

輸入稲わら梱包中心部に挿入した アフトウイルス属牛鼻炎Bウイルスの加湿加熱による不活化実験

蒔田 浩平^{1)*}・能田 淳²⁾・桐澤 力雄³⁾

An inactivation experiment of genus Aphanthovirus bovine rhinitis B virus inserted in the central part of an imported straw bale to Japan by heat and humidity treatment

Kohei MAKITA^{1)*}, Jun NODA²⁾ and Rikio KIRISAWA³⁾
(Accepted 17 July 2012)

1. 緒 言

2010年4月に宮崎県で発生した口蹄疫は爆発的に感染が拡大し、感染が確認された農家は292戸に及んだ。疾病制御のためワクチンが使用され、ワクチン接種動物も淘汰されたため、終息までの3か月間に1,362戸で飼養されていた約30万頭もの家畜が殺処分された^[1,2]。本発生における我が国への口蹄疫ウイルス侵入経路は未だ確定されておらず、現在も疫学解析が継続してなされているところである。

肉用牛飼育における稲わらの使用は、もともと米作で人の主食である米を収穫した後の副産物を家畜生産に利用する効率的な循環型農業の重要な一部であった。しかしながら、集落内で労働力を提供しあう伝統的作業形態が崩れ、作業の機械化が進んだことから、稲わらは収穫時に田内で裁断され、その代わりに家畜飼料として安価な輸入稲わらが利用されるようになった。

この輸入稲わらは、輸入前に日本政府が定める条件を満たし許可された工場加熱処理される。その条件とは、過去3年以内に50 km圏内で口蹄疫、牛疫、アフリカ豚コレラの発生がない場所で生産、加工、保管されたものであり、偶蹄類由来の排泄物などで汚染されておらず、湿熱で80度、10分間処理されたものである^[3]。

しかし稲わらは、多くの国で屋根や防寒具などに伝統的に利用されてきたことから分かるように、優

れた断熱性、保温性を有する。このため湿熱処理がどれほど確実に深部へ到達するのか客観的データが提示されることが望まれる。口蹄疫の発生した宮崎県では、経営再開を果たした農家で引き続き輸入稲わらの利用を継続しており、地域獣医師の中ではそのことによる口蹄疫侵入のリスクが懸念されている^[4]。国家を守る上では稲わら輸入による口蹄疫侵入リスクは常にゼロではない^[5]ことを認識しておくことは不可欠である。具体的には、リスクを低減させる高圧蒸気滅菌器の故障や不適切な使用、監視の漏れなどのエラーの他に、不法な方法による輸入がもたらす我が国への検知しえない口蹄疫ウイルスの侵入についても想定しておくべきである。本研究では、高圧蒸気滅菌器の劣化などを想定した圧力扉閉鎖不全による一気圧の状態、口蹄疫ウイルスに汚染された中国産輸入稲わら梱包を外気温80℃で加湿加熱処理し輸入した場合の口蹄疫侵入リスクを検証するため、口蹄疫ウイルスと同属の牛鼻炎Bウイルス^[6]を用いて不活化実験を実施した。

2. 材料と方法

中国産輸入稲わら

苫小牧港に海路で輸送された稲わら梱包を、港付近にある防疫処理会社でホルマリン燻蒸し一か月以上経過したものを実験に用いた。梱包のサイズは、重量約20 kg、75×45×25 cmであった。

¹⁾ 酪農学園大学獣医学群獣医学類獣疫学

Veterinary Epidemiology Unit, Department of Veterinary Medicine, School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University, 582 Bunkyo-dai Midorimachi, Ebetsu, Japan

²⁾ 酪農学園大学獣医学群獣医学類環境衛生学

Environmental Health Science Unit, Department of Veterinary Medicine, School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University

³⁾ 酪農学園大学獣医学群獣医学類獣疫ウイルス学

Veterinary Virology Unit, Department of Veterinary Medicine, School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University

