

業績ノート

野生いのしし検査体制の効率化及びリアルタイムPCR法に供する溶血検体の核酸抽出法の検討

齋藤拓海¹⁾, 千葉直幸¹⁾

1) 宮城県仙台家畜保健衛生所

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た。令和2年9月、隣県の福島県において死亡野生いのしし1頭が豚熱陽性となったことから本県での野生いのししの検査体制を強化するため、現状の課題を抽出、整理し、効率的な検査体制を検討し、再構築したのでその概要を報告する。また、令和3年10月から導入したリアルタイム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る¹⁾。野生いのししの検体は、飼養豚と比較して溶血している検体が多く、溶血検体の核酸抽出（前処理）方法の影響についても併せて検討したので、報告する。

2 野生いのしし検査体制の再構築

当家保における野生いのししの検査体制について見直したところ、4つの課題が明らかとなった。1つ目は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つ目は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つ目は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つ目は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り判定までに時間がかかることであり、これらの課題

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、飼養豚と野生いのししは、同一の検査室で検査を実施していたことから、交差汚染の危険性があったため、飼養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ながら、それぞれ専用試薬を用いて検査を実施していた。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、捕獲野生いのししの検体採取体制が整備され、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回の検査となった。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、検体を搬入する職員の負担軽減のため、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) 内部精度管理による検査可能な班員の育成

豚熱及びアフリカ豚熱検査は、内部精度管理により、正確性が求められる検査であり、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豚熱及びアフリカ豚熱の遺伝子検査を実施していた。検査頻度が週1回となった令和3年度から抗体検査（ELISA検査）については、内部精度管理を実施した上で、病性鑑定班全員が検査し、豚熱及びアフリカ豚熱の遺伝子検査はウイルス担当が実施する体制に変更した（表1）。

(4) 豚熱及びアフリカ豚熱の遺伝子検査手法の改善

令和2年以前は、豚熱はRNA、アフリカ豚熱はDNAを2種類のキット（RNA抽出キット（High Pure Viral RNA Kit : Roche）及び核酸抽出キット（High Pure Viral Nucleic Acid Kit : Roche））を用いてそれぞれ抽出し、コンベンショナルPCR法を行い、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RNA及びDNAの

両方が抽出可能で、診断に支障がないことを確認したため、1種類のキット（核酸抽出キット）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機種を検討を進め、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：MDrPCR）による検査を開始した。

(5) 検査体制の再構築による効果

野生いのしし専用検査室の整備は、飼養豚及び野生いのしし検査における交差汚染防止に効果的であり、汚染リスクが軽減した。定期的な検体の保冷郵送は、検体の集約化を図れるとともに、検査日程の調整が簡便となった。併せて、多検体処理作業（遠心分離や血清分注等）が可能となった。抗体検査ができる班員を育成したことにより、業務分担が可能となり、併せて、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、核酸抽出時間が令和2年度以前と比較して90分短縮された。本県で導入したMDrPCR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が令和2年度以前と比較して135分短縮された。自動核酸抽出装置及びMDrPCRの導入により、制限酵素処理でコンベンショナルPCRの最終判定まで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法に供する溶血検体の核酸抽出法の検討

MDrPCRでは、粗抽出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ことが報告されている¹⁾。メーカーが推奨する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を用いて希釈を行うとされている²⁾。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(②)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(②～③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MDrPCRにおいて蛍光検出が阻害される可能性があるとして推測された(図2)。このことから、MDrPCR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方法の違いによる影響について比較検討した。

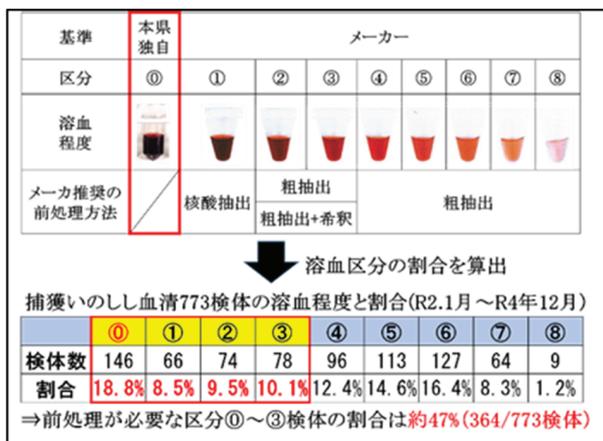


図2 メーカー推奨の前処理と溶血区分及び検体の溶血割合

(1) 材料及び方法

材料は前述の前処理が必要な血清(②～③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(②③区分:24検体(No.12-35))を用いた。核酸抽出は自動核酸抽出,粗抽出,粗抽出後にDWで2倍希釈(希釈法),の3条件でMDrPCRにより比較した。

MDrPCR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。

結果判定は、反応の蛍光シグナルが自動設定の基準線(Threshold Line)と交差したものを陽性とした。検出された遺伝子量が少ないほど、交差するサイクル数(Ct値)は高値を示す。

(2) 結果

豚熱の検査感度は、自動核酸抽出及び粗抽出では100%(35/35検体)であったが、希釈法では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値の平均値は自動核酸抽出では24.3,粗抽出では25.5,希釈法では26.0となり、方法AのCt値が最も低値となった。また、自動核酸抽出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、粗抽出では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、希釈法では1検体(No.13)で蛍光強度の低下が確認された(図3)。

条件	①自動核酸抽出	②粗抽出	③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

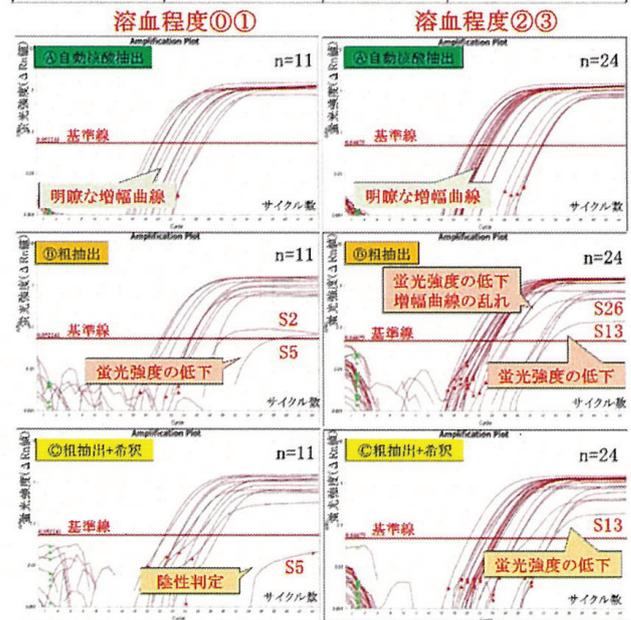


図3 核酸抽出法の比較検討結果

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再構築した。令和3年6月、七ヶ宿町で発見された死亡野生いのししの豚熱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方法の検討では、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つの核酸抽出方法による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。

今回の核酸抽出方法の検討の結果、検査感度、蛍光強度及び増幅曲線の波形から、全ての溶血程度の

区分において自動核酸抽出の実施が最適であると判断した。

当県では今回の検討結果から自動核酸抽出装置を用いたMDrPCR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。

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)
- 2) タカラバイオ株式会社:溶血が確認された血清試料の取扱いについて (CSFV/ASFV Direct RT-qPCR Mix & Primer/Probe (with ROX Reference Dye) 説明書別紙)