

豚コレラに関する特定家畜伝染病防疫指針に基づく発生予防及びまん延防止措置の実施に当たっての留意事項について

(平成 30 年 10 月 31 日付け 30 消安第 3571 号農林水産省消費・安全局長通知)

第 1 野生動物対策に係る連携・協力体制の整備

特に発生時には、野生いのししを介したウイルスの拡散防止対策及び野生いのししにおけるウイルスの浸潤状況の確認を的確に実施する必要があることから、平時から、野生いのししにおける家畜の伝染性疾病の病原体の感染状況の調査等の取組も通じ、都道府県の家畜衛生担当部局及び野生生物担当部局等を含む行政機関、関係団体との間の連携・協力体制の整備に努める。

第 2 畜産物を含む食品残さの適切な処理

偶蹄類の肉及び肉製品を含み、又は含む可能性がある食品残さの処理は、次に掲げるいずれかの方法による。ただし、当該食品残さの原材料が既に同等の条件で処理され、その後、汚染のおそれのない工程を経て給与されていることが確認される場合には、この限りでない。

- 1 70℃、30 分以上の加熱処理
- 2 80℃、3 分以上の加熱処理

第 3 抗体保有状況調査

家畜改良増殖法（昭和 25 年法律第 209 号）第 4 条第 1 項の規定に基づく種畜検査が実施される豚以外の豚等（豚及びいのししをいう。以下同じ。）について実施する抗体保有状況調査は、以下を参考に年間の調査頭数を計画し、定期的に調査を実施する。

- 1 調査対象となる豚等は、畜産物を含む食品残さを給与されている豚等及びワクチン接種履歴のある豚等と同居している豚等をはじめとする全ての豚等とし、調査農場及び調査対象となる豚等は、無作為に抽出する。
- 2 95%の信頼度で 5%の感染を摘発できる数については、次に掲げる表により年間の抽出戸数を決定する。

都道府県内農場戸数	抽出戸数
1～18 戸	全戸
19～25 戸	19 戸
26～34 戸	26 戸
35～49 戸	35 戸
50～100 戸	45 戸
101 戸以上	55 戸

- 3 採材を行う豚等の頭数の決定に当たっては、各家畜保健衛生所が管轄する区域内の農場等豚等を飼養している施設の戸数に応じて家畜保健衛生所ごとに抽出戸数を定め、

1 施設当たりそれぞれ 10 頭を無作為に抽出する。なお、10 頭以下の飼養規模の施設の場合には、全頭を採材の対象とする。

- 4 採血する際は、後日、採血した個体が識別できるように、当該豚等をスプレーでマークする等の措置を講じる。

第4 種豚の抗体保有状況調査

種豚の抗体保有状況調査において、種畜検査が実施される豚については、当該種畜検査で実施された抗体検査の結果に代えても差し支えない。

第5 病性鑑定材料を用いた調査における検査方法

豚等の病性鑑定材料を用いた調査における検査方法は以下のとおりとし、実施に当たっては、別紙1「豚コレラの診断マニュアル」を参考とする。

- 1 抗原検査
ウイルス分離、PCR 検査及び蛍光抗体法
- 2 血清抗体検査
エライザ法又は中和試験

第6 異常豚の届出を受けた際の報告

都道府県畜産主務課から農林水産省消費・安全局動物衛生課（以下「動物衛生課」という。）への報告は、別記様式1による。

第7 家畜防疫員が現地に携行する用具

- 1 農場立入用衣類
長靴、防疫衣類、手袋、シューズカバー、メディカルキャップ、防塵マスク等
- 2 臨床検査用器材
体温計、保定用具（ワイヤー、ロープ等）、白布（消毒薬に浸し、その上に3の器材を置くために用いる。）、鎮静剤、懐中電灯等
- 3 病性鑑定材料採取用器材
採材用器具（解剖器具、採血器具（採血針、採血管、採血ホルダー等））、アルコール綿、保冷資材、クーラーボックス、病性鑑定材料輸送箱、カラスプレー、ビニールシート等
- 4 連絡及び記録用器材
携帯電話、事務用具、各種様式用紙、地図、防水デジタルカメラ、画像送受信機等
- 5 消毒用器材
バケツ、消毒薬、噴霧消毒器等
- 6 その他
ガムテープ、ビニールテープ、カッター、ハサミ、ビニール袋、着替え、食料品等

第8 都道府県が行う指導に関する事項

1 豚等の所有者から届出があった場合

- (1) 豚等以外の動物を含む全ての動物について、当該農場からの移動を自粛すること。
- (2) 当該農場の排水については、適切な消毒措置を講ずるまでの間、活性汚泥槽などで適切に浄化処理されている場合を除き、可能な限り流出しないようにすること。
- (3) 農場の出入口を原則1か所に限り、農場及び防疫関係者以外の者の立入りをさせないこと。
- (4) 農場外に物を搬出しないこと。豚等の所有者及び従業員等が外出する場合には、適切な消毒等を行うこと。
- (5) 症状が確認された豚等（以下「異常豚」という。）及び当該異常豚の精液等の生産物、排せつ物、敷料等は、他の豚等と接触することがないようにすること。

2 獣医師から届出があった場合

- (1) 原則として、家畜防疫員の現地到着まで当該農場にとどまり、1の(1)から(5)までの豚コレラウイルスの拡散防止に関する指導をすること。
- (2) 家畜防疫員の到着後、当該農場を出る際には、身体のほか、衣服、靴、眼鏡その他の携行用具の消毒及び車両の消毒を行い、直ちに帰宅すること。
- (3) 帰宅後は、車両を十分に洗浄するとともに、入浴して身体を十分に洗うこと。
- (4) 異常豚が患畜又は疑似患畜でないと判定されるまでの間は、豚等の飼養施設に立ち入らないこと。
- (5) 豚コレラと判明した場合には、異常豚を診察し、又はその死体を検案した日から7日間は、豚等の飼養施設（当該農場を除く。）に立ち入らないこと。

3 家畜市場から届出があった場合

- (1) 豚等の移動を自粛するとともに、必要に応じて当該家畜市場に出入りする関係者に情報提供すること。
- (2) 畜産関係車両の入場を自粛すること。また、出場する畜産関係車両について、消毒を徹底するとともに、異常豚が患畜又は疑似患畜でないと判定されるまでの間は、豚等の飼養施設に出入りさせないこと。
- (3) 従業員等（異常豚の届出時に家畜市場に入場していた全ての者をいう。以下(4)において同じ。）が場外に移動する際には、身体及び車両に対し適切な消毒等を行うこと。
- (4) 従業員等及び(1)の情報提供を受けた者のうち異常豚の搬入日以降に当該家畜市場に入場した者（以下「市場入場者」という。）は、異常豚が豚コレラの患畜又は疑似患畜でないと判定されるまでの間は、豚等の飼養施設に立ち入らないこと。
- (5) 異常豚の所有者を直ちに特定し、十分な消毒を行った上で、直ちに帰宅するよう指導するとともに、1の(1)から(5)までの助言及び指導を行うこと。
- (6) 異常豚の出荷に使用された車両及び運転手を特定し、消毒を徹底するとともに、異常豚が患畜又は疑似患畜でないと判定されるまでの間は、豚等の飼養施設（異常豚出荷農場及び運転手が所有する農場を除く。）に出入りしないよう指導すること。

また、運転手が所有する農場への立入りについても、可能な限り避けるよう指導すること。

- (7) 異常豚が搬入された日以降に家畜市場から移動した豚等の移動先を特定すること。
- (8) 豚コレラと判明した場合には、市場入場者は、異常豚が患畜又は疑似患畜と判定された日から7日間は、豚等の飼養施設（異常豚出荷農場及び市場入場者が所有する農場を除く。）に立ち入らないよう指導すること。また、市場入場者が所有する農場への立入りについても、可能な限り避けるよう指導すること。

4 と畜場から届出があった場合

- (1) 異常豚及びこれと同一の農場から出荷された豚等のと畜を中止するとともに、必要に応じて当該と畜場に入出入りする関係者に情報提供すること。
- (2) 畜産関係車両の入場を自粛すること。また、出場する畜産関係車両について、消毒を徹底するとともに、異常豚が患畜又は疑似患畜でないとは判定されるまでの間は、豚等の飼養施設に入出入りさせないこと。
- (3) 従業員等（異常豚の届出時にと畜場に入場していた全ての者をいう。以下（4）において同じ。）が場外に移動する際には、身体及び車両に対し適切な消毒等を行うこと。
- (4) 従業員等及び（1）の情報提供を受けた者のうち異常豚の搬入日以降に当該と畜場に入場した者（以下「と畜場入場者」という。）は、異常豚が患畜又は疑似患畜でないとは判定されるまでの間は、豚等の飼養施設に立ち入らないこと。
- (5) 異常豚の所有者を直ちに特定し、十分な消毒を行った上で、直ちに帰宅するよう指導するとともに、1の（1）から（5）までの指導を行うこと。
- (6) 異常豚の出荷に使用された車両及び運転手を特定し、消毒を徹底するとともに、異常豚が患畜又は疑似患畜でないとは判定されるまでの間は、豚等の飼養施設（異常豚出荷農場及び運転手が所有する農場を除く。）に入出入りしないよう指導すること。また、運転手が所有する農場への立入りについても、可能な限り避けるよう指導すること。
- (7) 豚コレラと判明した場合には、と畜場入場者は、異常豚が患畜又は疑似患畜と判定された日から7日間は、豚等の飼養施設（当該農場及びと畜場入場者が所有する農場を除く。）に立ち入らないよう指導すること。また、と畜場入場者が所有する農場への立入りについても、可能な限り避けるよう指導すること。

