生いのしし専用検査室未整備による豚の検査との交差汚染の危険性、②検体数及び搬入頻度の増加に伴う搬入者の負担増大及び受取作業の煩雑化、③検査人員の不足による業務遅延及びウイルス担当の負担増大、④遺伝子検査法に係る複数の核酸抽出作業及び制限酵素処理によるコンベンショナルPCRの最終判定までに2日間要する、4点が浮上した。そこで、4つの課題について以下の改善を行った。

(1) 野生いのしし専用検査室の整備

平成30年9月から令和2年度までは、同一の検査室で豚と野生いのししの検査日を分け、交差汚染防止に留意し、それぞれ専用試薬を用いて検査を実施していたが、令和3年3月に当所の既存の空き検査室を利用し、野生いのしし専用検査室(第2ウイルス検査室)を緊急整備した。検査者による交差汚染防止対策として、試薬、作業着、靴は専用とし、各検査室間の同日入室を原則禁止、検査室内を3区画(検体処理区画、抗体検査区画、遺伝子検査区画)にゾーニングし、交差汚染防止対策を徹底した(図1)。

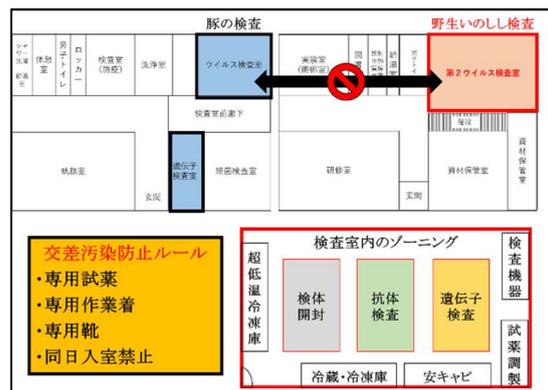


図1 野生いのしし専用検査室の整備と交差汚染防止対策

(2) 検体搬入方法の改善

検査頻度は、令和元年度までは検体数が少なく、都度検査でも負担は少なかったが、検体数が増加したことから令和2年度は月2回、令和3年度から週1回と増加した。検体搬入方法は、令和2年度までは各家畜保健衛生所職員による直接持ち込みであったが、検査頻度に合わせた検体搬入が搬入する職員の大きな負担となることを見込まれたため、令和3年度から委託団体によるバイ

オボトルを使用した保冷郵送に変更した(表 1)。

表 1 検査頭数増加に伴う検査体制の改善

年度	H30年度	R1年度	R2年度	R3年度	R4年度 (12月まで)
検査頭数	15頭	14頭	139頭	484頭	210頭
検査頻度	都度		月2回	週1回	
搬入方法	家保職員による持込			郵送 (バイオボトル)	
抗体検査者	ウイルス			班全員 (内部精度管理実施)	
遺伝子検査者				ウイルス (不在時：細菌)	

(3) 検査者増員によるウイルス担当の負担軽減

令和2年度までは、ウイルス担当者のみが豚熱の抗体検査と遺伝子検査の両方を実施していたが、令和3年度から抗体検査(ELISA 検査)については、内部精度管理に基づき、病性鑑定班全員が検査する体制に変更した(表 1)。

(4) 豚熱遺伝子検査手法の改善

遺伝子検査は、令和4年12月まではコンベンショナル PCR 法を実施し、核酸抽出については、豚熱及びアフリカ豚熱の検査を平行して行う必要があった。令和2年以前は2種類のキット(核酸抽出キット(High Pure Viral Nucleic Acid Kit:Roche)及び RNA 抽出キット(High Pure Viral RNA Kit:Roche))を使用しており、結果解析まで6時間35分を要した。その後、令和3年度は核酸抽出キットのみでも診断に支障がないことを確認し、1種類のキットによる抽出に変更した。令和4年1月からは自動核酸抽出装置(magLEAD 12gC:プレジジョン・システム・サイエンス株式会社)を導入した。令和3年10月に特定家畜伝染病防疫指針の一部変更により、豚熱及びアフリカ豚熱のリアルタイム PCR 法における検査が可能となったことから、対応するリアルタイム PCR 機種の検討を進め、R5