* Corresponding author

ウイルス

本実験には、ピコルナウイルス科アフトウイルス属の牛鼻炎Bウイルス(旧:牛ライノウイルス2型)を用いた。

加温実験

2011年の夏季に稲わらの加温実験を実施した。まず、稲わら梱包の側面から、ドリルにて直径1.5 cmの穴を中心部まで開け、ウイルス液の入った密封バイアルの底にサーミスタ温度センサーを設置し、穴の深部まで挿入した。バイアルの蓋にはテグスを結び付け、簡単に引き出せるように一端を穴の外部に露出させ、ドリルによって削れた稲わらを用いて穴を塞いだ。温度センサーによって測定された温度は、穴から外部に出された導線を通してデータロガーに記録された。稲わらは密封可能な耐熱性ビニール袋に入れ、袋内に稲わら深部温度を記録するデータロガーと共に、稲わら外部気温および湿度を継続的にモニタリングする目的で、独立したデータロガーを別途設置した。

2気圧に高められた小型高压蒸気滅菌器内の蒸気を用いてビニール内に高温の蒸気を満たした後、速やかに別室にある密閉式加温器に移動し、加温器内の温度を80℃に保持した。加温器に入れてから10分後、20分後、そして90分後にビニール袋の一部を開封し、テグスを引いてウイルスの入ったバイアルを回収し、ビニール袋は再び封をした。回収したバイアルは速やかに研究室内に移動してバイアル内ウイルス液の力価を測定した。また、ウイルス不活化に必要な温度を調べる目的で、異なる気温に10分間曝露させた後のウイルス力価を測定した。

3. 結果

外部温度および湿度の変化

稲わら表面温度は、高温の蒸気をビニール袋内に入れた温度計測開始後35分から急速に上昇し、一旦58.5℃まで上昇した後、40分で加温器に入れられるまでに49℃まで下がり、その後55分後に70℃を超えた(Fig. 1)。実験開始前80℃に表示されていた加温器内部気温は、稲わら搬入後2分以内に80℃に戻ったが、ビニール内の稲わら表面温度は緩やかに上昇を続け、6時間後に77℃に達した。

湿度は、蒸気注入後一時計測不能になったが、蒸気注入後35分後に計測を再開した。ビニール内の湿度は、バイアルを回収するためビニールを数回開封したこと、また稲わらに吸収されたことから、高湿度は保たれなかった。

稲わら梱包深部温度の変化

温度計測開始後35分でビニール内に高温蒸気が注入された後、稲わらの深部温度は非常に緩やかに上昇した。深部温度が60℃に到達するには、稲わらを加温器に入れた後5時間47分を要した(Fig. 2)。

ウイルス力価の変化

Table 1に、稲わら梱包内深部に設置された牛鼻炎Bウイルス液の加温下での力価の変化を示す。ウイルス力価は、90分間稲わら梱包を加温した後も変化がなく、不活化されなかった。

また、牛鼻炎Bウイルスの温度抵抗性を調べるため、異なる温度にウイルス液を10分間曝露させた後、ウイルス力価を測定した(表2)。牛鼻炎Bウイルスは、50℃に10分間曝露しても、力価は37℃に10分間曝露したものより低かったが不活化には至らなかった。60℃以上の温度(60℃, 70℃, 80℃)に10

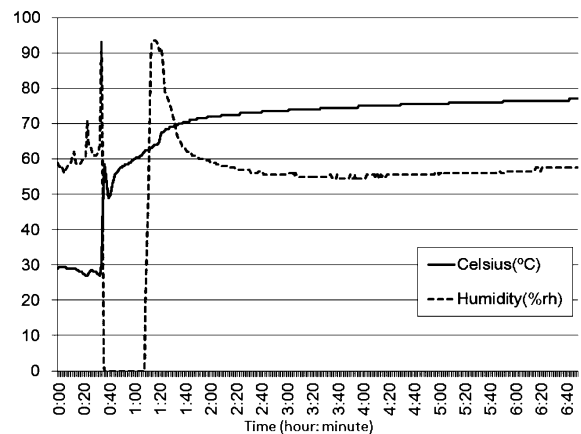


Fig. 1 Temporal variation of the temperature and humidity on the surface of the straw bale during the experiment