第9 抗原検査に供する検体の採材

防疫指針第4の3の（1）の②の検体のうち抗原検査に供する採材については、病原体の拡散を防止するため、可能な限り家畜保健衛生所で実施することが望ましいが、豚等の運搬が困難であり、又は多数の検体を採材する場合には、次に掲げる事項に留意の上、農場内で採材する。

- 1 採材する場所については、万一体液等が飛散した場合も考慮して、異常豚の飼育舎以外の飼育舎から十分離れている等感染を防止できる場所を選択すること。
- 2 病性鑑定前に、採材場所の周囲に十分量の消毒液を散布すること。

- 3 ビニールシートの上に消毒液を浸した布等を敷き、その上に豚等の死体を置くこと。
- 4 採材時には検体の取違えを防止するために、個体ごとに検査記録を付けること。
- 5 採材に際しては、カラス、キツネ等の野生動物が検体を捕食等しないよう、テント等遮蔽物を設置するなど、それらが近づかないための措置を講じること。また、検体の残余を放置しないこと。
- 6 採材後、豚等の死体をビニールシートで包み、消毒液を散布又は浸漬できるポリバケツ等の容器に入れ、採材場所の周囲に十分量の消毒液を散布すること。

第10 異常豚飼養農場に関する疫学情報の報告

都道府県畜産主務課は、当該農場に関する疫学情報について、別記様式2により動物衛生課宛てに報告する。

第11 陽性判定時に備えた準備に関する報告

都道府県は、陽性判定時に備えた準備等が円滑に進められるよう、当該農場等の現地調査を行い、農場内の建物の配置、農場内外の道幅、テントの設営場所、資材置場として活用可能な場所等を整理すること。

都道府県畜産主務課は、陽性判定時に備えた準備として講じた措置の内容については、それぞれの項目ごとに情報を整理し、速やかに動物衛生課にファックス又は電子メールにより報告すること。特に、他機関との調整を要する、国や他都道府県等からの人員や資材の支援の要否に関する事項については、分かり次第直ちに報告すること。

第12 病性鑑定

家畜保健衛生所における病性鑑定の実施に当たっては、別紙1「豚コレラの診断マニュアル」を参考とする。

第13 検体の送付

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門（以下「動物衛生研究部門」という。）に検体を送付する際には、必ず病性鑑定依頼書（別記様式3）を添付する。

第14 アフリカ豚コレラの診断のための動物衛生課との協議

アフリカ豚コレラの診断のための検体の送付に当たっては、以下の点について確認した上で、動物衛生課と協議する。ただし、本病はウイルス株の病原性の違いによって、甚急性型から慢性型まで多様な病態を示す可能性があるため、協議にあたっては、動物衛生課が下記1及び2以外の疫学情報を確認する場合がある。

- 1 家畜防疫員による臨床検査及び所有者に対する聞き取りにより、豚等に発熱、元気消失、食欲不振等が見られ、これが豚等の群内で拡がっているかどうか。
- 2 家畜防疫員が解剖検査で、アフリカ豚コレラの特徴的所見である脾臓の腫大又は腹腔内リンパ節の暗赤色化若しくは出血が認められるかどうか。

第15 アフリカ豚コレラの診断のための検体の保存方法と輸送方法

アフリカ豚コレラの診断のための検体の保存方法と輸送方法については、以下のとおりとする。

1 臓器材料が得られる場合の保存方法

(1) 材料：扁桃、脾臓、腎臓

(2) 材料の保存：シャーレや分割されたプレートに収納し、ビニールテープ等で密封し、更にビニール袋に入れて汚染（漏出）防止の措置をとった上で冷蔵保存する。

2 血液が得られる場合の保存方法

(1) 材料：血清、抗凝固剤加血液

(2) 材料の保存：材料血清は、セラムチューブ等の密栓できる容器に入れる。抗凝固剤加血液は、抗凝固剤が添加されている真空採血管で採血する。これらの外側を消毒し、ビニール袋に入れて汚染（漏出）防止措置をとった上で冷蔵保存する。

3 検体の輸送方法

動物衛生研究部門への送付に当たっては、事前に連絡の上、空輸等最も早く確実な運搬方法により、冷蔵で直接持ち込む。また、検体には必ず病性鑑定依頼書を添付する。

第16 病性等判定日を起算点とする日数の数え方

病性等判定日当日は、不算入とする。

第17 野生いのしし対策に係る関係者への連絡

第5の2により豚等が患畜又は疑似患畜であると判定された場合、動物衛生課は環境省自然環境局野生生物課、患畜又は疑似患畜が確認された農場（以下「発生農場」という。）及び発生農場から半径10キロメートル以内の区域をその区域に含む都道府県の家畜衛生担当部局に連絡する。連絡を受けた都道府県の家畜衛生担当部局は、当該都道府県の野生生物担当部局等の関係部局、猟友会等の関係団体に連絡する。なお、野生いのししから豚コレラウイルスが検出された場合又は豚コレラウイルスに対する抗体が検出された場合も同様に連絡する。

第18 都道府県対策本部

1 都道府県対策本部の設置

都道府県は、2の組織構成を考慮して都道府県対策本部を設置することとし、防疫措置の円滑な実施及び国や周辺都道府県との連絡調整を図ること。なお、必要に応じて、発生農場等における防疫措置を円滑に行うため、発生地近くの家畜保健衛生所等に現地対策本部を設置すること。

2 組織構成

都道府県知事を本部長とし、関係部局の協力を得た上で、本部長の下に次の各班の機能を有した組織を設置し、防疫の円滑な推進を図ること。

・総務班：国の防疫方針に基づく具体的な防疫方針の策定、予算の編成及び執行、

情勢分析、農林水産省、その他の関係機関との連絡調整（発生農場、現地対策本部及び畜産主務課間等の連絡調整も含む。）及び庁内連絡会議の開催を行う。

- ・情報班：発生状況及び防疫対応状況等の収集、広報資料の作成、広報連絡及び問合せの対応を行う。
- ・病性鑑定班：異常豚の届出に対する立入検査、病性鑑定のための検体の採取、当該検体の受入れ及び送付並びに病性鑑定を行う。
- ・防疫指導班：発生農場を調査し、防疫措置の企画及び指導に関し総務班に助言する。
- ・防疫支援班：焼却、埋却、消毒等の防疫用の資材・機材の調達及び配布、防疫要員の動員並びに関連業務の調整を行う。
- ・防疫対応班：立入制限、殺処分、農場消毒等の防疫措置並びに移動制限区域及び搬出制限区域（以下「制限区域」という。）内農場等の検査等の対応を行う。
- ・評価班：発生農場及び周辺農場における手当金の交付のための豚等や物品の評価等を行う。
- ・記録班：発症豚等の畜舎内の位置（場所）や頭数等の情報の記録、発症豚等の病変部位のステージの確認及び写真撮影、防疫措置の画像の撮影等を行う。
- ・疫学調査班：まん延防止のため、発生農場における家畜、人、物及び車両の出入りに関する疫学情報を収集し、疫学関連豚等の特定のための調査を実施する。
- ・原因究明班：感染経路究明のための必要な情報の収集及び整理や国の疫学調査チームと連携した現地調査を実施する。また、野生動物における感染確認検査等の対応を行う。
- ・庶務班：所要経費の確保及び手当金等の支出に関する事務を行う。
- ・保健班：公衆衛生部局等（保健所設置市の場合は、当該市担当部局も含める。）との連携のもと、防疫措置従事者及び豚等の飼養者の健康確認や保健上の問題（精神保健上の問題を含む。）に対応する。

第19 報道機関への公表

患畜又は疑似患畜と判定したときの報道機関への公表は、別記様式4により行うこと。

第20 報道機関への協力依頼について

都道府県対策本部の情報班が中心となって、報道機関に対し、可能な限り、農場周辺及び内部防疫措置の様子を撮影した画像を提供することにより、防疫指針第6の3の（5）の事項について協力を求めること。

