

狂犬病検査時の検体採材技術の習熟および狂犬病予防員への研修

木上 照子 小山 雅史 北野 隆一 中山 淳一郎 鳥居 潤 平田 佐知 佐藤 昭司

Practical Training of the Sampling Method for Rabies Diagnosis Given for Rabies-preventive Staffs

Teruko KIGAMI Masashi KOYAMA Ryuichi KITANO
Junichiro NAKAYAMA Jun TORII Sachi HIRATA Shoji SATO

狂犬病が疑われる動物の診断には、その動物の脳のスタンプ標本を用いた蛍光抗体法の検査が行われる。この検査は、脳の摘出・組織の採材までの工程が難しく、かなりの時間がかかる。そのため当所では、特にこの検査技術を習熟するため平成27年4月から11月の間に、犬を検体として、脳の摘出及び組織の採材について重点的に4回実習を行った。平成27年11月には、近畿ブロックの技術研修会を招致することにより、近畿ブロック職員の検査技術の習得・向上を行うと共に、行政間の連携を強化し検査体制の確認を図った。また、平成28年3月には府狂犬病予防員に対して、脳の摘出から組織の採材及び蛍光抗体法までの検査技術の伝達研修を行い、検査体制の強化を図った。

キーワード：狂犬病、脳の採材技術、蛍光抗体法

Keywords：Rabies Virus, Brain Extraction and Sampling Technology, Immunofluorescence

はじめに

狂犬病は、日本において1958年以降、人、動物ともに感染例の報告はないものの、アジアを始め、世界のほとんどの地域で依然として発生しており、日本は常に侵入の脅威にさらされている(厚生労働省健康局結核感染症課、狂犬病<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou10/>)。このような中、50年以上にわたって、日本と同様、狂犬病清浄地域とされてきた台湾において、2013年7月、野生動物(イタチアナグマ)における狂犬病の流行が確認された(農林水産省、台湾における狂犬病の発生についてhttp://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/eisei/rabies/pdf/131111_rabies_taiwan_gaiyo.pdf)。また、現在、日本はペットブームもあり世界中から犬及び猫が多数輸入され(農林水産省、犬等の輸入検疫制度等についてhttp://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/eisei/rabies/pdf/mat_2.pdf)検疫をすり抜けた感染動物の国内持ち込みや、港湾等で輸入資材に紛れた感染動物の上陸等の恐れがあり、狂犬病の侵入の可能性は少なくない。一方、犬の狂犬病ワクチン接種率は平成26年度71.6%であるが(厚生労働省、都道府県別犬の登録頭数と予防注射頭数等(平成21年度～平成26年度<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou10/01.html>))、未登録犬などを勘案した推定接種率は実際の数字よりも低いと考えられ(日本獣医師会 狂犬病対策について http://nichijulin.gr.jp/kousyu/pdf/h22_0401_kyouken.pdf) 狂犬病侵入時における発生拡大防止措置が十分に確保されているとは言えない。

そのため、ヒトへの危害防止に不可欠な狂犬病に罹患した動物を採知するため、地方公共団体においても、動物を対象

とした体系的な検査体制の構築が急務となっている。

本府では、平成19年6月に「京都府狂犬病対応マニュアル」を策定し、狂犬病発生時に備えた行政対応や検査体制を定めており、狂犬病の検査は、本症を疑う動物の脳組織(延髄、橋、小脳、視床、海馬)のスタンプ標本を用いて蛍光抗体法の検査結果をもって判定することとされている。

当所では、これまでから狂犬病を否定できない犬や野生動物の脳の摘出・組織の採材を行いその検査を実施してきた。しかし、対象事例が少ないことや、人事異動により検査の実践技術の継承が困難な状況となっていることから、狂犬病検査時の脳の摘出・組織の採材技術の習熟を図るための研修が必要と考え企画し、同時に蛍光抗体法の手技についても確認した。また、厚生労働省等主催による近畿ブロック自治体職員の技術習得と行政間の連携強化を図ることを目的とした技術研修会、保健所等本府の狂犬病予防員に対する伝達研修を行ったので、併せて報告する。