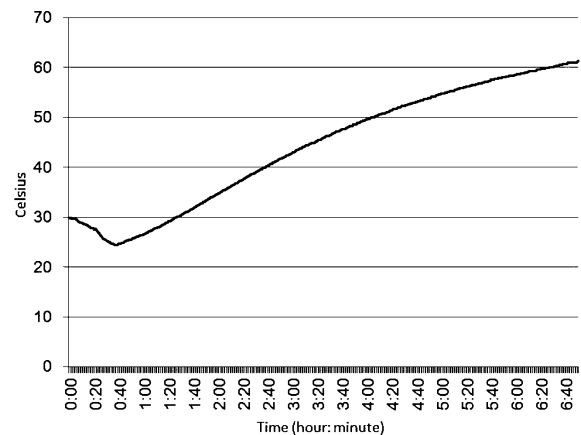


Fig. 2 Temporal variation of the temperature of the central part of the straw bale during the experiment

Table 1 Temporal variation of the titer of bovine rhinitis B virus due to the heat treatment of the straw bale

| Time heated (minutes) | Titer |
|-----------------------|---|
| Control | 10 ^{3.75} TCID ₅₀ /30ul |
| 10 | 10 ^{3.25} TCID ₅₀ /30ul |
| 20 | 10 ^{3.25} TCID ₅₀ /30ul |
| 90 | 10 ^{3.75} TCID ₅₀ /30ul |

分間曝露した後では、全ての温度で不活化された。

4. 考 察

本実験は、口蹄疫ウイルスと同属の牛鼻炎Bウイルスを用いて、口蹄疫ウイルスに汚染された稲わら梱包が、加圧機能が失われた高圧蒸気滅菌器で処理され輸入されることによる日本国内へのウイルス侵入リスクを調べる目的で実施された。80℃の加温器内において加熱を続けた場合、稲わら梱包深部温度は短時間では上がらず、4時間放置しても50℃に達する程度に留まるので、梱包中心部に口蹄疫ウイルスが存在する場合、ウイルスが不活化されないことが示唆された。また加温器上部に設置された温度計が80℃を示していたにもかかわらず、密閉されたビニール袋内にあったとはいえ、稲わら梱包表面の温度が加温器の温度計が示す温度には達しなかったという結果から、加温器外部と中心部では、温度が一定でないことが示唆された。我が国と中国との稲わら輸入に関する二国間協定の文書を参照すると、14動検第821号第4項^[3]では、「Straw and forage must be subjected to the action of steam for at least 10 minutes and at a minimum temperature of 80℃ in an air-tight chamber」、仮訳で「わら及び乾草は、湿熱80度以上で10分以上加熱処理されていること」と記載されており、これにはOIEのTerrestrial Animal Health Code^[7]に記載されている、わら及び乾草の中心部が80℃以上に10分以上保たれること、という条件にあるような、指標部位の説明が正確に表現されていない。現行の表現では稲わら梱包表面の温度とも解釈することが出来、その場合中心部を加熱するのに必要不可欠な高圧蒸気滅菌を施さずとも可能であるため、誤解を産みやすい文章となっている。さらに上記のように、加熱室内中心部の温度は加熱室内壁部の温度より低くなるのが予想されるため、消毒の実施に際しての注意が一層必要である。今後、本文書については、条項の明確化を行うことが必要ではないかと考えられ

Table 2 Titer of bovine rhinitis B virus after exposing different temperature for 10 minutes

| Temperature (°C) | Titer |
|------------------|--|
| Control | 10 ^{3.5} TCID ₅₀ /30ul |
| 37 | 10 ^{3.5} TCID ₅₀ /30ul |
| 50 | 10 ^{2.75} TCID ₅₀ /30ul |
| 60 | <10 ^{-0.5} TCID ₅₀ /30ul |
| 70 | <10 ^{-0.5} TCID ₅₀ /30ul |
| 80 | <10 ^{-0.5} TCID ₅₀ /30ul |