第21 防疫措置に必要な人員の確保に関する事項

- 1 豚コレラの発生が確認後、速やかに防疫措置を開始することができるよう、都道府県は、あらかじめ必要な人員の所在を把握し、必要に応じて集合を命ずること。
- 2 防疫従事者の確保に当たっては、あらかじめ作業に従事させようとする者の豚等の

飼養の有無を確認し、豚等を飼養している場合には、直接防疫業務に当たさせないようにすること。

- 3 都道府県は、他の都道府県からの家畜防疫員の派遣要請を行う場合には、必要な人員、期間、作業内容等について、動物衛生課と協議すること。動物衛生課は、各都道府県と調整し、具体的な派遣スケジュールを作成する。
- 4 都道府県は、自衛隊の派遣について農林水産省との協議が整った場合には、発生状況、派遣期間、活動区域、活動内容等について現地の自衛隊災害担当窓口と十分に調整した上で、自衛隊法（昭和 29 年法律第 165 号）第 83 条第 1 項の規定に基づく災害派遣要請を行うこと。

第 22 発生農場における防疫措置の実施に関する事項

- 1 都道府県は、農場の建物の配置等を考慮して、テントの設営場所、資材置場等を決定するとともに、総括責任者、各作業ごとの責任者及び指揮命令系統を明確にすること。
- 2 家畜防疫員は、豚等の所有者に対し、豚コレラの概要、関係法令の内容、所有者の義務及び防疫方針を説明するとともに、家畜伝染病予防法（昭和 26 年法律第 166 号。以下「法」という。）第 52 条の 3 の規定に基づき行政不服審査法（昭和 37 年法律第 160 号）による不服申立てをすることができないことについて、遺漏なく説明すること。
- 3 現地の総括責任者は、と殺予定頭数、と殺の方法、死体処理方法、消毒面積その他必要な事項について、あらかじめ都道府県対策本部に確認し、その指示を受けること。
- 4 都道府県は、と殺の実施前に、ねずみ、はえ等の捕獲又は駆除のため、粘着シートの設置等を実施すること。
- 5 感染経路の究明のために行う検体の採材に当たっての検体の種類及び検体数は、農場ごとの飼養状況や発生状況に応じて、動物衛生課と協議の上、決定すること。

第 23 防疫措置従事者に関する事項

防疫措置従事者が防疫措置を実施するに当たっては、次の事項に留意すること。

- 1 入場時には、防疫服、長靴等を着用し、私物を持ち込まないこと。
- 2 退場時には、身体、衣服、靴及び眼鏡を消毒した後、入場時に着用した防疫服等を脱ぎ、手洗い、洗顔及びうがいをを行うこと。また、場内で着用した作業着等は、消毒液に浸漬した後、ビニール袋に入れ、外装を噴霧消毒すること。
- 3 都道府県対策本部は、現地での着替えや靴の履き替えを円滑に行えるよう、農場の出入口に仮設テントを設置する等の配慮を行うこと。その際、作業の前後で作業者の動線が交差しないようにすること。
- 4 帰庁（宅）後、移動に利用した車両の消毒及び着用していた全ての衣服の洗濯を行うとともに、入浴して身体を十分に洗うこと。
- 5 防疫措置に従事した日から 7 日間は発生農場以外の豚等に接触しないこと。ただし、防疫措置実施時や発生農場からの退場時のバイオセキュリティ措置が適切に実施されていることが確認される場合には、その期間を 3 日間まで短縮できるものとする。

6 都道府県対策本部は、防疫措置前後に防疫措置従事者の健康状態を確認するなど、公衆衛生部局等（保健所設置市の場合は、当該市担当部局も含める。）と連携して、防疫措置従事者の心身の健康維持に努めること。

第 24 と殺指示書の交付

家畜防疫員が患畜又は疑似患畜の所有者に対して交付すると殺指示書は、別記様式 5 により作成すること。

第 25 24 時間以内のと殺の完了と 72 時間以内の焼埋却について

早期封じ込めのためには、患畜又は疑似患畜の迅速なと殺とその死体の処理が重要であることから、24 時間及び 72 時間以内という一定の目安を示しており、当該目安については、防疫措置に特段の支障が生じない環境下の農場において、肥育豚飼養農場で 1,000 から 2,000 頭の飼養規模を想定している。

様々な農場の飼養規模、畜舎の構造、気象条件等の状況により、要する時間は異なることを踏まえ、的確なまん延防止措置、防疫措置従事者の安全と健康状態等を十分に確保しつつ、現実に即した防疫措置の遂行に努めること。

なお、これらの状況下においても的確かつ迅速な防疫措置が講じられるよう、防疫演習の実施等を通じ、日頃から万全な体制の構築に努めること。

第 26 汚染物品の処理について

以下の時点で、動物衛生課と協議の上、防疫指針第 7 の 3 の（1）の汚染物品の処理が完了したとみなす。

また、家畜防疫員等が農場内の飼料、排せつ物等に含まれるウイルスの不活化に必要な処理が完了していることを確認するまでの間、農場内の飼料、排せつ物等の移動を禁止すること。ただし、家畜防疫員の指示の下、輸送中の散逸防止の徹底等を図った上で、不活化に必要な処理のために農場外に移動する場合は、この限りでない。

- 1 焼却のため汚染物品を農場から移動させる際に密閉容器を用いる場合、農場内の全ての汚染物品を密閉容器に入れ終えた時点
- 2 家畜排せつ物、敷料、飼料等について、消毒による処理を行う場合、病原体の拡散防止に万全を期した、消毒を開始するための封じ込め措置が完了した時点
- 3 スラリー、尿及び汚水については、消石灰（水酸化カルシウム）又は水酸化ナトリウムを 0.5% 添加し、攪拌後、30 分以上経過した時点

第 27 と畜場等における発生時の防疫措置について

と畜場、家畜市場等において異常豚が患畜又は疑似患畜と判定された場合、当該と畜場、家畜市場等において、防疫指針第 7 の 1 から 4 までに準じた防疫措置を講じること。

なお、と畜場での発生の場合は、と畜場施設（係留施設、病畜と殺施設）におけると殺についても検討すること。

また、防疫指針第 7 の 4 に準じると畜場における消毒については、施設所有者への説明や施設構造を踏まえた対応が必要となる。

このことから、必要に応じて、公衆衛生部局に家畜衛生部局とと畜場との連絡調整に係る協力を求め、地域で連携して、円滑に実施すること。

なお、と畜場の消毒については、糞尿等が十分に除去されるよう洗浄をした上で、1回以上実施すること。

第28 豚等の評価額の算定方法

患畜又は疑似患畜となった豚等の評価額の算定は、原則として、別紙2により行う。

第29 移動制限区域内における指導事項

家畜防疫員は、移動制限区域内において、次に掲げる事項について関係者への指導を行うこと。また、必要に応じ関係施設に立ち入り、その履行状況を監視すること。

- 1 豚等の飼養場所への関係者以外の者の出入りを自粛するとともに、関係者であっても入出場の回数を最小限にすること。
- 2 全ての車両、人の入退場時の消毒を徹底すること。
- 3 飼料運搬時の運搬車の消毒、運搬経路の検討、飼料受渡し場所の制限等の病原体の拡散防止措置を徹底するとともに、運搬経路を記録すること。
- 4 獣医師が家畜の診療を行う場合、携行する器具及び薬品は最小限のものとするとともに、消毒又は廃棄が容易な診療衣、診療器具等を着用又は使用し、農場入退場時には、身体、器具、車両等の消毒を徹底すること。また、診療車両の農場敷地内への乗入れ自粛等の病原体の拡散防止措置を徹底するとともに、診療経路を記録すること。
- 5 死亡獣畜取扱場、化製場及びと畜場における入退場車両の消毒を徹底すること。
- 6 野生いのししと豚等の接触が想定される地域にあつては、接触防止のための畜舎出入口の囲障を設置するとともに、豚等の飼養場所における飼料等は、いのしし等の野生動物が接触しないように隔離及び保管すること。
- 7 野生生物担当部局に対し、野生いのししの死体(狩猟によるものも含む。)は、焼却、埋却等により適切に処理することとし、現場に放置しないよう、猟友会等の関係者へ協力を要請するよう依頼すること。

第30 豚等のと畜場への出荷のためのPCR検査又は蛍光抗体法の検体数

出荷する畜舎ごとに5頭(死亡した豚等(明らかに外傷等により死亡したと認められるものを除く。))がいる場合には、当該豚等を少なくとも1頭以上(ただし、最大で3頭)を含むものとする。)から検体を採材する。なお、検査の実施に当たっては、別紙1「豚コレラ診断マニュアル」を参考とする。

第31 搬出制限区域内で飼養される家畜を出荷する際の協議事項

都道府県畜産主務課は、搬出制限区域内の農場の豚等を搬出制限区域外のと畜場に出荷させる場合には、当該と畜場を所管する都道府県の公衆衛生部局及び当該と畜場に対し、出荷する前日までに出荷農場の情報(出荷者氏名、住所及び出荷頭数)を提供すること。