材料と方法

1. 材料

平成27年3月から平成28年3月の間に京都動物愛護センターに収容された犬のうち、死亡し凍結保存されていた11頭の犬をあらかじめ解凍し、検体として用いた。その内、5頭は当所職員の研修に、3頭は近畿ブロックの技術研修会に、3頭は府狂犬病予防員の伝達研修に供した。

解剖を行うにあたり、そのモデルとして国が各地方ブロックに配布している脳モデル及び解剖手技・骨切断モデルセット((株)モルフォバイオイメージング研究所販売)を使用した。また、犬の頭蓋骨と比較するために、野生動物(アナグマ、アライグマ等)の頭蓋骨標本も参考にした。

蛍光抗体法は検査用抗体としてFITC Anti-Rabies Monoclonal Globulin (Fujirebio Diagnostics, Inc. 201

(平成28年9月30日受理)

Great Valley Parkway Malvern, PA 19355 U.S.A.)を用い、陽性コントロールとして国立感染症研究所から配布された塗抹凍結スライド標本を使用した。

2. 方法

2-1. 実習の内容

実習の内容は、表1内に記入。

2-2. 検査方法

脳の摘出・組織の採材及び蛍光抗体法は、「狂犬病対応ガイドライン2001」¹⁾、「我が国における動物の狂犬病モニタリング調査手法における緊急研究」²⁾及び「国立感染症研究所病原体検出マニュアル(狂犬病検査マニュアル)」³⁾に準じた(表2)。

また、脳の簡易採取法として、高橋⁴⁾の方法に準じた摘出手技の確認も試みた。

また、ウイルス検出のための蛍光抗体法は、脳組織の採材後約2時間半で結果判定が可能であった。脳の一部は遺伝子検査を実施することを想定し、別途各組織を採材し凍結保存した。脳の摘出・組織の採材手技以外にも重点的に防御衣の脱着等感染防御面での研修を行った。

脳の簡易採取法を2回試み、犬の断頭から頭蓋骨穿孔、水の注入までは約10分程度で実施できたが、大後頭孔からは水のみが排出されただけで、脳の摘出には至らなかった。

2. 近畿ブロック自治体職員を対象とした技術研修会

本技術研修会は、厚生労働省・国立感染症研究所の主催で、本府にて行われたものであるが、近畿ブロックの地方衛生研究所・保健所等から24人の参加があった。犬の脳の摘出・組織採材(講義及び研修)に加えて、野生動物における狂犬病の発生に備えて、それら野生動物の頭蓋骨標本の確認を行った。蛍光抗体法の検査技術(講義)の研修を行い、さらに行政間の検査技術共有、情報交換なども行った。(表3)

結果

1. 当所職員を対象とした研修

平成27年4月から11月にかけて計4回、5頭の犬を対象として、当所職員複数名で脳の摘出・組織の採材技術の研修を重ねた。(表3)

犬の保定から脳組織のスタンプ標本の作製までの時間は、初回は、中型犬で約1時間10分を要していたが、研修を重ねたところ、50分以内で実施できるようになった。しかし、大型犬や前頭洞の大きい犬は、頭蓋骨が厚く、切除する部分が多いこともあり、切除に要する時間が長くなる傾向にあった。

3. 府狂犬病予防員を対象とした伝達研修

府狂犬病予防員6人に対して、国の狂犬病対応ガイドラインや府狂犬病対応マニュアルの講義を行い、感染防御対策、検体の確保、輸送、脳の摘出・組織採材を中心に、蛍光抗体法による陽性コントロールの確認までの一連の検査の流れを伝達研修した。脳の摘出・組織採材については、脳モデル及び解剖手技・骨切断モデルセットを用いた十分な事前講義を行なったうえで研修を行い、未経験者でも50分以内で安全に脳の摘出・組織採材・蛍光抗体法のためのスタンプ標本作製することができた。(表3)

