

動薬協会発 95号  
平成25年7月2日

公益社団法人日本動物用医薬品協会  
会 員 各 位

公益社団法人日本動物用医薬品協会  
理事長 福 井 邦 顯  
( 公 印 省 略 )

「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」の全部改正について

当協会の業務運営につきましては、日頃からご支援、ご協力を頂きお礼申し上げます。  
さて、標記のことについて、農林水産省消費・安全局長より通知がありましたのでお知  
らせします。



25消安第1193号  
平成25年6月26日

社団法人 日本動物用医薬品協会理事長 殿

農林水産省消費・安全局長



「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」の全部改正について

このことについて、別添のとおり都道府県知事宛て通知いたしましたので、御了知の上、円滑な防疫対策の実施につき協力方よろしくお願いいたします。



写

25消安第1193号

平成25年6月26日

都道府県知事 殿

農林水産省消費・安全局長

「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」の全部改正について

豚コレラについては、家畜伝染病予防法（昭和26年法律第166号）第3条の2第1項に基づき公表されている「豚コレラに関する特定家畜伝染病防疫指針」（平成18年3月31日農林水産大臣公表。以下「防疫指針」という。）に従い、本病の発生予防及びまん延防止対策を進めてきたところです。

本日、防疫指針が全部変更されたことに伴い、「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18年3月31日付け17消安第11229号農林水産省消費・安全局長通知）の全部を別添のとおり改正しましたのでお知らせします。

つきましては、このことについて御了知いただくとともに、管内市町村、関係機関及び関係団体に周知の上、地域一体となって、本病の発生予防及びまん延防止措置の迅速かつ円滑な実施に御尽力いただきますようお願いいたします。

# 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25年6月26日付25消安第1193号農林水産省消費・安全局長知)

(別添)

## 第1 畜産物を含む食品残さの適切な処理について (防疫指針第2の2 関連)

畜産物を含む食品残さの処理は、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2 抗体保有状況調査について (防疫指針第3の2 関連)

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3 種豚の抗体保有状況調査 (防疫指針第3の2 関連)

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、当該検

査のために採材される血液を用いても差し支えない。

第4 病性鑑定材料を用いた調査における検査方法について（防疫指針第3の3関連）  
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  
PCR検査又は蛍光抗体法
- (2) 血清抗体検査  
エライザ法又は中和試験

第5 家畜防疫員が現地に携行する用具（防疫指針第4の1関連）  
家畜防疫員が現地に携行する用具は、次に掲げるものとする。

- (1) 農場立入用衣類：長靴、防疫衣類、手袋等
- (2) 臨床検査用器材：体温計、保定具、ロープ（保定用）、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、採血管等））、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、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：ビニール袋、着替え、食料品等

第6 都道府県が行う指導に関する事項（防疫指針第4の1関連）

1 家畜防疫員が通報者等に対して指導を行う場合にあっては、次に掲げる事項について行うものとする。

- (1) 豚等の所有者から通報があった場合
  - 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 飼養場所の排水については、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 異状が確認された豚等（以下「異常豚」という。）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) 獣医師から通報があった場合

- 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、豚等の所有者に対し、(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 異常豚が豚コレラでないとは判明するまでの間、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、又はその死体を検索した日から7日間は、豚等の飼養施設に立ち入らないこと。

(3) 家畜市場から通報があった場合

- ① 豚等の移動を禁止すること。
- ② 従業員等が外出する場合には、適切な消毒等を行うこと。
- ③ 従業員等は、異常豚が豚コレラの患畜及び疑似患畜のいずれでもないことが判明するまでの間、豚等の飼養施設に立ち入らないこと。
- ④ 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。

(4) と畜場から通報があった場合

- ① 豚等の移動を禁止すること。
- ② 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こと。
- ③ 畜産関係車両の出入りを禁止すること。
- ④ 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 従業員等は、異常豚が豚コレラの患畜及び疑似患畜のいずれでもないことが判明するまでの間、豚等の飼養施設に立ち入らないこと。