出荷直前の臨床検査を行う家畜防疫員は、出荷先のと畜場に対して、臨床検査を行った結果、異状が無かった旨を記載した検査証明書を発行し、出荷者に対して、出荷豚等をと

畜場に搬入する際に、当該証明書を当該と畜場に提出するよう指示すること。

第 32 豚等の集合を伴わない催物等に関する事項

豚等の集合を伴わない催物等については、発生農場を中心に徹底した消毒を行うことにより、豚コレラのまん延防止を図ることが可能であることから、都道府県は、必要に応じた消毒の実施等を条件に開催可能であること等を周知及び指導する。また、豚コレラが発生している地域から催物等に参加する者がその参加を制限されるなどの不当な扱いを受けることのないよう、指導する。

第 33 車両消毒等に関する事項

都道府県は、車両消毒等の実施に当たっては、次に掲げる事項に留意する。

1 消毒ポイントによる消毒

(1) 消毒ポイントの設置場所

消毒ポイントの設置場所の検討に当たっては、警察署長及び道路管理者と十分に協議するとともに、周辺の住環境、農業への影響等も十分に勘案すること。

(2) 消毒ポイントにおける消毒の方法

消毒ポイントにおける消毒の方法については、設置場所の特性も踏まえ、道路上への消毒槽・消毒マットの設置又は駐車場等への引き込み方式（動力噴霧器による消毒）により行うこと。また、作業従事者は、車両を消毒ポイントに誘導する者と実際に消毒を実施する者を適切に配置すること。

① 畜産関係車両

車両の消毒については、車体を腐食しにくい逆性石けん液、消石灰等を用いることとし、極力車体に付着した泥等を除去した後、動力噴霧器を用いて、車両のタイヤ周りを中心に、荷台や運転席の清拭も含めて車両全体を消毒すること。その際、可動部を動かすことによって消毒の死角がないように留意するとともに、運転手の手指の消毒及び靴底の消毒を徹底すること。

② 一般車両

少なくとも、車両用踏込消毒槽や消毒マットを用いた消毒を実施すること。その際、常に十分な消毒の効果が得られるよう、消毒薬を定期的に交換すること。

2 正確な情報提供・指導

発生県以外の都道府県は、適切な車両の消毒が行われているにもかかわらず、発生県車両の出入りが制限されるようなことがないよう、正確な情報提供・指導を行うこと。

第 34 疫学調査に関する事項

1 都道府県は、家畜、人、物及び車両の出入り、農場従業員の行動歴、農場への外部の者の訪問（当該訪問者の訪問後の行動歴を含む。）、その他豚コレラウイルスを伝播する可能性のある事項について幅広く調査を行うこと。

2 このため、都道府県は、畜産関連業者その他の関係者に対し、疫学調査時に速やか

に情報が提供されるよう、日頃から複数の農場等に入出入りする人、車両及び物品に関する情報を整理するよう指導すること。

3 都道府県畜産主務課は、調査対象が他の都道府県にある場合には、動物衛生課に連絡の上、当該都道府県畜産主務課に連絡する。連絡を受けた都道府県畜産主務課は、発生都道府県と同様に、調査を行うこと。

4 農場等への立入検査及び報告徴求は、法第 51 条第 1 項及び第 52 条第 1 項の規定に基づき実施すること。

第 35 疫学調査に関する実施項目

本病の感染経路をあらゆる面から検証するため、原則として全ての発生事例を対象として、以下を参考に、関係者からの聴き取り調査等を実施し、疫学情報の収集を行う。

1 調査対象

(1) 発生農場

(2) 発生農場と疫学関連のある豚等の飼養農場及び畜産関係施設(家畜市場、と畜場、飼料・敷料工場、飼料・敷料販売先、農協等)

2 調査事項

(1) 農場の周辺環境(森、畑、住居、道路からの距離、周辺の農場の有無など)

(2) 気温、湿度、天候、風量・風向など

(3) 家畜運搬車両、飼料運搬車両、死亡畜回収車両、堆肥運搬車両、機器搬入などの車両や精液及び受精卵等の運搬物資の動き

(4) 農場主、農場従業員、獣医師、家畜人工授精師、家畜商、飼料販売業者、敷料販売者、資材販売者、薬品業者、畜産関係者(農協職員等)、郵便局員、宅配業者、家族、知人等の動き(海外渡航歴、野生動物等との接触の有無を含む。)

(5) 放牧の有無(有の場合は、その期間及び場所)

(6) 野生いのししの分布、侵入及び接触機会の有無

(7) 畜舎及び付帯施設の構造、野生動物の侵入対策など

(8) 農作業用機械の共有の有無

(9) 発生国等から導入した畜産資材等の使用の有無

第 36 発生状況確認検査及び清浄性確認検査における血液検査、抗原検査及び血清抗体検査のための採材頭数及び検査方法

発生状況確認検査及び清浄性確認検査における各種検査のための農場ごとの採材頭数は、95%の信頼度で10%の感染を摘発することができる数として、以下のとおりとする。

また、検査の実施に当たっては、別紙1「豚コレラ診断マニュアル」を参考とする。

なお、採材は、第4の1の(1)から(7)までに掲げるいずれかの臨床症状を示す豚等から行い、そのような豚等が認められていない場合は、健康な豚等から採材する。

使用頭数	採材頭数
1～15頭	全頭
16～20頭	16頭
21～40頭	21頭

41～100 頭	25 頭
101 頭以上	30 頭

※ 畜舎が複数ある場合は、全ての畜舎から採材すること。

第 37 ワクチン受領書及びワクチン使用報告書

都道府県は、ワクチンを受領した場合には、別記様式 6 による受領書を発行すること。また、ワクチンの使用が終了した場合には、使用した旨を別記様式 7 により、農林水産省消費・安全局長に報告する。

第 38 ワクチンの取扱い等に関する事項

ワクチンの取扱い等については、次のとおりとする。

- 1 ワクチンの接種は、法第 31 条の規定に基づき実施し、原則として、接種地域の外側から発生農場側に向けて、迅速かつ計画的に実施する。
- 2 ワクチンを接種するに当たっては、定められた用法及び用量に従うものとする。また、注射事故があった場合には、動物衛生課に連絡し、その指示に従うものとする。
- 3 未開梱のワクチンについては、動物衛生課と調整し返還する。また、開梱又は期限切れのワクチンについては、焼却処分するなど適切に処理を行う。
- 4 同一の農場又は畜舎に飼養されている全ての豚等に接種する。接種に際しては少なくとも 1 畜房ごとに注射針を取り替え、また、防疫衣の交換又は消毒等により本病のまん延防止に留意する。
- 5 短時間に迅速かつ確実に接種し、接種した豚等にはスプレー等でマーキングして接種漏れがないよう注意し、その後、接種した豚等及び当該接種豚等から生まれた豚等については耳標等で確実に標識を付する。

第 39 豚等の再導入に関する事項

豚等の再導入に関する検査等については、次のとおり対応する。

- 1 農場が再導入を予定している場合には、家畜防疫員は次に掲げる内容について、当該農場に立ち入り、確認する。ただし、これにより難しいときは、その他の都道府県職員又は都道府県が適当と認めた民間獣医師、市町村職員等も行うことができる。
 - (1) 農場内の消毒を、と殺終了後 1 週間間隔で 3 回 (防疫措置の完了時の消毒を含む。) 以上実施していること。
 - (2) 農場内の飼料、排せつ物等に含まれる豚コレラウイルスの不活化に必要な処理が完了していること。
- 2 家畜防疫員等は、当該農場に対し、初回の再導入の際は、念のため、畜舎ごとの導入頭数を少数とし、その後段階的に導入するよう努めるとともに、前回の消毒から 1 週間以上経過している場合には、導入前に再度消毒を実施するよう、指導すること。
- 3 豚等の再導入にあたっては、都道府県は、万一の発生に備え、迅速に防疫措置を行える体制の確保に努める。

第 40 野生動物における感染確認検査等に関する事項

都道府県は、次により、野生動物における感染確認検査等の対応を行う。

- 1 動物衛生課と協議の上、移動制限区域内において、野生いのししの死体及び猟友会等の協力を得て捕獲した野生いのししについて、抗原検査又は血清抗体検査を実施するための検体を採材し、検査する。このため、都道府県の家畜衛生担当部局は野生生物担当部局に対し、当該区域において、死亡した野生いのししを発見した場合又は野生いのししが捕獲された場合には、家畜衛生担当部局に連絡することについて猟友会等の関係者への協力を要請するよう依頼するとともに、これら野生いのししからの検体の採材に協力するよう依頼する。

