

17消安第11229号
平成18年3月31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

本日、家畜伝染病予防法（昭和26年法律第166号。以下「法」という。）第3条の2第1項の規定に基づき、豚コレラに関する特定家畜伝染病防疫指針（以下「防疫指針」という。）が公表されたところであるが、防疫指針に基づく発生予防及びまん延防止措置の迅速かつ円滑な実施に当たっての留意事項を別添のとおり定めたので、御了知願いたい。

なお、防疫指針の公表に伴い、「豚コレラ防疫対策要領」（平成8年5月10日付け8畜A第1243号農林水産省畜産局長通知）、「豚コレラ防疫対策の推進に当たっての留意事項」（平成12年10月1日付け12-96農林水産省畜産局衛生課長通知）及び「家畜伝染病予防法施行規則の一部を改正する省令の公布について」（平成12年9月28日付け12畜A第2689号農林水産省畜産局長通知）を廃止したので、御了知願いたい。

また、豚コレラ予防液（以下「予防液」という。）については、法第50条の規定に基づきその使用が制限されているが、その運用に当たっては、下記事項に留意の上、遺漏なきようお願いする。

記

1 使用の制限の必要性

- (1) 予防液については、平成8年度以降計画的に実施してきた本病撲滅対策の成果を踏まえ、平成12年10月以降原則として全国的にこれを用いない防疫措置に移行するとともに、予防液を使用した豚と予防液を使用していない豚が識別できないことによって生ずる防疫上の混乱を避けるため、法第50条の規定によりその使用につき都道府県知事の許可を要する動物用生物学的製剤に指定された。
- (2) これらの措置により、予防液の使用農家戸数は激減し、5年以上が経過しているが、依然として本病の発生は確認されておらず、我が国に野外ウイルスは存在しないと考えられる。
- (3) このため、防疫指針においては、我が国における本病の防疫措置として、本病の早期の発見と患畜等の迅速な殺処分により、短期間のうちに制圧することが最も効果的

な方法であるとされており、円滑な防疫措置の実施に支障を来すおそれのある予防液の使用については、全面中止し、都道府県知事による許可制度の更に厳格な運用に努めることが必要である。

2 審査基準の設定

- (1) 行政手続法（平成5年法律第88号）第5条第1項において、「行政庁は、申請により求められた許認可等をするかどうかをその法令の定めに従って判断するために必要とされる基準を定めるものとする」とされており、法第50条の規定に基づく予防液の使用許可についても、許可権者である都道府県知事は、行政手続の公正の確保と透明性の向上を図るため、行政手続法に基づく具体的な審査基準を定めて公表しなければならない。
- (2) このため、審査基準を定めていない都道府県は直ちに定める必要があるほか、既に定めている都道府県にあっても、更に厳格な使用の制限を行う観点から、予防液の使用については、以下のすべてに該当する場合に限定して許可する必要がある。なお、以下の条件に加え、都道府県ごとに追加的な条件を付すことは可能である。
 - ① 防疫指針に基づき、法第31条の規定に基づくワクチンの接種を行った場合であって、当該接種期間が長期間に及ぶことにより、豚及びいのししの飼養者自らが、接種することが適当と判断される場合であること。
 - ② 接種後の管理について、別添の15の（4）に定められた都道府県の指導に従うことが確実であること。

1 危機管理体制の構築について

防疫指針第1の危機管理体制の構築に関し、すべての関係者が一体となって侵入防止による清浄性の維持及び早期発見のための監視体制の強化を図るとともに、発生時における迅速かつ的確なまん延防止対策が講じられるよう、次に掲げる委員会及び検討会を設置する。

(1) 全国豚コレラ危機管理委員会及び豚コレラ防疫技術検討会

防疫指針に基づく本病の具体的な防疫対策を推進するため、専門家、関係機関、関係団体等を構成員とする全国豚コレラ危機管理委員会を、全国段階に設置する。

また、本委員会の下に、緊急ワクチンの使用方法等円滑な防疫の推進について、技術的な観点から検討を行うため、専門家、関係機関等を構成員とする豚コレラ防疫技術検討会を設置する。

(2) 都道府県豚コレラ危機管理委員会

発生時を想定した防疫演習の企画等を検討するため、(1)の委員会と同様の構成員からなる都道府県豚コレラ危機管理委員会を、都道府県段階に設置する。

2 衛生管理簿の記録及び保存について

防疫指針第1の1の(1)の衛生管理簿は、次に掲げる事項について記録し、少なくとも1年間保存するよう指導する。

- (1) 豚の導入年月日、導入元及び導入頭数
- (2) 出荷年月日、出荷先及び出荷頭数
- (3) 車両及び人の入退場の状況
- (4) 精液の購入年月日、購入先、種付け年月日及び種付け豚
- (5) 精液の出荷年月日及び出荷先
- (6) ひね豚及び死亡豚の頭数並びに子豚の生産頭数
- (7) 飼料及び敷料の搬入状況
- (8) 食品残さ等の搬入状況
- (9) からす、ねずみ等野生動物の侵入防止対策の状況