2 家畜防疫員は、1の(3)及び(4)の場合にあつては、通報に係る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)の①から⑤までについての指導を行う。また、当該異常豚の出荷に使用された車両を特定し、家畜当該車両の消毒を徹底するとともに、当該車両が農場等に出入りしないよう、併せて指導する。

第7 異常豚の届出を受けた際の報告(防疫指針第4の2関連)

都道府県畜産主務課は、豚等の所有者又は獣医師から、豚コレラを疑う症状を呈している豚等を発見した旨の届出を受けた場合には、別記様式1により、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。)宛てに報告する。

第8 抗原検査に供する検体の採材について(防疫指針第4の3関連)

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9 疫学情報の報告（防疫指針第4の3 関連）

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10 陽性判定時に備えた準備に関する報告（防疫指針第4の4 関連）

陽性判定時に備え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。

#### 第11 病性鑑定について（防疫指針第4の5 関連）

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12 検体の送付について（防疫指針第4の5 関連）

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所（以下「動物衛生研究所」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13 豚コレラウイルスの感染が否定される場合（防疫指針第4の8 関連）

豚コレラウイルスの感染が否定される場合とは、防疫指針第4の5の（1）の検査（第4の6の対応において行うものを含む。）が全て陰性であった場合又は血液検査等で陽性となった場合であって、他の検査の結果、動物衛生研究所に送付する必要がなくなった場合をいう。

#### 第14 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（防疫指針第4の8 関連）

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

動物衛生研究所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15 病性等判定日を起算点とする日数の数え方（防疫指針第5の2 関連）

病性等判定日当日は、不算入とする。

第16 通報に係る異状の原因調査（防疫指針第6の1 関連）

アフリカ豚コレラウイルスの感染が否定できない場合には、動物衛生課と協議の上、必要な検体を動物衛生研究所に送付する。

第17 都道府県対策本部（防疫指針第6の2 関連）

都道府県は、以下に記載する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行う。なお、必要に応じて、患畜又は初発の疑似患畜が確認された農場（以下「発生農場」という。）等における防疫措置を円滑に行うため、家畜保健衛生所等に現地対策本部を設置する。

【組織構成】

都道府県知事を本部長とし、本部長の下に次の各班を置くとともに、関係部局を構成員とする庁内連絡会議を開催し、防疫の円滑な推進を図ること。

- ・ 総務班：国の防疫に関する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及び庁内連絡会議の開催を行う。
- ・ 情報班：発生状況、防疫対応状況等に関する情報の収集、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材、当該検体の受入れ及び動物衛生研究所への送付並びに病性鑑定を行う。
- ・ 防疫指導班：発生農場の調査並びに防疫措置の企画及び指導を行う。
- ・ 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事業の調整を行う。
- ・ 防疫対応班：立入制限、殺処分、農場消毒等の防疫措置、移動制限区域及び搬出制限区域内の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豚等や物品の評価等を行う。
- ・ 疫学調査班：防疫指針第12の1の疫学調査を行い、疫学関連農場の特定や感染経路の究明に必要な情報の収集及び整理を行う。また、国の疫学調査チームと連携し、現地調査等を行う。

- ・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。

#### 第18 報道機関への公表（防疫指針第6の3関連）

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。

#### 第19 防疫措置に必要な人員の確保に関する事項（防疫指針第6の4関連）

都道府県は、防疫措置に必要な人員の確保に当たっては、次に掲げる事項に留意する。

- (1) 豚コレラの発生が確認された時点で、速やかに防疫措置を開始することができるよう、あらかじめ必要な人員の所在を把握すること。
- (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らせないようにすること。
- (3) 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こと。
- (4) 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20 発生農場における防疫措置の実施に関する事項（防疫指針第7の1関連）

発生農場における防疫措置の実施に当たっては、次に掲げる事項に留意する。

- (1) 都道府県は、事前に現地調査を行い、農場の建物の配置等を考慮して、テントの設営場所、資材置場等について検討するとともに、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) 家畜防疫員は、と殺に際しては、ねずみ、はえ等の駆除を実施すること。
- (5) 都道府県は、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については、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21 防疫措置従事者に関する事項（防疫指針第7の1関連）