た。

本実験で観察されたように、稲わらは非常に耐熱性が強く、蒸気の下でも中心部を容易に高温にすることが出来ない。このことから、様々な条件下で湿熱処理した際の、稲わら梱包中心部の詳細な温度計測実験およびウイルス不活化試験の実施による科学的データの蓄積が望まれる。また、国民の口蹄疫侵入に対する不安を低減するリスクコミュニケーションのため、口蹄疫の発生が見られる稲わら生産国で稲わら消毒を実施している設備と状態の確認に関する情報、および高圧加熱下の稲わら中心部温度の推移、処理時間、ウイルス不活化実験などの科学的データも開示する必要があるのではないかと考えられた。また、大学や民間の学術機関も参加した、透明性のあるリスク評価が行われることは、我が国のリスク管理に大いに役立つと考えられる。

我が国は2011年3月11日に東日本大震災を経験し、福島第一原子力発電所の事故により、東北、関東および北関東の広大な草地在放射能で汚染されてしまった^[8]。これにより、反芻獣の粗飼料はさらに不足し輸入を増加させなければならないのは明らかである。今後は、コストは掛かっても、現在田に鋤き込まれているような国内の貴重な家畜粗飼料源を回収し、家畜飼料として活用すべきである。また耕作放棄田などでの家畜飼料稲増産などによる農業形態の転換により、国内での家畜飼料自給率を向上させることが早急に望まれる。このようなコストの計算には、口蹄疫ウイルスの侵入があった場合のコストも組み入れて検討するべきであると考えられた。

5. 謝 辞

本研究は、2011年度酪農学園大学学内共同研究採択No.5「宮崎県口蹄疫被災農家と獣医師の癒しと再出発を助ける疫学研究」の助成により実施された。

本研究を計画・遂行するに当たり、酪農学園大学農食環境学群循環農学類家畜栄養学の野英二教授と泉賢一准教授には、稲わら中心部にバイアルを設置する方法の確立および高圧蒸気滅菌器を用いたビ

ニール内高温蒸気注入に際し御教授、御助言頂いたことについて、心より深謝いたします。また、本加熱実験の実施を快く許可して下さった付属農場職員の皆様にも、感謝申し上げます。

6. 参考文献

1. 筒井俊之, 早山陽子. 2010. 2010年に宮崎県で発生した口蹄疫について: 2000年の発生との比較から. 獣医疫学雑誌 14: 148-153.
2. 宮崎県農政水産部畜産・口蹄疫復興対策局. 2012. 宮崎県における口蹄疫の発生経過とその後の方策. 国際シンポジウム「国境なき家畜伝染病防疫対策の取り組み」資料. 2012年1月20日.
3. 動物検疫所. 2012. Animal health requirements for straw and forage for feeding to be exported to Japan from the People's Republic of China. 中華人民共和国から日本向けに輸出される穀物のわら及び飼料用の乾草の家畜衛生条件 (仮訳) 平成14年12月16日付け14動検第821号 [<http://www.maff.go.jp/aqs/tetuzuki/product/87.html>], 2012年6月13日アクセス.
4. 蒔田浩平, 辻 厚史, 壺岐佳浩, 牛島留理, 芳賀 猛, 末吉益雄. 2012. 地域獣医師による2010年宮崎口蹄疫の侵入および発生拡大に関連した要因. 畜産の研究 66(6): 599-604.
5. Australian Government Department of Agriculture, Fisheries and Forestry. 2009. Import Risk Analysis 2007 (update 2009). Canberra.
6. Hollister J, Vagnozzi A, Knowles NJ, Rieder E. 2008. Molecular and phylogenetic analyses of bovine rhinovirus type 2 show it is closely related to foot-and-mouth disease virus. *Virology* 373: 411-425.
7. OIE. 2011. For straw and forage, recommendations for importation from FMD infected countries or zones. Article 8.5.31. FMD, OIE Terrestrial Animal Health Code 2011.
8. 文部科学省. 2012. 放射線モニタリング情報, 放射線量等分布マップ (土壌濃度マップ等). [<http://radioactivity.mext.go.jp/ja/list/338/list-1.html>], 2012年6月13日アクセス.