表1. 研修内容

	講義	研修
当所職員研修		<ul style="list-style-type: none"> ・脳の摘出及び組織採材手技の研修 ・蛍光抗体法の研修 ・感染防御のための衣服の脱着及び器具、検体、廃棄物の取り扱い ・簡易採取法の試行
近畿ブロック技術研修	<ul style="list-style-type: none"> ・国狂犬病対応ガイドライン等に基づいた注意点等について ・解剖に使用する器具や材料に関する廃棄方法等について ・个人防护、解剖及び脳の採材時における感染防御対策について ・野生動物の頭蓋骨標本を用いた講義 ・蛍光抗体法の手技のデモンストレーション(机上) ・徳島県における狂犬病予防対策と中四国全域での取り組みについて ・「水出し法」による脳摘出について(東京都) 	<ul style="list-style-type: none"> ・脳モデル等による採材手技の研修 ・脳の摘出及び組織採材手技の研修 ・蛍光抗体法の固定までの研修 ・陽性コントロールの蛍光確認
狂犬病予防員伝達研修	<ul style="list-style-type: none"> ・国狂犬病対応ガイドライン等に基づいた注意点等について ・个人防护・解剖及び脳の採材時における感染防御対策について ・脳モデル等を使用した脳の摘出方法について ・蛍光抗体法の手技のデモンストレーション(机上) 	<ul style="list-style-type: none"> ・脳の摘出及び組織採材手技の研修 ・蛍光抗体法の固定までの研修 ・陽性コントロールの蛍光確認 ・感染防御のための衣服の脱着及び器具、検体、廃棄物の取り扱い

表2. 解剖及び脳組織採材手順

検査準備	
<ol style="list-style-type: none"> 1. 解剖場及び検査器具準備、消毒槽及び廃棄物容器準備、 2. 防御衣の着用 3. 検体の準備 殺虫剤塗布による外部寄生虫対策、被毛を消毒薬でぬらす、保定 	
解剖及び脳組織採材方法の流れ	
<ol style="list-style-type: none"> 1. 剥皮（鼻孔付近から肩甲骨付近まで正中に沿って剥皮） 2. 頭蓋骨に付着する筋肉の除去 3. 頭蓋骨上部の切除 眼窩上部から 横静脈洞管付近を結ぶ線で頭頂骨にのこぎりで深く切り込みを入れ、上部をのみで割りながら切り取る 4. 脳の摘出 <ol style="list-style-type: none"> 1) 後頭骨と頸椎の間に垂直にメスを入れ脳と脊髄を切離す。 2) スパーテルで神経や血管をはがしながら、頭部前方から後方へ脳を摘出する。 5. 各部の採材（延髄、橋、小脳、視床、海馬） <ol style="list-style-type: none"> 1) 脳の位置を確認する。 2) 頭頂部を上にして置き、大脳の先方から2/3を頭部平行に切開すると海馬が確認できる。 3) 海馬を採材すると視床が現れる。これを採材。 4) 脳底部を上にしておき、小脳、延髄、橋を採材。 5) PCR用保管材料、塗抹材料の切り出し 	
解剖の後処理	
<ol style="list-style-type: none"> 1. 解剖器具の消毒洗浄、場所の洗浄消毒処理 2. 廃棄物の処理 3. 防御衣の脱衣, 廃棄 	

表3. 研修の材料及び結果

	実施日 (2015年度)	犬の特徴			参加者 (人)	脳摘出 所要時間	組織の 採材時間	蛍光抗体法(固定から 判定まで約2時間半)
		種類	色	大きさ				
当 所 職 員 研 修	4月10日	雑	茶	中	3	50分	20分	固定まで実施
	6月8日	雑	白	大	2	45分	15分	固定まで実施
	7月28日	雑	茶	中	6	45分	15分	通して実施（以前の検体含む）、陽性コントロール等 蛍光確認
	11月4日	パピヨン	白	小	2	30分	10分	固定まで実施
	雑	茶	中	35分		10分		
近 畿 ブ ロ ッ ク 技 術 研 修	11月17日	雑	茶	中	24			講師が参加者に解剖をさせながら採材手技を解説したのち、その後2班に別れて研修を実施。蛍光抗体法は机上実習の上、陽性コントロールの蛍光を観察。
	雑	茶	中					
	雑	白	中					
狂 犬 病 予 防 員 研 修	3月16日	雑	茶	中	7			講師が参加者に解剖をさせながら採材手技を解説したのち、その後2班に別れて研修を実施。蛍光抗体法は机上実習の上、陽性コントロールの蛍光を観察。
	雑	茶	中					
	ダックス フンド	黒	小					