- 2 1の検査で、陽性が確認された場合には、次の措置を速やかに実施する。
 - (1) 当該野生いのししを確保した地点の消毒及び必要に応じた通行の制限・遮断
 - (2) 当該地点から半径 10 キロメートル以内の区域（以下「周辺区域」という。）に所在する豚等の飼養場所への立入り及び飼養されている豚等の異状の有無の確認（必要に応じた病性鑑定）
 - (3) (1) の消毒終了後少なくとも 28 日間、周辺区域で飼養されている豚等の所有者に対する豚等の死亡状況等の報告徴求
 - (4) 野生いのししと豚等の接触が想定される周辺区域における接触防止のための畜舎出入口の囲障の設置、豚等の飼養場所における飼料等を、いのしし等の野生動物が接触しないように隔離及び保管すること等の、当該区域で豚等を飼養する者に対する指導
 - (5) (1) の消毒終了後少なくとも 28 日間、当該野生いのししを確保した地点の周辺区域において、1 の浸潤状況調査を実施する。
 - (6) 野生生物担当部局に対し、(1) の消毒終了後少なくとも 28 日間、周辺区域における野生いのししの死体（狩猟によるものも含む。）は、焼却、埋却等により適切に処理することとし、現場に放置しないよう、猟友会等の関係者への協力要請を依頼

- 3 2の措置は、豚等での感染が確認される前に、野生いのししの死体又は猟友会等の協力を得て捕獲した野生いのししの抗原検査又は血清抗体検査で陽性が確認された場合であっても、同様に実施するものとする。

(別紙1)

豚コレラの診断マニュアル

豚コレラウイルスはフラビウイルス科ペスチウイルス属の一種で、同属の牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV) やボーダー病ウイルス (BDV) と抗原的及び構造的に非常に類似している。豚コレラ (以下「本病」という。) に罹患した豚の臨床症状や剖検所見はウイルス株の違いや宿主である豚によって極めて多様である。BVDV や BDV といった反すう動物のペスチウイルスが豚に胎子感染した場合、豚コレラと区別しがたい臨床症状を生じることもある。

本病は豚の発育ステージに関係なく伝染し、発熱、うずくまり、食欲減退、鈍麻、虚弱、結膜炎、便秘に次いで下痢、歩様蹠踉を主徴とする。発症後数日経つと耳翼、腹部、内股部に紫斑を生じる場合もある。急性経過の場合は、1週から2週以内に死亡する。臨床的に症状を示さないで突然死亡する場合は本病の症状はみられない。

ウイルス株の違いと同様に、豚の月齢や状態によっては、亜急性又は慢性経過となる場合があり、死亡までの経過は2週から4週、時として数か月となることがある。慢性経過では、発育の遅延、食欲不振、間欠発熱や間欠性の下痢がみられる。本病は免疫系に影響を及ぼし、発熱前の白血球減少症がよくみられ、そうした免疫抑制によって複合感染を起こしやすくなる。

急性の場合、肉眼的病理変化は普通みられないが、典型的な所見としてはリンパ節が赤く腫脹し、心外膜の出血、腎臓や膀胱、皮膚や皮下組織において出血がみられる。亜急性や慢性の場合、これらの所見に加えて、胃腸、喉頭蓋、喉頭の粘膜に壊死性あるいは”ボタン状”潰瘍がみられる。

組織病理学的所見では、リンパ組織の実質変性、血管結合織の細胞増殖、囲管性細胞浸潤を伴った非化膿性髄膜脳炎などの病変がみられるが、いずれも豚コレラに特異的な所見ではない。

このように、本病は多様な臨床症状と病変を呈するものの、いずれも特異的な変化ではないため、臨床所見から診断することは難しく、アフリカ豚コレラ、離乳後多臓器性発育不良症候群 (PMWS)、豚皮膚炎腎症症候群 (PDNS) 等のウイルス性疾患や敗血症を呈しているサルモネラ症、パスツレラ症、アクチノバチルス症、ヘモフィルス・スイス感染症と区別しにくい。

したがって、実験室におけるウイルス学的診断が最も重要となる。実験室では豚コレラウイルスやその核酸あるいはウイルス抗原といった抗原側の要素を検出する直接的な方法とウイルス特異抗体を検出する間接的な方法を用いる。後者の抗体検出では、牛ウイルス性下痢・粘膜病ウイルスなどの反すう動物のペスチウイルスとの交差反応の問題があり、急性の場合には特異抗体が検出される前に臨床症状を呈して死亡してしまうため、主に清浄性の監視に利用する。

I 抗原検査

1 検査方針

本病を疑う症例の診断においては、迅速性及び検体処理可能数量を勘案すると、凍結切片の蛍光抗体染色による豚コレラウイルスの抗原検出が最良である。したがって、本病を疑う豚1頭から採材した多臓器について検査を行うのではなく、本病を疑う多数の豚から扁桃を採材して本病ウイルス抗原証明に力点を置いた検査を実施すべきである。また、蛍光抗体法によるウイルス抗原の検出と同時に、細胞培養によるウイルス分離及び生体がいる場合には血液を材料としたPCR検査を開始する。ウイルス分離はウイルス

が濃厚感染している場合、24 時間から 48 時間程度で判定が可能となるが、ウイルス量が少ないこともあるため、最低 1 週間は観察を続ける必要がある。ウイルス分離と並行して RT-PCR を実施し、ウイルスの存否を早期に確認することは有意義である。しかし、PCR は交差汚染（コンタミネーション）による疑陽性が出る可能性があり、また、増幅産物が他のペスチウイルスでないことを確認（後述）する必要があるため、最終的にはウイルス分離の結果を含めた総合判断を実施する。

なお、診断をスムーズに実施する為、ウイルス検査に用いる細胞の維持および管理、凍結切片の作製に用いるドライアイスの調達、クリオスタットの予冷等に関して事前に検討しておくことが好ましい。ドライアイスの調達が困難な場合は、n-ヘキサンを-80℃に保存しておくことで代替が可能である。

2 採材

- (1) 農場に到着後、臨床検査を行い、防疫指針第 4 の 1 の症状が確認され、豚コレラが疑われる場合は、当該症状が認められた豚を優先的に採材し、病性鑑定を実施する。
- (2) 採材は、病性鑑定のため処分された豚又は死亡直後の豚から速やかに行うことが望ましい。また、剖検材料は生組織材料の採取を優先的に行い、残りの部分について病理組織検査のために組織固定用ホルマリンで保存する。生組織材料は扁桃（片側全て）、腎臓（髄皮質を含む。）及び脾臓（一部）とし、ウイルス分離用乳剤作製に用いるだけでなく凍結切片作製にも用いるため、組織構造を壊さないように留意して採材を行う。採取した材料は個別別に滅菌 6 穴プレート等に入れ、ビニールテープで蓋を固定し、密閉する。さらにビニール袋に入れ、冷蔵（氷冷）して検査室に持ち帰る。感染していた場合、生組織材料や血液には多量のウイルスが含まれ、使用した解剖・採材器具は多量のウイルスで汚染されるため、その取扱いにも十分注意する。

また、本病を疑う症状を示している豚が生存している場合には、血液（血清又は抗凝固剤加血液）も採取しておき、抗体検査や白血球数計数検査はもちろん、ウイルス分離及び PCR 検査の材料としても用いる。

3 凍結切片と乳剤の作製

凍結切片作製用材料は凍結融解することなく、新鮮な材料を用いる。それぞれの操作に際しては、卓上に消毒液を含ませたさらし布を敷く等、病原体の飛散を防止する措置を講ずる。

(1) 生組織材料の処理

- ア 凍結切片作製用に組織を 1 cm×5 mm（扁桃）あるいは 1 cm×1 cm（腎臓、脾臓）程度の大きさで、それぞれ 3 個ずつ切り出す。
- イ 乳剤作製に残りの組織から 1 g 程度をシャーレに取り、秤量しておく。乳剤作製まで、氷冷下で保存する。
- ウ 濾紙に豚番号・標本名を記入する。
- エ 凍結切片作製用の組織を切断面を上にしてそれぞれ濾紙の上に載せる。この際、扁桃は陰窩の横断面が、腎臓は尿細管上皮が、それぞれ切断面に出現するように注意する。
- オ 組織片を載せた濾紙をピンセットで摘み、ドライアイス・アセトンで冷やした n-ヘキサン（-80℃程度）に浸け、急速凍結する。浸け過ぎると組織片が割れるので注意する。
- カ 凍結したら素早くクリオスタット庫内に移すか、耐冷チューブに入れ、-80℃のディープフリーザーに保存する。

(2) 凍結切片標本の作製

- ア (1) のカで凍結組織を耐冷チューブに入れた場合は、クリオスタット庫内で、耐冷チューブから組織片を取り出す。
- イ 組織片をコンパウンドを使って検体台につける。
- ウ 面出しをする。
- エ 6 μm の切片を作製する。
- オ シリコンコート処理済みスライドグラスに切片を取る。
- カ 直ちにドライヤー冷風で乾燥する。
- キ 冷アセトンで10分間、固定する。
- ク 風乾し、スライドグラス標本とする。