防疫措置従事者は、防疫措置を実施するに当たっては、次に掲げる事項に留意する。併せて、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い、作業の前後で防疫措置従事者の動線が交差しないように留意する。

- (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、身体のほか、衣服、靴及び眼鏡を消毒した後、入場時に着用した作業着等を脱ぎ、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、外装を噴霧消毒した後持ち帰ること。
- (3) 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。
- (4) 防疫作業に従事した日から7日間は発生農場以外の家畜に接触しないこと。

#### 第22 と殺指示書の交付（防疫指針第7の1 関連）

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。

#### 第23 死体の化製処理を行った上で焼却する際の措置（防疫指針第7の2 関連）

死体の化製処理を行った上で焼却する場合においては、必要に応じて、防疫指針第7の2の（4）に準じた措置を講じる。

#### 第24 汚染物品の化製処理を行った上で焼却する際の措置（防疫指針第7の3 関連）

汚染物品の化製処理を行った上で焼却する場合においては、必要に応じて、防疫指針第7の3の（3）に準じた措置を講じる。

#### 第25 豚等の評価額の算定方法（防疫指針第7の5 関連）

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26 移動制限区域内における指導事項（防疫指針第9の1 関連）

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。

- (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、入退場時の消毒を徹底すること。
- (2) 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。
- (3) 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。
- (4) 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。
- (5) 野生いのししと豚等の接触が想定される地域にあっては、接触防止のための畜舎出入口の囲障を設置すること。

第27 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（防疫指針第9の5 関連）

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28 豚等の集合を伴わない催物等に関する事項（防疫指針第10の3 関連）

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29 車両消毒等に関する事項（防疫指針第11の3 関連）

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。

ア 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。

イ 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30 疫学調査に関する事項（防疫指針第12の1 関連）

都道府県は、疫学調査の実施に当たっては、次に掲げる事項に留意する。

- (1) 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。
- (2) 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31 疫学調査に関する実施項目（防疫指針第12の1 関連）

本病の感染経路をあらゆる面から検証するため、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、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

### 第32 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（防疫指針第12の2 関連）

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。

飼養頭数	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33 ワクチン受領書及びワクチン使用報告書（防疫指針第13関連）**

ワクチンの受領は、別記様式6により行う。また、ワクチンの使用が終了した場合には、別記様式7により、動物衛生課に報告する。

**第34 ワクチンの取扱い等に関する事項（防疫指針第13関連）**

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35 豚等の再導入に関する事項（防疫指針第14関連）**

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病原体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、再導入を予定している農場に対し、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指導する。また、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、併せて指導する。
- 3 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36 野生動物における感染確認検査に関する事項（防疫指針第15関連）**

都道府県は、次により、野生動物における感染確認検査を行う。

- 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。
- 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) 当該野生動物を確保した地点の消毒及び通行の制限・遮断
  - (2) 当該地点から半径10k m圏内の豚等の所有者に対する注意喚起及び飼養している豚等の異状の有無の確認
- 3 2の(1)及び(2)の措置は、豚等での感染が確認される前に、1の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。

(別記様式1)

異常豚の届出を受けた際の報告

〇〇県〇〇家畜保健衛生所

- 1 届出受理年月日時間： 年 月 日 時 分
- 2 届出者  
氏 名： (職 業： )  
住 所： (電話番号： )
- 3 異常豚の所在  
住 所： (電話番号： )  
所有者氏名：
- 4 届出事項  
(畜種別、繁殖、育成又は肥育等の用途別に聴き取ること。)  
飼養頭数：  
うち異常頭数：
- 5 おおまかな症状、病歴及び診療履歴等：
- 6 既に講じた措置：
- 7 その他関連事項(疫学情報等)：
- 8 届出者への指示事項：
- 9 届出受理者氏名：
- 10 処置  
(1) 通報(時間)  
所長： 都道府県畜産主務課：  
(2) 現地調査  
氏名： 出発時間：

(別記様式2)