7. 要 約

2010年4月, 日本は宮崎県にて口蹄疫の発生を経験し, 疾病制御のために約30万頭もの動物の命が犠牲となった。日本は口蹄疫発生国を含む諸外国より粗飼料を輸入しているため, 本研究は高圧蒸気滅菌器の機械的故障が起きた時の口蹄疫侵入リスクを理解するために実施された。

口蹄疫ウイルスと同じ属に属する牛鼻炎Bウイルスを入れた3本のバイアルを, そのうち1本に温度センサーを取り付け輸入稲わら梱包中心部に挿入した。密閉した耐熱性ビニール袋に稲わら梱包を入れ蒸気で満たし, 加温器の中に設置した。加温器内を80℃に保持し, データロガーを用いて設置したバイアルと稲わら梱包表面の温度を記録した。加温開始から10分, 20分, 90分後に稲わら梱包から1本ずつバイアルを取り出し, ウイルス力価を測定した。さらに追加実験で, ウイルス液を37, 50, 60, 70および80℃の異なる温度に10分間曝露し, ウイルス力価を測定した。

加温器への設置後, 梱包表面温度は70℃を越えるのに55分間を要し, 開始から6時間後に77℃に到達するまで徐々に上昇した。梱包中心部温度は緩やかに上昇し, 口蹄疫ウイルスを不活化させるのに十分である60℃に上昇するには5時間47分かかった。ウイルスの加熱実験では50℃で対照 ($10^{3.5}$ TCID₅₀/30 ul) よりわずかに力価が減少し ($10^{2.75}$), 60℃で不活化された。

本研究により, 高圧蒸気滅菌器の機械的エラーによる口蹄疫侵入のリスクが示された。日本は国内で粗飼料を生産する農業システムへの転換を急ぐべきであると考えられた。

Summary

In April 2010, Japan experienced the foot-and-mouth disease (FMD) outbreak in Miyazaki Prefecture and almost 300 thousands animals were culled in order to control the disease. Japan imports forage from foreign countries including FMD endemic countries and the present study was conducted to understand the risk of FMD introduction through a mechanical failure of a high-pressure steam sterilizer.

Three vials containing bovine rhinitis B virus, which belong to the same genus with FMD virus, of which a thermal sensor was attached to a vial, were inserted to the central part of an imported straw bale. A closed heat-resistance and steam-filled plastic bag containing the bale was located in a heating chamber. It was kept at 80 degrees Celsius and the temperatures of the vials and the bale surface were recorded using

data loggers. After 10, 20 and 90 minutes of heating, one vial each was recovered from the bale and the virus titers were measured. In a separate experiment, vials containing the virus were exposed to different temperatures: 37, 50, 60, 70 and 80 degrees for 10 minutes and the titers were measured.

It took 55 minutes that the temperature on the surface of the bale exceeded 70 degrees after placing the bale into the heating chamber and the temperature gradually increased to 77 degrees at six hours after the start. The temperature of the central part of the bale showed a slow increase and it took 5 hours 47 minutes to reach 60 degrees, which is enough to inactivate FMD virus. Heat treatment slightly decreased the titer at 50 degrees ($10^{2.75}$ TCID₅₀/30ul) from control ($10^{3.5}$) and inactivated at 60 degrees.

The present study demonstrated the risk of FMD introduction through a mechanical failure of a high-pressure steam sterilizer. Japan should urge restructuring agricultural systems to produce forage within the country.