(3) ウイルス分離及びPCR検査のための乳剤の作製（ホモジナイザーや細胞破碎装置等を用いて作製しても可）

- ア (1) のイの組織片を乳鉢に入れる。
- イ 乳鉢内で組織片をハサミで細切りする。
- ウ けい砂を適量加え、乳棒で細切片を軽く擦りつぶす。
- エ 秤量した組織片が10%w/vとなるように培養液を入れ、よく乳化させる（例えば組織片が1gのときは9mlの培養液を加える）。
- オ 乳化した組織片を遠心管に移す。
- カ 3,000r.p.m.、15分間の冷却遠心を行う。
- キ 上清を小試験管に移して、10%乳剤とする。

4 ウイルス分離（カバースリップの代わりにチャンバースライド等を用いても可）

カバースリップ標本作製するため、カバースリップに細胞シートを形成させてから乳剤を接種するが、細胞の培養に用いる牛胎子血清はBVDウイルス抗体陰性のものを使用する。また、ウイルスと中和抗体が共存する個体では乳剤からのウイルス分離が陰性となる場合があるので、希釈した乳剤（後述）も併せて接種する。乳剤を接種後、カバースリップ上の細胞を経日的に取り出し、冷アセトンで固定し、蛍光抗体法により細胞質内の本病ウイルス抗原を検出する。観察期間は少なくとも1週間は必要であるが、乳剤中のウイルス量が少なく、3日目に観察するカバースリップ上の細胞シートに特異蛍光が観察されなければ、別の6穴プレートにカバースリップを入れ、培養細胞を準備する。4日目も特異蛍光が観察されなければ、当該カバースリップの培養上清を前日に準備した培養細胞に接種し経代培養する。5日目から7日目までは、この培養細胞のカバースリップについて観察する。

なお、それぞれの操作に際しては、消毒液を含ませたさらし布を敷く等、病原体の飛散を防止する措置を講ずる。

(1) 培養細胞の準備

- ア ウイルス分離にはCPK細胞（Ⅱの4のCPK-NS細胞とは別の細胞であることに注意する。）を用いることとし、面積比で3倍に継代する。
- イ 6穴プレートの各穴にカバースリップ（6×18 mm）を3～4枚ずつ重ならないように入れる。
- ウ 細胞浮遊液3mlを各穴に入れる。この際、カバースリップが浮遊して、重なることがあるので注意する。
- エ 37℃で一晩培養する。
- オ 翌日、細胞シートが形成されていることを確認してから使用する。

(2) 乳剤接種とカバースリップ標本の作製

- ア 少なくとも扁桃乳剤については、 $0.45\mu\text{m}$ のフィルターで濾過する。この際、あらかじめグラスフィルターを通しておくと目詰まりが防げる。
- イ 乳剤や血液の希釈液（原液及び10倍又は100倍希釈を使用）を作製し、(1)のオの細胞シートに $0.2\sim 0.3\text{ ml}$ 接種する（接種材料の原液は少なくとも検査終了時までは保存する。）。
- ウ ウイルス吸着のために1時間静置する。その間15～20分の間隔でティルティング操作を行う。
- エ PBS-又は培地で細胞面を洗浄する。
- オ 5%血清添加培養液を添加し、 37°C で培養する。なお、添加する血清はBVDウイルス抗体陰性の牛胎子血清を用いなければならないが、馬血清で代用することも可能である。この場合、あらかじめ馬血清でCPK細胞が培養可能かチェックしておくこと。
- カ 経日的にカバースリップを取り出し、PBS-で洗浄後、冷アセトンで10分間固定する。
- キ 風乾し、カバースリップ標本とする。

5 蛍光抗体法

3の(2)のクのスライドグラス標本及び4の(2)のキのカバースリップ標本の蛍光染色には、市販の豚コレラ診断用蛍光抗体を用いる。扁桃の凍結切片においてはウイルス抗原陽性の場合、陰窩上皮細胞に特異蛍光が観察され、蛍光は細胞質のみ（核は黒く抜ける）に認められる。一方、カバースリップ標本においては、ウイルス分離陽性の場合、標本全体又は一部分の細胞に特異蛍光が観察され、スライドグラス標本同様に細胞質内に特異蛍光が認められる。標本全体の細胞か、一部分の細胞かは接種材料中のウイルス量の違いによるものであり、ウイルスが少ない場合は、ウイルス感染細胞は培養時間の経過とともに巣状に増加し、フォーカスを形成する。検査結果の判定はこのフォーカス形成時期が一番容易であるので、経日的な観察が必要となる。いずれかの標本を染色する場合にも、抗原の陽性対照としてあらかじめ作製・保存しておいたGPE-ワクチン株感染カバースリップ標本を同時に染色すると、診断用蛍光抗体や蛍光顕微鏡がうまく働いていることが確認でき、かつ判定しやすくなる。なお、蛍光抗体染色法の詳細については豚コレラ診断用蛍光抗体に添付されている説明書に記載されているので参照する。

6 RT-PCR

被検材料としては、2の(2)の血液材料、3の(3)のキの10%乳剤又はウイルス分離中の培養上清を用いる。

(1) RNAの抽出

市販のRT-PCRのためのRNA抽出キットが簡便であり、操作も容易である。抽出材料は血液、乳剤や培養上清等があり、材料に適したキットを選択する。抽出材料はウイルス分離材料の調整段階でウイルス分離用とは別のマイクロチューブに必要量（キットにもよるが、 $50\sim 400\mu\text{l}$ の範囲）を分注しておくこと、凍結融解によって感染価が低下する心配がない。なお、変性剤を添加して混和するまで、材料は感染性があるものとして取り扱わなければならない。

(2) RT-PCR

市販のRT-PCRキットが簡便である。特にRT反応とPCR反応を続けて行えるワン・チューブ方式のものが便利な上、操作や交差汚染の問題を軽減できる。ウイルスの存

否を知る検出を目的とした検査の場合、標的領域は5'側非翻訳(5'-NTR)領域を用いる。ただし、5'-NTR領域は遺伝子の保存性が高く種々の豚コレラウイルス株の検出が可能であるが、BVDウイルス等の他のペスチウイルスも検出するため、検出したPCR産物の詳細な解析等が必要となる。なお、陽性対照としてGPE-株を陰性対照として水をそれぞれ置くこととするが、クロスコンタミの危険性があるため、施設やバイオセーフティの観点からも陽性対照の取り扱いには十分に注意しなければならない。

ア プライマーとアニーリング温度

Š. Vilčekら (Arch. Virol, 136:309-323, 1994)による上流プライマー「324」及び下流プライマー「326」が豚コレラウイルス検出の目的には適している。いずれもT_m値が56.5°Cであるので、PCR反応のアニーリング(対合)は56~57°Cで行う。ディネーター(変性)温度、エロンゲーション(伸長)温度並びにそれらの時間やサイクル数は使用するキットに従い設定する。

[プライマーの配列]

上流プライマー「324」 5'-ATG CCC (T/A)TA GTA GGA CTA GCA-3'

下流プライマー「326」 5'-TCA ACT CCA TGT GCC ATG TAC-3'

イ アガロース電気泳動と制限酵素処理

豚コレラウイルスであれば、およそ280bp(多くは284bp)のPCR産物が産生される。産物は2%アガロースゲルで電気泳動し、紫外線照射下で観察・写真撮影する。BVDウイルスなど他のペスチウイルスでもおよそ280bpの産物が産生されるため、アガロース電気泳動上では豚コレラウイルスか、BVDウイルスかは区別できない。確実に識別するためには塩基配列の決定とその遺伝子解析が必要であるが、制限酵素BglIで消化すると、アガロース電気泳動上である程度判別できる。豚コレラウイルスの場合(284bp)、BglIによっておよそ46bpの断片が切り出されるため、消化前に比較してサイズが小さく(およそ238bp)なる。

7 検査結果の取扱い

凍結切片やウイルス分離等において、陽性と思われる所見が得られた場合は、防疫指針第4の6に基づき対応する。

II 抗体検査

1 検査方針

急性経過をとる豚コレラの場合、抗体を生じる前に死亡することが多く、臨床検査による摘発が重要となる。一方、慢性経過をとる豚コレラの場合、明瞭な症状がみられず、臨床検査による摘発は困難であるが、罹患豚の多くは抗体を産生するため、抗体検査による摘発が可能である。また、抗体検査は蛍光抗体法と異なり、生前検査として実施できることから、清浄性確認のための監視検査の一つとして有用である。野外ウイルス感染の場合、水平感染による病原体の拡散は容易に起こるので、抗体陽性豚と疫学的関連のある豚の抗体検査を実施することにより、豚群として抗体検査を評価する。また、本病生ワクチンを接種した豚は生涯にわたり本病ウイルスに対する抗体を持ち続けることから、ワクチンを使用した際にはこの点にも留意して評価を行う。

