

野生イノシシの豚熱・アフリカ豚熱検査材料の比較検討

香川県東部家畜保健衛生所

○寺嶋昌宏、上村圭一

1 はじめに

豚熱は平成 30 年に岐阜県で確認されて以降、豚・イノシシにおける感染が国内で拡大しており、本県においては R5. 1. 4 に発見された死亡イノシシから CSFV 遺伝子が検出されて以降、R5 年 12 月末までの 1 年間で 44 例の陽性が確認されている。このうち、死亡イノシシからの検出例は 17 例にのぼり、捕獲イノシシに比べ感染率もはるかに高く、サーベイランスにおいて有用な検体といえる（表 1）。これら死亡イノシシの検査材料については血清、臓器試料とされていたが、令和 5 年 11 月に耳介が検査材料として追加された。当所で陽性が確認された死亡イノシシ 17 頭について検査材料を比較したところ、若干の知見を得たので報告する。

年度		R4	R5（12 月末時点）
検体の種別 及び頭数		捕獲 355 死体 11	捕獲 444 死体 29
PCR 検査 陽性	豚熱	2（死体）	27（捕獲） 15（死体）
	アフリカ豚熱	0	0

表 1 香川県における豚熱等サーベイランス（PCR）の実施状況

2 材料及び方法

死亡イノシシについては腐敗の状況等を踏まえ、検査の適否を判断したうえで扁桃、脾臓、血液、耳片を採取し、検査材料とした。

豚熱等の遺伝子検出には、タカラバイオの CSFV/ASFV Direct RT-qPCR Mix & Primer/Probe（又は同製品 Ver2）を用い、検体からの遺伝子抽出は、Roche 社の核酸精製キット（High Pure Viral Nucleic Acid Kit）を使用した。

3 PCR 検査結果

豚熱ウイルス遺伝子が検出された死亡イノシシ 17 頭の検査材料別 Ct 値の一覧を表 2 に示す。臓器別に比較すると、扁桃<脾臓<耳片<血清の順で Ct 値が高くなり、扁桃組織中にウイルス遺伝子が多く存在していることが示唆された。（扁桃と血清、扁桃と耳片の Ct 値で有意差あり。）このことから、扁桃は豚熱ウイルス遺伝子を検出しやす

NO	血清	扁桃	脾臓	耳片
平均	26.0	21.7	23.1	23.9
806	35.3	27.5	不検出	
820		26.2		
878	26.1	21.1	24.3	
879	21.4	21.2	20.8	
882	22.8	20.8	23.3	
1283		17.9	19.9	
1313		17.4		22.4
1315	24.3	17.6	21.3	22.0
1322		21.6		
1323		22.0		24.1
1324		23.0		23.4
1325		20.6		26.0
1326		22.4		25.3
1328		26.1	22.4	23.7
1335		21.1	29.5	25.4
1336		20.9	21.6	22.5
1340		21.5	24.6	24.2

表2 CSFV遺伝子検査材料別Ct値比較

く、優先して採材、検査すべき臓器と思われた。

しかしながら、死体の腐敗で採材臓器を扁桃のみとした個体 (NO. 820) や扁桃に多数の蛆が寄生していた個体 (NO. 1328) では Ct 値が他の個体に比べて高く、検査材料としての適否を見極める必要があると思われた。

血清を材料とした PCR 検査は 5 検体と少ないが、総じて Ct 値は高く、検査の優先度は高くないと思われた。

脾臓は扁桃に次いで Ct 値が低く、ウイルス遺伝子が多く存在していることが示唆された。しかし、陽性判定個体 (NO. 806) の 1 頭において、脾臓からウイルス遺伝子が検出できなかったことから、脾臓単独の検査では感染を見逃す可能性があると思

われた。

耳片を検査材料とした PCR 検査では、耳片を採取していた豚熱陽性個体 10 頭全てからウイルス遺伝子が検出された。これら耳片の Ct 値は扁桃や脾臓のそれと比べると高い傾向が見られたものの、診断するうえで支障はないと思われた。しかしながら、耳片からの核酸抽出・精製の前段で行う乳剤作製時に耳片被毛が飛散するため、耳片処理毎に安全キャビネット内の消毒やクリーンシート・手袋交換を要し、検査が煩雑になる点が問題であった。そこで、耳介の被毛焼却を検討した。