異常豚が所在する農場等に関する疫学情報(現地調査票)

都道府県：  
家畜保健衛生所：  
担当：

- 1 現地調査 日時： 年 月 日 時 分
- 2 豚等の所有者 住所：  
畜舎の所在地(家畜所有者の住所と異なる場合)：  
氏名：
- 3 農場従業員数及び農場管理責任者名：
- 4 家畜種及び飼養形態：
- 5 飼養頭数：
- 6 病畜頭数：
- 7 症状、病変及び病歴(経時的に詳細に記載)：
- 8 病性鑑定材料(部位、検体数及び保管方法)：
- 9 当面の措置状況(検体送付後の措置等)：
- 10 過去28日間に当該農場に出入りした豚等の履歴：
- 11 過去28日間に出入りした人・車両の履歴及びそれらの巡回範囲  
(1) 人(獣医師、人工授精師)：  
(2) 車両(家畜運搬車両、飼料運搬車両、死亡畜回収車両及び堆肥運搬車両)：
- 12 堆肥の出荷先：
- 13 精液及び受精卵の出荷先：
- 14 その他参考となる事項(周辺農場の戸数(3km、10km)、周辺農場の豚等の様子等)：

(別記様式3)

病 性 鑑 定 依 頼 書

平成 年 月 日

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構  
動物衛生研究所長 殿

依頼機関代表者・氏名 (印)

下記のとおり病性鑑定を依頼いたします。

記

- 1 動物種 (品種、性別、個体識別番号等を含む。)
- 2 鑑定材料 (種類及び数量を含む。)
- 3 鑑定目的  
豚コレラの診断
- 4 発生状況  
別添のとおり (別記様式2を添付)
- 5 連絡先
- 6 その他特記事項

(別記様式4)

プレスリリース

平成 年 月 日  
農 林 水 産 省  
[ ○ ○ 県 ]

### 豚コレラの（疑似）患畜の確認について

- ・本日、家畜伝染病である「豚コレラ」の（疑似）患畜が〇〇県〔県内〕で確認されました。
- ・当該農場は、感染が疑われるとの報告があった時点から飼養豚（いのしし）の移動を自粛しています。なお、豚コレラは、豚、いのししの病気であり、人に感染することはありません。
- ・現場での取材は、本病のまん延を引き起こすおそれもあること、農家の方のプライバシーを侵害しかねないことから、現に慎むようお願いいたします。

#### 1 農場の概要

所在地：〇〇県〇〇市〇〇

飼養状況：〇〇豚（いのしし） 飼養頭数 〇〇頭

#### 2 経緯

- (1) 〇〇月〇〇日、〇〇から〇〇である旨、〇〇家畜保健衛生所に通報がありました。
- (2) 同日、〇〇家畜保健衛生所の家畜防疫員が現地調査を行うとともに、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所に検体を送付しました。
- (3) 同研究所による〇〇検査及び〇〇検査で陽性となったことから、豚コレラの（疑似）患畜と判定しました。

#### 3 今後の対応

農林水産省は、本日の豚コレラ防疫対策本部で決定したとおり、以下の対応方針に基づき、初動防疫を開始します。

- (1) 「豚コレラに関する特定家畜伝染病防疫指針」(平成25年●月●日農林水産大臣公表)に基づき、当該農場の飼養されている豚等のと殺、埋却及び移動制限区域の設定等の必要な防疫措置を迅速かつ的確に実施する。
- (2) 移動制限区域内の農場について、速やかに発生状況確認検査を実施する。
- (3) 感染拡大防止のため、発生農場周辺の消毒を強化し、主要道に消毒ポイントを設置。
- (4) 県との的確な連携を図るため、大臣、副大臣、政務官が県と密接に連絡をとる。(現地派遣又は電話連絡)。
- (5) 感染状況、感染経路等を正確に把握し、的確な防疫方針の検討を行えるようにするため、農林水産省の専門家を現地に派遣する。
- (6) 殺処分・埋却等の防疫措置を支援するため、動物検疫所から「緊急支援チーム」を派遣する。
- (7) 感染経路の究明のため、「疫学調査チーム」を派遣する。
- (8) 全都道府県に対し、本病の早期発見及び早期通報の徹底を通知する。
- (9) 関係府省と十分に連携を図りつつ、生産者、消費者、流通業者等への正確な情報の提供に努める。