抗体検査は採材後直ちに実施することを基本とし、その結果から野外感染が疑われる場合には、速やかに本病の確定診断(抗原検査)を実施する。

2 被検血清の調整

採取した血液からは速やかに血清を分離し、ウイルス分離等抗原検査用の生血清を取り分けた上で、抗体検査に供する血清は、確実に非働化(56°C、30分の加熱処理)を

行う。残余や直ちに使用しない血清は-20℃で凍結保存する。なお、生血清は、ウイルス汚染の可能性も考慮し、密封容器に入れ、-80℃で保存する。

3 酵素免疫測定法 (ELISA)

市販のエライザキットを用い、操作及び判定は添付の使用説明書に従う。中和試験のように生ウイルスを取り扱わないので、安全で速やかに結果が得られることから、今後は本法を抗体検査の中心とする。

4 中和試験

中和試験の指示ウイルスとして、ワクチンウイルスの GPE-株を使用し、培養細胞は無血清培地に適応した細胞の豚腎臓由来株化細胞 (CPK-NS 細胞) を用いる。このウイルスと培養細胞の組合せによって、細胞変性効果 (CPE) を指標に中和抗体価が判定できるが、CPK-NS 細胞は豚コレラウイルスを増殖させる能力が低いため、ウイルス分離や指示ウイルスストック作製には不向きである。また、ワクチンウイルスといえども生ウイルスを扱うことから、培養細胞や検体への汚染に注意するとともに、実験室外への漏出防止等の管理徹底を図る必要がある。

(1) 無血清培養細胞の培養

中和試験には無血清培養液で増殖可能な CPK-NS 細胞を用いる。この細胞の継代維持には再用品ではない新品のプラスチック培養フラスコを使用する。密栓 (フラスコの蓋を固く締めて) 培養すること、及び継代時の細胞分散液 (トリプシン溶液) の除去に、遠心・洗浄操作を最低 2 回繰り返すこととの他は、通常継代維持と変わらない。したがって、通常 7 日間隔で細胞面の面積比 3 倍で継代維持を行う。なお、25cm² (75cm²) の場合は、15mL (45mL) に浮遊させ、5mL (15mL) ずつ分注し、培養する。

[無血清培養液の作製方法]

イーグル MEM 9.4 g (製品指示量)
TPB (Tryptose Phosphate Broth) 2.95 g
BES (N, N-Bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid) 2.13 g
Bacto Peptone 5.0 g

上記試薬を秤量し、1 リットルの純水又は超純水に溶解し、121℃、20 分でオートクレーブする。室温まで冷却後、別途準備した 3% L-グルタミン及び 7.5% 重曹をそれぞれ 10 mL 及び 30 mL ずつ添加し、使用液とする。

ア 培地を除去し、細胞面を除去した培地の 2 倍～3 倍量の PBS-で 1 回洗浄する。

イ 細胞はトリプシン溶液を用いて消化 (通常、10 分～30 分程度) し、少量の培地を加えてから、ピペッティングによって細胞を十分に分散させた後、使用したトリプシン溶液の 10 倍量の培地で浮遊させる。

ウ 細胞浮遊液を遠心管に回収し、遠心 (1,000r.p.m、5 分) する。遠心後、上清を除去し、再び培地を加え細胞を浮遊させる。

エ 再度遠心 (1,000r.p.m、5 分) し、上清を除去する。

オ 元の細胞面の 3 倍比となるように、培地に再浮遊させた後、プラスチック培養フラスコに細胞浮遊液を分注する。

カ プラスチック培養フラスコの蓋を固く締めて 37℃で静置し、細胞は 7 日後に再び継代するか、又は中和試験に供する。細胞継代は 4 日目ぐらいで可能であるが、細胞数が少ないため、3 倍比では継代できないので注意する。

(2) 中和試験

中和試験の指示ウイルスとしては、ワクチン株 (GPE-株) を用いる。このワクチンウイルスは CPK-NS 細胞では CPE を起こすものの、ほとんど増殖はしないため、中和試験用の指示ウイルスストック作製にはウイルス分離の際同様、CPK 細胞 (Ⅱの4の CPK-NS 細胞とは別の細胞であることに注意する。) を用いる。培地には5%血清添加したものを使用する。ウイルスストック作製以外のウイルス力価及び中和力価の測定には無血清培地を用いた CPK-NS 細胞を使用する。

ア ウイルス液の調整法

(ア) シートになった CPK 細胞に多重感染度 (M. O. I) 約 0.1 で接種し、ウイルス吸着のために1時間静置する。その間15~20分の間隔で、ティルティング操作を行う。

(イ) PBS-又は培地で細胞面を洗浄する。

(ウ) 5%血清添加培養液を加え、37°Cで培養する。

(エ) 開放培養の場合、培養後4、5日目に培養上清を遠心管に回収する。回収前に顕微鏡で観察すると、ウイルス増殖によって軽い細胞変性効果 (CPE) が認められるものの、より確実にウイルス液の回収適期を調べるためには、ウイルス分離同様にウイルス接種する細胞にあらかじめカバースリップを入れておき、無菌的にカバースリップを回収して蛍光抗体法によって抗原が細胞シート全体に広がっていることを確認する。回収した培養上清は遠心 (1,000r. p. m.、5分) し、浮遊している細胞を除去する。

(オ) 遠心上清をさらに3,000r. p. m. で15分の遠心によって細胞片を除去し、0.5ml ずつ小分注する。分注したウイルス液は-80°Cに保存し、凍結融解したウイルスの力価を測定する。

イ ウイルス力価の測定方法

(ア) CPK-NS 細胞をトリプシン消化し、2回の遠心洗浄操作を行って細胞浮遊液を調整しておく。細胞は通常継代する場合と同量の無血清培地に再浮遊させる。

(イ) 測定したいウイルス液を無血清培地で10倍階段希釈する。

(ウ) 96穴マイクロプレートに希釈したウイルス液を各穴100 μ l ずつ入れる。

(エ) 調整した細胞浮遊液を各穴100 μ l ずつ入れ、37°Cの炭酸ガス培養器内で7日間培養する。

(オ) 細胞表層に観察される CPE を指標に、ウイルス力価 (TCID₅₀) を求める。

ウ 中和抗体測定方法

(ア) 非働化済みの被検血清50 μ Lを96穴マイクロプレートに入れ、無血清培養液50 μ Lで2倍階段希釈し、16倍希釈までの各穴50 μ Lの4管 (2倍~16倍) 希釈列を2列作製する。この際、ウイルスを接種しない細胞対照用及びバックタイトレーション用にそれぞれ無血清培養液100 μ L及び50 μ Lずつ入れた穴も用意する。

(イ) 96穴マイクロプレートに100 μ L当たり200 TCID₅₀に調整したウイルス液を50 μ Lずつ血清希釈列に接種する。同時に調整したウイルス液の10倍階段希釈列を無血清培養液50 μ Lを入れた穴に各穴50 μ Lずつ接種し、バックタイトレーションする。

(ウ) プレートを攪拌後、37°Cの炭酸ガス培養器内で1時間感作させる。

(エ) 感作中に CPK-NS 細胞をトリプシン溶液で消化し、2回の遠心・洗浄操作を行って細胞浮遊液を調整しておく。細胞は通常継代する場合と同量の培養液に再浮遊させる。

(オ) 細胞浮遊液を各穴100 μ Lずつ入れ、37°Cの炭酸ガス培養器内で7日間培養す

る。

(カ) 細胞表層に認められる CPE を指標に中和抗体価を求める。

5 検査結果の取扱い

酵素免疫測定法又は中和試験によって、陽性又は疑陽性の所見がみられた場合には、防疫指針第4の6に基づき対応する。

6 その他

いのししについても本マニュアルを準用して検査を実施する。

(別紙2)

豚の評価額の算定方法

1 肥育豚

(1) 評価額の基本的な算定方法

素畜の導入価格 + 肥育経費 (1日当たりの生産費 × 飼養日数)

(2) 素畜の導入価格及び肥育経費の算定方法

- ① 導入価格は、素畜の導入に要した費用とし、購入伝票等により確認する
- ② 素畜を自家生産している場合又は導入価格を確認することができない場合には、産み落とし価格を用いることとし、その算定方法については、直近年度の畜産物生産費における肥育豚生産費の100分の9を乗じて算定する。
- ③ 1日当たりの生産費は、全算入生産費から産み落とし価格を除いた額を肥育期間(平均販売月齢)で除した費用に100分の50を乗じた前期1日当たり生産費(生まれた日から70日齢まで)及び100分の130を乗じた後期1日当たり生産費(71日齢から出荷されるまで)を算定する。
- ④ 飼養日数は、素畜を導入する場合には導入した日から、繁殖・肥育一貫経営等の場合には素畜が生まれた日から患畜又は疑似患畜と判定された日までの日数とする。