3 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1の1の(1)の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

4 家畜防疫員が現地に携行する用具について

防疫指針第2の1の(2)のウの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。

長靴、防疫衣、手袋、体温計、採材用器具（解剖器具、採血器具等）、保定具、筆記用具、記録簿、カラスプレー、カメラ、携帯電話、消毒液、噴霧器、バケツ、ポリ

バケツ、ビニール袋（大、小）、ビニールシート、アイスボックス等

5 抗原検査に供する材料の採取について

防疫指針第2の1の(2)のカの(ウ)の病性鑑定用材料のうち抗原検査に供する材料の採取については、病原体の拡散を防止するため、可能なかぎり家畜保健衛生所で実施することが望ましいが、豚の運搬が困難であり、又は多数の検体を採取する必要がある場合には、次に掲げる事項に留意の上、当該農場内で採材する。

- (1) 万一体液等が飛散した場合も考慮して、異常豚飼養豚舎以外の豚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。
- (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。
- (3) ビニールシートの上に消毒液を浸した布等を敷き、その上に豚を置く。
- (4) 採材時には検体の取違えを防止するために、豚ごとに検査記録を記載する。
- (5) 採材後、豚をビニールシートで包み、ポリバケツ等消毒液を散布又は浸せきできる容器に入れ、採材場所の周囲に十分量の消毒液を散布する。

6 病性鑑定について

防疫指針第2の1の(5)のアの病性鑑定の実施に当たっては、別紙「豚コレラの診断マニュアル」を参考とする。

7 病性決定時の公表について

防疫指針第2の2の(1)のアの発表内容については、別添1を参考とする。

8 防疫対策本部について

防疫指針第2の2の(2)の防疫対策本部については、「口蹄疫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16年12月1日付け16消安第6315号農林水産省消費・安全局長通知）別添6に定めるところに準じて設置し、運営する。

9 豚コレラ発生現地防疫対策本部の関係者あて文書について

防疫指針第2の2の(2)のイの豚コレラ現地防疫対策本部が関係者に配布する文書については、別添2を参考とする。

10 殺処分命令について

防疫指針第2の3の(2)のアの殺処分命令については、別添3を参考とする。

11 防疫従事者の確保について

防疫指針第2の3の(7)のオの防疫従事者の確保に当たっては、既往歴、最近の健康状態等を確認するとともに、業務前後において健康調査を行い、必要に応じて、業務の中止又は業務内容の変更を行う。

12 移動制限期間中における清浄性の確認について

防疫指針第2の5の(1)のイの移動制限期間中における清浄性の確認は、移動制限

区域内のすべての豚飼養農場を対象として、次に掲げる検査により行う。

(1) 臨床検査

すべての豚舎に立ち入り、臨床症状を確認する。

(2) 抗原検査

次に掲げる豚について、扁桃を用いた蛍光抗体法を実施する。

ア (1) の検査により、消瘦等本病を疑う異常が確認された豚

イ 体温 40℃以上、かつ、白血球数 1mm³当たり 1 万個以下の豚（一定頭数（原則として、1 農場又は 1 豚舎当たり 10 頭以上であって、発生の状況等を勘案して設定した頭数。以下同じ。）の豚の体温を測定し、それらの豚のうち体温 40℃以上のものについて、血液検査を実施する。）

(3) 抗体検査

一定頭数の豚について、抗体検査を実施する。

1.3 移動制限期間中における豚のと畜場への出荷について

防疫指針第 2 の 5 の (1) のエの (ア) の移動制限期間中における豚のと畜場への出荷については、防疫区域、監視区域それぞれの区域において、次に掲げる検査等を実施し、本病のまん延のおそれがないと判断した場合には、移動の制限の例外とすることができる。

また、出荷と畜場を同一とする豚について、出荷する最小輸送単位ごとにと畜場出荷許可書（別添 4）を発行するとともに、と畜場を管轄する家畜保健衛生所及び出荷と畜場に事前に連絡する。

なお、次に掲げる検査については、発生農場から豚の導入があった場合には、当該豚と同居している豚を中心に、車両等を介した関連がある場合には、車両の動線から最も近い豚舎を中心に、その他の場合には、繁殖用雌豚を中心に実施する。