#### 4 その他

- (1) 豚コレラは、豚、いのししの病気であり、人に感染することはありません。また、感染豚の肉が市場に出回ることはありませんが、仮に感染豚の肉を摂取しても人体に影響はありません。
- (2) 現場での取材は、本病のまん延を引き起こすおそれもあること、農家の方のプライバシーを侵害しかねないことから、厳に慎むよう御協力をお願いいたします。
- (3) 今後とも、迅速で正確な情報提供に努めますので、生産者等の関係者や消費者が根拠のない噂などにより混乱することがないように、御協力をお願いいたします。

お問合せ先

所属：〇〇

担当：〇〇

TEL：〇〇

FAX：〇〇

(別記様式5)

と 殺 指 示 書

番 号  
年 月 日

〇〇 殿

〇〇家畜保健衛生所  
家畜防疫員〇〇 (印)

あなたが所有する(管理する)次の豚等は、豚コレラの患畜(疑似患畜)と判定されたので、家畜伝染病予防法(昭和26年法律第166号)第16条第1項の規定に基づき、下記によりと殺することを指示する。

豚等の所在する場所

豚等の種類、頭数及び耳標番号

記

- 1 と殺を行う場所
- 2 と殺の方法
- 3 そ の 他

(備 考)

- 1 この指示については、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はできません。
- 2 この指示に違反した場合には、3年以下の懲役又は100万円以下の罰金に処せられます。
- 3 この指示によりと殺された豚等については、家畜伝染病予防法第58条第1項及び第2項の規定により手当金及び特別手当金が交付されます。  
ただし、本病の発生を予防し、又はまん延を防止するために必要な措置を講じなかったと認められる者等に対しては、手当金若しくは特別手当金の全部若しくは一部を交付せず、又は交付した手当金若しくは特別手当金の全部又は一部を返還させることがあります。

(別記様式6)

受 領 書

年 月 日

農林水産省消費・安全局動物衛生課長 殿

都道府県知事 氏 名 (印)

年 月 日付け農林水産省指令 消安第 号の豚コレ  
ラ予防液使用及び譲与指令書に基づき、下記の物品を正に受領いたしました。

記

品 名 豚コレラ予防液

数 量 型 (ロット番号) 本 ( ドーズ)

(別記様式7)

豚コレラ予防液使用報告書

年 月 日

農林水産省消費・安全局長 殿

都道府県知事 氏名 (印)

年 月 日に譲与(貸付け)を受けた豚コレラ予防液の使用について、下記のとおり報告いたします。

記

- 1 受領数量 型(ロット番号)  
本(ドーズ)
- 2 使用数量 型(ロット番号)  
本(ドーズ)
- 3 残数量 型(ロット番号)  
本(ドーズ)
- 〔 うち処分数量 型(ロット番号)  
処分理由: 本(ドーズ) 〕
- 4 返還数量 型(ロット番号)  
本(ドーズ)