年1月から豚熱及びアフリカ豚熱を同時に検査可能なリアルタイム PCR 法(マルチプレックスダイレクトリアルタイム PCR 法)による検査を開始した。

(5) 結果

野生いのしし専用検査室の整備により、豚及びいのしし検査における交差汚染の危険性は解消された。検体の保冷郵送により、定期的にとまめて検体を受取ることが可能となり、バイオボトルの開封及び検体処理(遠心分離や血清分注等)の作業は円滑化され、負担が軽減された。抗体検査を班全員で分担したことにより業務量を分散し、ウイルス担当の負担が軽減されたとともに、内部精度管理の実施により、検査者全員の診断精度が向上した。

遺伝子検査では、自動核酸抽出装置の導入により、マニュアル作業による負担を軽減するとともに、核酸抽出時間を令和2年度以前と比較して90分短縮した。本県で導入したマルチプレックスダイレクトリアルタイム PCR 法は、1回の検査で豚熱及びアフリカ豚熱の遺伝子を同時に検出できるため、短時間で診断が可能となり、PCR 反応から結果解析までの時間を令和2年度以前と比較して135分短縮した。検査時間の大幅な短縮により、判定まで2日を要していた遺伝子検査が1日で判定可能となった。

3 リアルタイム PCR 法における溶血検体の検討

本リアルタイム PCR 法では、粗抽出を実施した溶血検体の色素の影響により、蛍光検出が阻害される可能性がある¹⁾。メーカー推奨の検体の前処理方法では、検体の溶血程度を8段階(①～⑧)に区分し、区分に応じて核酸抽出、粗抽出又は粗抽出後に DW を用いて希釈を実施する。今回、メーカーの示す最大の溶血程度である①区分よりも濃い区分(⑩)を独自に新たに設定し、令和2年

1月から令和4年12月までの血清773検体について溶血程度を区分した。その結果、核酸抽出又は粗抽出後に希釈が必要な検体(①～③区分)は364/773検体(約47%)であり、当所に搬入された野生いのしし検体の約半数が本リアルタイムPCR法において蛍光検出が阻害される可能性があると推測された(図2)。このことから、本リアルタイムPCR法においてより正確な診断を行うために、溶血検体を用いた核酸抽出条件の違いによる影響について比較検討した。

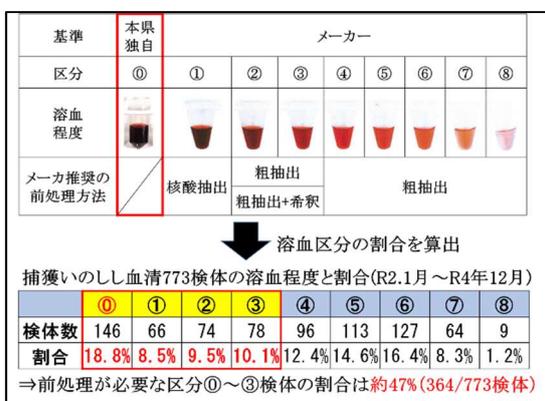


図2 メーカー推奨の前処理と溶血区分及び検体の溶血割合

(1)材料及び方法

材料は前述の前処理が必要な血清(①～③区分)のうち、コンベンショナルPCR法により豚熱遺伝子陽性と診断した血清35検体(①①区分:11検体(No.1-11), ②③区分:24検体(No.12-35))を用いた。本検討における核酸抽出は【条件A】自動核酸抽出, 【条件B】粗抽出, 【条件C】粗抽出後にDWで2倍希釈, の3条件でマルチプレックスダイレクトリアルタイムPCR法により比較した。

リアルタイムPCR法は、CSFV/ASFV Direct RT-qPCR Mix & Primer/Probe (with ROX Reference Dye)(タカラバイオ株式会社)を用いて実施し、QuantStudio 5 リアルタイムPCRシステム(サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会