4 耳片被毛焼却の比較結果

通常の採取試料の乳剤作製の流れは、次のとおり。



安全キャビネット内で採取耳片から皮膚片を切り取り、細切し、メタルコーンを用いて

耳片乳剤を作製するが、皮膚片の切取り、細切の過程で被毛が飛散するため、コンタミ対策で作業が煩雑になる。そこで、被毛焼却で省力化をはかるとともに、豚熱ウイルス遺伝子抽出への影響を比較するため、陽性個体の耳片を再利用して被毛焼却の有無でCt値を比較した。

ア 死体からの採材時に被毛カットしていなかった場合

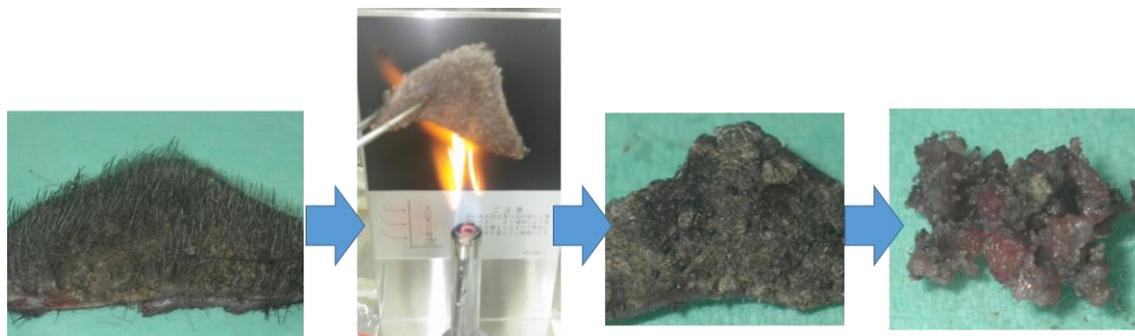


焼却が不十分

縮毛状に縮れるのみ

イノシシの耳片被毛は剛毛で容易に焼却することができなかった。また、繰り返し炙って焼却を試みたものの、縮毛状に縮れるのみで消失には至らず、被毛カットなしでの被毛焼却は断念した。

イ 死体からの採材時に被毛カットを実施していた場合



被毛の焼却容易

被毛飛散リスク小

そこで、フィールドで採材する際に被毛をカットしていたものとして、予め被毛を短くした耳片を焼却したところ、残存していた被毛を容易に焼却できた。乳剤化のため切り取った皮膚片には飛散するほどの被毛が残っておらず、皮膚の切取り、細切時のコンタミ対策を省力化することができた。

耳片被毛焼却の有無で豚熱ウイルス検出系 Ct 値を比較したところ、焼却した耳片の試料を用いた Ct 値が有意に高くなった (表 3) もの、PCR 検査の判定上はさほど影響がないと思われた。

NO	被毛焼却 なし	被毛焼却 あり
平均	23.9	24.7
1313	22.4	22.9
1315	22.0	21.7
1323	24.1	25.6
1324	23.4	24.7
1325	26.0	26.8
1326	25.3	26.1
1328	23.7	24.4
1335	25.4	25.7
1336	22.5	23.6
1340	24.2	25.3

表3 豚熱ウイルス遺伝子検出系
Ct 値の被毛焼却有無の比較

5 考察

死亡野生イノシシにおける豚熱及びアフリカ豚熱ウイルス遺伝子検出の検査材料は血液、扁桃・脾臓等の臓器試料及び耳介とされ、死体の腐敗や損壊等の状況に応じて検査材料を採取している。豚熱ウイルス遺伝子が検出された個体は、概ねいずれの臓器からも検出されており、PCR 検査を行う検査材料を絞り込むことが可能と思われた。この場合、イノシシ体内でのウイルス消長により臓器中のウイルス遺伝子が検出限界以下に減少している事例があることから、検出感度の高い扁桃を優先して検査することが重要と思われる。また、腐敗等で核酸遺伝子が分解され Ct 値が高くなる事例も見受けられることから、検査不成立や判定困難に備えておくことが望ましく、この点、耳片は死後変化しにくい点で優れており、再検査時の試料として取り扱うのであれば、乳剤処理化の煩雑さもさほど問題にならないと思われる。