5 注射実施状況

実施市町村名	実施時期 月 日 ~ 月 日	注射頭数		備考(注射反応、 個体識別番号等)
		家畜の種類	頭数	
		豚 いのしし 計		
~~~~~				
累 計	月 日 ~ 月 日	豚 いのしし 計		

※ 家畜保健衛生所において、住所、農場、使用者、接種家畜リスト等について記載した個票を備えておくこと。

※ 豚コレラ予防液を処分する際には、その型、本数が分かる写真を撮り、本報告書に添付すること。

## 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テ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) やポーター病ウイルス (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テ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。先天性持続感染 (遅発感染) では数か月間も気付かれることなく、群れの子豚の一部にみられる。臨床症状に特徴はなく、発熱を伴わずに消耗していく。ウイルス特異抗体は産生されず、ウイルスが血液中にみられる免疫寛容の状態となっている。慢性感染や遅発感染した豚は必ず死亡し、農場内の死亡率がわずかに上昇することとなる。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“ポタン状”潰瘍がみられる。

組織病理学的所見では、特徴はみられない。病変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がみられる。

本病は多様な臨床症状と病変を呈するため、臨床所見から診断することは難しく、特に急性豚コレラは、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。また、こうした細菌は同時感染することもあり、豚コレラウイルスが真の原因か明確でないこともある。

したがって、実験室における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、反すう動物のペステ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よりもむしろ、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ので、最低1週間は観察を続ける必要がある。培養細胞の準備が整うまで、ウイルスの存否をある程度判断するためにRT-PCRを行うことは有意義であるが、交差汚染やRT-PCR産物の同定（遺伝子解析が必要）の問題があり、最終的にウイルス分離に検査の力点を置くことを忘れてはならない。

なお、準備不足が診断を遅らせる要因となることから、日頃からの器具及び器材の維持並びに確認を行い、本病を疑う症例の通報を受けた時点で、冷却用のドライアイスが準備されていること、クリオスタットの冷却機スイッチが入っていること、継代細胞があること等迅速診断に必要な準備が整うよう診断体制の整備に努める必要がある。また、採材や検査に供した器具や器材等は、適切に滅菌又は消毒する必要がある。

## 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、組織構造を考慮した採材が必要である。採取した材料は個体別に滅菌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ているものと考えられるため、その取扱いには十分注意する。

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、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1cm×5mm（扁桃）あるいは1cm×1cm（腎臓、脾臓）程度の大きさで、それぞれ3個ずつ切り出す。

イ 残りの組織1g程度を乳剤作製用にシャーレに取り、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°C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°C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) の力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

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

カバースリップ標本を作製するため、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症例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、希釈した乳剤も必ず併せて接種する。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°C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 μm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0.2～0.3 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には保存する。）。

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。いずれの製品もグアニジン等強力な変性剤によってたん白質を変性させてRNAを溶出するもので、最終的にスピンカラムあるいは酸フェノールによってRNAを分離する。抽出材料はウイルス分離材料の調整段階でマイクロチューブに必要量(キットにもよるが、50~400 $\mu$ lの範囲)を分注しておく、ウイルス分離材料の感染性低下を招く凍結融解を繰り返す心配がない。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で、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テ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Tm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 TAG-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テ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BglII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)、BglII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。したがって、ワクチン接種中止後の本病ウイルス野外感染の有無を監視することを目的として抗体検査を行う。一般に本病生ワクチンを接種された豚は、生涯、本病ウイルスに対する抗体を持ち続ける。このため、野外においては、ワクチン接種豚がすべて更新されるまで、国内にワクチン抗体保有豚が存在し続けることとなる。しかしながら、ワクチンによる抗体と野外感染による抗体の識別は困難であるため、抗体検査の結果はワクチン接種歴、導入履歴及び移行抗体の存在等を十分に考慮した上で評価する必要がある。また、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。