社)により解析した。また、3条件における検査費用及び検査時間についても比較検討した。

(2)結果

豚熱の検査感度は、条件A及びBによる抽出では100%(35/35検体)であったが、条件Cでは97.1%(34/35検体)となり、1検体(No.5)は豚熱遺伝子陰性となった。Ct値(平均値)は条件Aでは24.3、条件Bでは25.5、条件Cでは26.0となり、条件Aが最も低値となった。また、条件Aでは蛍光強度の低下や増幅曲線の乱れは確認されなかったが、条件Bでは4検体(No.2, 5, 13, 26)で蛍光強度の低下、1検体(No.26)で増幅曲線の乱れが確認され、条件Cでは1検体(No.13)で蛍光強度の低下が確認された。また、3条件における核酸抽出に係る1検体あたりの検査費用及び12検体程度の検査時間を比較すると、条件Aでは496円、26分であり、条件B及びCでは250円、5分であった(図3)。

条件	④自動核酸抽出	⑤粗抽出	⑥粗抽出+希釈
感度	100%(全検体陽性)		97.1%(1検体陰性)
Ct値(平均値)	24.3	25.5	26.0
蛍光強度の低下	なし	4検体	1検体
増幅曲線の乱れ	なし	1検体	なし
検査費用/1検体	496円	250円	
核酸抽出時間	26分	5分	

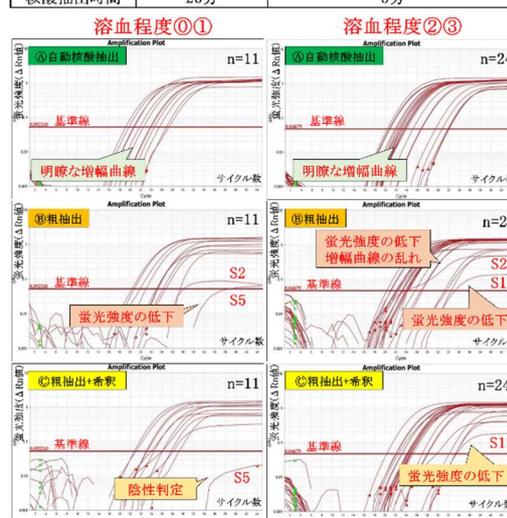


図3 条件検討の結果比較

4 まとめ及び考察

令和2年度以降、野生いのしし検査体制を見直し、4つの課題について改善したことにより、限られた人員で検査頭数の増加に対応できる検査体制を構築した。令和3年6月、七ヶ宿町で発見された死亡いのししの豚熱遺伝子陽性の初確認以降から、令和4年12月までに計862頭の豚熱検査を実施し、遺伝子陽性152頭、抗体陽性214頭を確認した。

溶血検体の核酸抽出条件の検討では、蛍光検出が阻害される可能性がある溶血程度の強い検体を用いて3つの前処理条件での影響についてリアルタイムPCR法で比較検討したところ、自動核酸抽出及び粗抽出の検査感度は、コンベンショナルPCR法と同等の結果となったが、粗抽出後にDWで2倍希釈した場合、1検体(No.5)が豚熱遺伝子陰性となった。粗抽出及び粗抽出後にDWで2倍希釈する場合で、蛍光強度の低下や増幅曲線の乱れが35検体中4検体(No.2, 5, 13, 26)で確認されたが、今回の結果からは溶血検体の色素が蛍光検出を阻害する原因特定には至らなかった。

条件検討の結果(検査感度、蛍光強度及び増幅曲線の波形)から、溶血程度①～③区分の検体については自動核酸抽出の実施が望ましいと考えられたが、検査費用及び検査時間を考慮すると、溶血程度①①区分は自動核酸抽出、②区分以降は粗抽出を実施し、粗抽出を実施した検体において判定が困難な場合は自動核酸抽出により再検査する方法が本県の現状では最適であると判断した(図4)。

当県では今回の検討結果を用いた核酸抽出方法でリアルタイムPCR法を実施予定であり、今後も状況に応じて検査体制を見直し、迅速で正確な診断に努めていきたい。

本県独自の最適な前処理方法										
区分	①	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	
溶血程度										
必要な前処理	核酸抽出		粗抽出(判定困難な場合、核酸抽出を実施)							

図4 本県独自の最適な前処理方法

5 引用文献

- 1) Tatsuya Nishi :Establishment of a Direct PCR Assay for Simultaneous Differential Diagnosis of African Swine Fever and Classical Swine Fever Using Crude Tissue Samples. Viruses, 14, 498 (2022)