[参考] 1日当たり生産費(平成23年度畜産物生産費調査)

● 産み落とし価格(全国平均)

全算入生産費 31,903円 × 豚肉生産コスト全体に対する子豚生産に要するコストの割合 9%
= 2,871円

● 肥育豚の1日当たり生産費(全国ベース)

(全算入生産費 31,903円 - 産み落とし価格 2871円) ÷ (肥育期間 6.4か月 × 30.4日)
= 149円

・前期1日当たり生産費(0~2.3か月齢) : 1日当たり生産費の50% = 75円

・後期1日当たり生産費(2.3~6.4か月齢) : 1日当たり生産費の130% = 194円

【例】 肥育豚を出荷時(6.4か月齢)で評価

[100日齢の子豚を導入している場合]

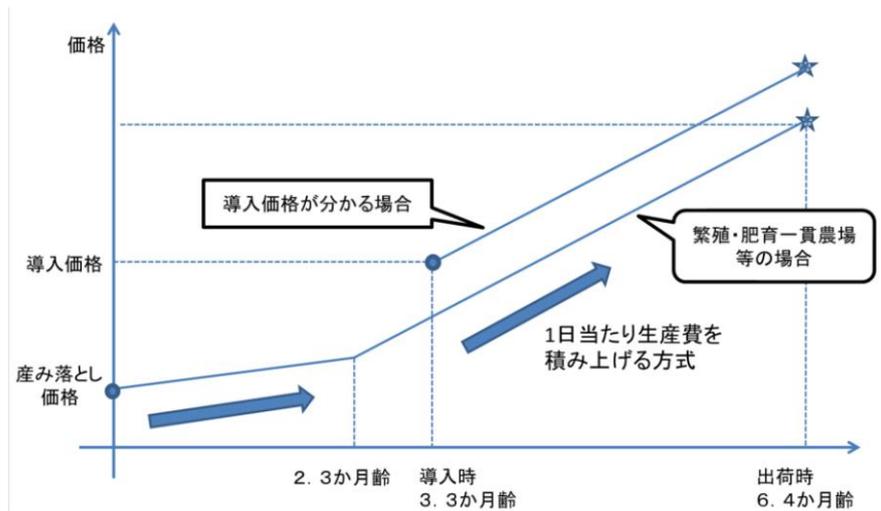
導入価格※ 1日当たりの生産費 × 飼養日数
15,220円 + (194円 × (6.4か月 - 3.3か月) × 30.4日) = 33,503円

※この試算例では農業物価統計を用いて導入価格を設定

[繁殖・肥育一貫経営等で導入価格がない場合]

産み落とし価格 1日当たりの生産費 × 飼養日数
2,871円 + ((75円 × 2.3か月) + (194円 × 4.1か月)) × 30.4日 = 32,295円

肥育豚



2 繁殖雌豚

【繁殖雌豚（未経産）】

(1) 評価額の基本的な算定方法

素畜の導入価格 + 育成経費（1日当たりの生産費×飼養日数）+ 受胎加算金

(2) 素畜の導入価格及び育成経費の算定方法

- ① 導入価格は、素畜の導入に要した費用とし、家畜市場の購入伝票等により確認する。
- ② 導入価格を確認することができない場合又は素畜を自家生産している場合には、当該家畜の所有者が通常利用している家畜市場における当該素畜と同等の豚（品種、用途（繁殖向等）等が同一の豚）の平均取引価格（直近1年間のもの）とする。
- ③ 1日当たりの生産費は、生産費調査における肥育豚の1日当たりの生産費を利用する
- ④ 飼養日数は、素畜を導入した日から患畜又は疑似患畜と判定された日までの日数とする。
- ⑤ 受胎している場合には、受胎分として母豚価値の2割相当を加算する（ただし、獣医師による妊娠鑑定等により受胎が確認できる場合に限る。）。

【繁殖雌豚（経産）】

(1) 評価額の基本的な算定方法

初産時基準価格×評価指数／100 + 受胎加算金

(2) 初産時基準価格及び評価指数の算定方法

- ① 初産時基準価格は、次により算定する。
素畜の導入価格 + 平均初産月齢までの育成経費（1日当たりの生産費×飼養日数）
なお、素畜の導入価格及び育成経費は繁殖雌豚（未経産）と同様の算定方法とする。
- ② 評価指数は、初産時の評価を100とした際の経年による価値の減少分を指数化したものであり、各都道府県の家畜共済金支払制度を活用し算定する。
- ③ 1日当たりの生産費は、生産費調査における肥育豚の1日当たりの生産費を利用する。
- ④ 受胎している場合には、受胎分として母豚価値の2割相当を加算する（ただし、獣医師による妊娠鑑定等により受胎が確認できる場合に限る。）。

(別紙3)

豚コレラ対策における野生いのしし対応マニュアル

野生いのしし群に豚コレラウイルスが侵入した場合には、野生いのしし群から飼養豚（飼養いのししを含む。以下同じ。）へのウイルスの侵入防止対策が重要である。このため、行政機関及び関係団体が連携・協力して、以下により本病対策における野生いのしし対応を進める。

1 発生前の対応

発生時の2及び3の対応を的確に実施するため、都道府県の家畜衛生担当部局は、野生いのししにおける家畜の伝染性疾病の病原体感染状況の調査等の取組も通じ、野生動物担当部局等の関係部局、猟友会等の関係機関及び団体との間の連携・協力体制の構築に努める。

2 飼養豚で患畜又は疑似患畜が確認された場合の対応

(1) 連絡体制

飼養豚において、豚コレラの患畜又は疑似患畜が確認された場合には、農林水産省消費・安全局動物衛生課（以下「動物衛生課」という。）は、環境省自然環境局野生生物課並びに患畜又は疑似患畜が確認された農場（以下「発生農場」という。）及び発生農場から半径10キロメートル以内の区域をその区域に含む都道府県の家畜衛生担当部局に連絡する。連絡を受けた都道府県の家畜衛生担当部局は、当該都道府県の野生生物担当部局等の関係部局、猟友会等の関係団体に連絡する。

(2) 周辺の野生いのしし群におけるウイルスの浸潤状況確認

- ① 都道府県の家畜衛生担当部局は、発生農場及び疫学情報から豚コレラの感染源となりうると考えられた地点を中心とした半径10キロメートル以内の区域（移動制限区域）において、少なくとも28日間、死亡した野生いのしし及び捕獲された野生いのししについて、原則として抗原検査及び血清抗体検査を実施するための検体を採材する。このため、都道府県の家畜衛生担当部局は野生生物担当部局に対し、当該区域において、死亡した野生いのししを発見した場合又は野生いのししが捕獲された場合には、家畜衛生担当部局に連絡することについて猟友会等の関係者への協力を要請するよう依頼するとともに、これら野生いのししからの検体の採材に協力するよう依頼する。
- ② 都道府県の家畜衛生担当部局は、採材した検体について、抗原検査及び血清抗体検査を実施する。

(3) 周辺の野生いのしし群におけるウイルス拡散防止対策

都道府県の家畜衛生担当部局は野生生物担当部局に対し、移動制限区域において死亡した野生いのしし及び捕獲された野生いのししは、焼却又は埋却も含め適切に処理することとし、現場に放置しないよう、猟友会等の関係者への協力を要請するよう依頼する。

3 野生いのししから豚コレラウイルスが検出された場合又は豚コレラウイルスに対する抗体が検出された場合の対応

(1) 連絡体制

2の(1)による。

(2) 確認場所の消毒等

都道府県の家畜衛生担当部局は、関係機関・団体の協力を得て、当該野生いのししを確保した地点の消毒、必要に応じた通行の制限又は遮断を行う。

(3) 周辺の野生いのしし群におけるウイルスの浸潤状況確認

2の(2)による。なお、対象区域は当該野生いのししを確保した地点を中心とした半径10キロメートル以内の区域とし、対象期間は(2)の消毒終了後少なくとも28日間とする。

(4) 周辺の野生いのしし群におけるウイルス拡散防止対策

2の(3)による。なお、対象区域は当該野生いのししを確保した地点を中心とした半径10キロメートル以内の区域とし、対象期間は(2)の消毒終了後少なくとも28日間とする。

(5) 飼養豚での発生を早期に摘発するための対策

① 都道府県の家畜衛生担当部局は、当該野生いのししを確保した地点を中心とした半径10キロメートル以内の区域の全ての豚(いのししを含む。以下同じ。)飼養農場に対する立入検査を行い、死亡豚やひね豚の増加等の異状の有無を確認する。また、必要に応じて病性鑑定を実施するための検体を採材し、抗原検査又は血清抗体検査を実施する。

② 都道府県の家畜衛生担当部局は、当該野生いのししを確保した地点を中心とした半径10キロメートル以内の区域の全ての豚飼養農場に対し、(2)の消毒終了後少なくとも28日間、飼養豚の死亡状況等の報告を定期的に求める。