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℃、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み合わせによって、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細胞はウイルスがよく増殖しないため、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利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、通常の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、25cm<sup>2</sup> (75cm<sup>2</sup>) の場合は、15 mL (45 mL) に浮遊させ、5 mL (15 mL) 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°C、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(1,000 r.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(1,000 r.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°C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カ価及び中和カ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(1,000 r.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3,000 r. p. m. で15分の遠心によって細胞片を除去し、0.5 ml 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  $\mu$ l ずつ入れる。

(エ) 調整した細胞浮遊液を各穴100  $\mu$ 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 (TCID<sub>50</sub>) 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  $\mu$ Lを96穴マイクロプレートに入れ、無血清培養液50  $\mu$ Lで2倍階段希釈し、16倍希釈までの各穴50  $\mu$ 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  $\mu$ L及び50  $\mu$ 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  $\mu$ L当たり200 TCID<sub>50</sub>に調整したウイルス液を50  $\mu$ 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  $\mu$ Lを入れた穴に各穴50  $\mu$ 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  $\mu$ 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。

## 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)

$$\text{全算入生産費} 31,903\text{円} \times \text{豚肉生産コスト全体に対する子豚生産に要するコストの割合} 9\% = \boxed{2871\text{円}}$$

#### ● 肥育豚の1日当たり生産費(全国ベース)

$$(\text{全算入生産費} 31,903\text{円} - \text{産み落とし価格} 2871\text{円}) \div (\text{肥育期間} 6.4\text{か月} \times 30.4\text{日}) = 149\text{円}$$

$$\cdot \text{前期1日当たり生産費}(0 \sim 2.3\text{か月齢}) : \text{1日当たり生産費の} 50\% = \boxed{75\text{円}}$$

$$\cdot \text{後期1日当たり生産費}(2.3 \sim 6.4\text{か月齢}) : \text{1日当たり生産費の} 130\% = \boxed{194\text{円}}$$

【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]

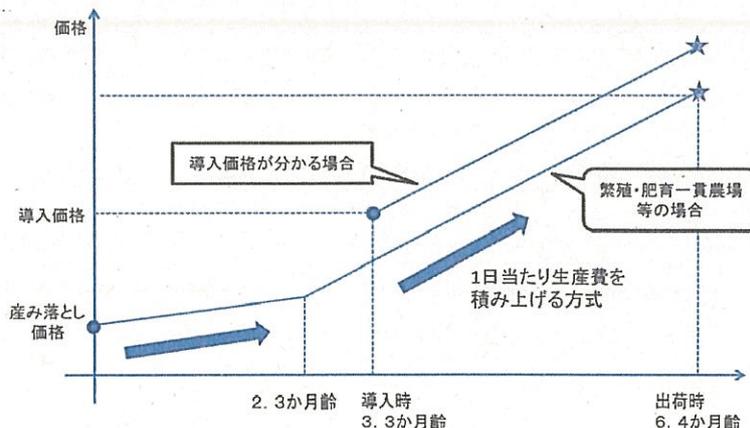
$$\begin{array}{l} \text{導入価格}^* \\ 15,220\text{円} \end{array} + \begin{array}{l} \text{1日当たりの生産費} \times \text{飼養日数} \\ (194\text{円} \times (6.4\text{か月} - 3.3\text{か月}) \times 30.4\text{日}) \end{array} = \boxed{33,503\text{円}}$$

※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]

$$\begin{array}{l} \text{産み落とし価格} \\ 2871\text{円} \end{array} + \begin{array}{l} \text{1日当たりの生産費} \times \text{飼養日数} \\ ((75\text{円} \times 2.3\text{か月}) + (194\text{円} \times 4.1\text{か月})) \times 30.4\text{日} \end{array} = \boxed{32,295\text{円}}$$

### 肥育豚



## 2 繁殖雌豚

### 【繁殖雌豚（未經産）】

#### (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

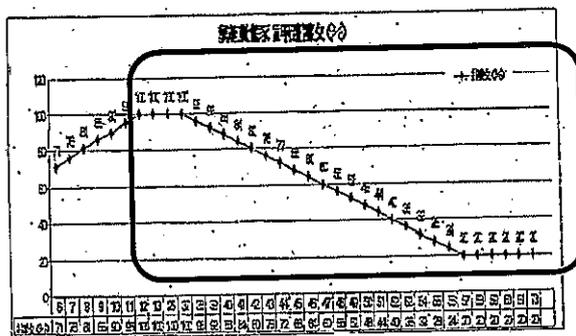
#### (2) 初産時基準価格及び評価指数の算定方法

##### 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（未經産）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。



【参考】宮崎県が口蹄疫発生時に利用した評価指数（繁殖雌豚）：各都道府県が同様のものを独自に保有している

- 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。）。

#### 【例】繁殖雌豚を初産時（約12か月齢）で評価

導入価格 (1日当たりの生産費×飼養日数) 妊娠加算分  
 { 55,280円（繁殖用雌豚（雑種）平均購入価格） + 194円×（12か月－3.3か月）×30.4日 } ×1.2  
 = 127,779円