考察

狂犬病の検査時には、検体の脳の摘出・組織採材までの工程が難しく、かなりの時間がかかる。このような研修を行い、職員がその知識・技術を習得していくことが、工程時間の短縮に結びつき、速やかに採材した脳組織のスタンプ標本作成、蛍光抗体法まで行うことができた。脳の摘出の中でも、特に剥皮から頭蓋骨を切開するまでが一番時間を要するが、摘出技術の習熟度はもとより、犬の大きさ、犬種による頭部の形状で要する時間に差異が認められ、大型犬、前頭洞の大きい犬ではより時間を要することが判明し、今後、脳の摘出を行う上で参考になった。脳の簡易採取法の試行では、脳の摘出に至らず、手技の確認のみとなった。脳の簡易採取法は新鮮な検体でないといふことが困難であるとの情報もあり、今回は凍結検体を使用したため、摘出に至らなかったと判断された。この方法は手技が簡易で、脳の摘出も短時間で完了できるため、今後新鮮な検体を入手し、確認しておく必要があると思われた。

近畿ブロック自治体職員を対象とする技術研修会は、検査技術の習得のみならず、各自治体の現状や最新知見の情報を得ることができた。意見交換の場では、各自治体の検査担当部署にほとんど犬の解剖を経験した職員がおらず、今回初めて解剖を経験し、有意義であったとの感想が多く出された。また、自治体によっては検体入手が困難であるとの理由から検査実習ができない現状も浮かび上がった。これらのことから、国や他の自治体との協力が必要であると考えられ、今回のような研修が各自治体間の連携体制構築に必要であると考えられた。また、野生動物の頭蓋骨標本を研修資料として確認できたことは、野生動物の脳の摘出手技を行う際に極めて重要な参考になると考えられた。

府狂犬病予防員を対象とした伝達研修では、脳の摘出から組織採材までの工程を、未経験者でも比較的時間に無駄なく行うことができた。これは、参加者が研修前の講義にて頭部の脳モデル及び解剖手技・骨切断モデルセットでシミュレーションし、十分な予備知識を得た上で実技研修を行ったことによると考えられた。また、国の狂犬病対応ガイドライン等の講義を含めた総合的な研修によって、参加者は狂犬病発生

時の危機管理意識が喚起され、適正な対応について理解を深めることができたと考えられた。

以上のことから、当所職員、近畿ブロック自治体職員、府狂犬病予防員が、脳の摘出・組織の採材技術の研修を重ねることによってその技術を習熟し、その後、伝達・承継することで、狂犬病発生時の速やかな検査体制を構築することができると考えられた。

また、狂犬病がいつ発生してもおかしくない現在、狂犬病発生時に備えた、脳の摘出・組織採材に用いる資材および人材の確保など体制作りの必要性が再認識でき、そのためにも、本庁生活衛生課、府保健所、当所及び京都動物愛護センター、並びに国、他自治体との更なる連携・協力が必要であると考えられた。

一方、「府狂犬病対応マニュアル」では、当所において脳の摘出・組織採材及び蛍光抗体法によるウイルス検査を行うことになっているが、府狂犬病予防員等に対して、このような研修の機会を継続するとともに、本府として狂犬病発生時に対する検査体制を強化するためにも当該マニュアルを見直すことが必要である。

謝辞

研修にあたり、助言をいただきました国立感染症研究井上智先生、検体を確保・提供していただきました京都府動物愛護センター職員一同に深謝します。

引用文献

- 1) 厚生労働省健康局結核感染症課. 狂犬病対応ガイドライン2001 (第1版第1刷)
- 2) 井上智. 2014年3月. 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: 平成25年度総括研究報告書: 厚生労働科学研究費補助金(厚生労働科学特別研究事業), 95-175
- 3) 国立感染症研究所病原体検出マニュアル. 2012. 狂犬病検査マニュアル(第2版)
- 4) 高橋栄一. 2015. 犬の狂犬病確定診断における検体の簡易採取法「水出し法」の検討. 獣医公衆衛生研究, 17-2, 30-32