(1) 防疫区域

ア 疫学調査を実施し、次に掲げる事項を確認する。

(ア) 発生農場から豚の導入があった場合には、当該豚が患畜でないことが確認されていること。

(イ) 発生農場と車両等を介した関連がある場合は、入場時の車両消毒等を実施していること。

イ 制限後 14 日目以降、抗体検査（1 農場当たり 30 頭）を実施する。

ウ 出荷時（制限後 14 日目以降）、臨床検査を実施する。

(2) 監視区域

ア 疫学調査を実施し、次に掲げる事項を確認する。

(ア) 発生農場から豚の導入があった場合には、当該豚が患畜でないことが確認されていること。

(イ) 発生農場と車両等を介した関連がある場合は、入場時の車両消毒等を実施していること。

イ 出荷時（制限後 7 日目以降）、臨床検査を実施する。

1.4 関連農場調査について

防疫指針第 2 の 6 の関連農場については、別添 5 による発生農場の調査結果を踏まえ

特定する。さらに、当該関連農場についても、必要に応じて、別添5により調査する。

1.5 ワクチン接種について

防疫指針第2の7のワクチンの使用については、原則として以下のとおりとする。

(1) 基本方針

ワクチンの使用は、大規模農場で本病が発生し、又は同一の防疫区域内の複数の農場で本病が連続発生し、発生農場の飼養豚の迅速なとう汰が困難となり、又は困難になるおそれがあると判断される場合に検討することとし、都道府県は、防疫指針第1の4の(1)の規定に基づき、その使用に当たっては、事前に農林水産省と協議を行い、法第31条の規定に基づき実施する。

(2) 接種地域

ア 都道府県畜産主務課は、以下により、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。）と協議の上、ワクチン接種地域（以下「接種地域」という。）を設定する。

(ア) 大規模農場で本病が発生し、又は複数の農場で本病が連続発生することにより、とう汰による防疫措置の実施が困難な事態となったと認められる防疫区域内の全部又は一部の地域

(イ) 防疫区域に隣接する地域であって、発生リスクが非常に高く、万が一発生した場合、迅速なとう汰による防疫措置が困難となるおそれがあると認められる地域

イ アの接種地域については、豚の飼養密度、連続発生の間隔、発生農場の飼養頭数等の発生の状況等を勘案の上設定することとし、具体的な範囲の設定については、市町村等の行政単位の区域又は道路、河川、鉄道その他境界を明示するのに適当なものに基づき定める。

(3) 接種方法

ア 対象家畜

(2)の接種地域で飼養されている豚について、ワクチンを接種することができる。

イ 接種期間

本病の発生状況等を勘案して、動物衛生課と協議し、接種を行うことが適当と認める期間（以下「接種期間」という。）において接種を行う。

ウ 接種ワクチン

法第31条の規定に基づく接種は、法第49条の規定に基づき農林水産省から譲与され、又は貸し付けられた備蓄ワクチンを使用する。

エ 接種の実施

(ア) 同一の農場又は豚舎に飼養されているすべての豚に接種する。接種に際しては少なくとも1豚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。

(イ) 短時間に迅速かつ確実に接種し、接種豚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、接種豚及び当該接種豚から生まれた豚については耳標等で確実に標識を付する。

(4) 接種後の管理

ア 移動の制限

(ア) 防疫指針第2の5の患畜等の発生に係る移動の制限等が終了した場合においても、接種地域内の接種農場で飼養されている豚及びその死体並びに病原体をひろげるおそれのある物品については、(イ)の例外により当該農場のすべての接種豚が処分され又は出荷されるまでの期間、法第32条第1項の規定に基づき、その移動を制限する。

(イ) (ア)の移動の制限については、搬出・搬送時及び移動先における病原体の拡散防止措置の状況等を勘案し、以下により例外を設けることができる。

a 次に掲げる条件を満たした場合の接種農場で飼養されていた豚の死体等の処分のための移動

- ① 当該農場がイのモニタリングにより異常がないことが確認されていること。
- ② 家畜防疫員により指定された施設に直接運搬され、直ちに処理されること。
- ③ 移動に当たって、家畜防疫員の指示に従い、適切な病原体拡散防止措置を講じるとともに、その経過が確実に記録されること。
- ④ 運搬車両は、当日、接種地域内の農場以外で使用されないこと。
- ⑤ 運搬車両は、搬送前後に洗浄・消毒すること。

b aの①から⑤及び次に掲げる条件を満たした場合の接種農場で飼養されている豚のと畜場への出荷

接種後14日目以降、1農場当たり30頭を対象として、抗体検査を実施するとともに、それらの豚のうち体温40℃以上、かつ、白血球数1mm³当たり1万個以下の豚を対象として、扁桃を用いた蛍光抗体法を実施し、いずれも陰性であること。

イ 接種後のモニタリング

都道府県は、接種地域における接種農場について、すべての接種豚が処分され、又は出荷されるまでの間、本病の発生の状況等を監視するため、以下の検査等によりモニタリングを行う。

(ア) 報告

法第52条の規定に基づき、接種豚の所有者等に対し、当該農場の飼養豚について、異常の有無、死亡頭数等については毎週、本病を疑う症例を発見した場合には直ちに、報告するよう求める。また、接種豚の所有者に対し、飼養豚が死亡した場合には当該死体を冷蔵保存等するよう指導する。

(イ) 検査

家畜防疫員は、(ア)の本病を疑う症例を発見した報告があった場合には異常が確認された豚について、また、(ア)の冷蔵保存等された死亡豚について、必要な検査を行い、病性を決定する。

1.6 抗体保有状況調査について

防疫指針第3の3の(2)の種豚検査が実施される豚以外の豚について実施する抗体保有状況調査は、別添6を参考に年間の検査頭数を計画し、定期的に検査を実施する。

プレスリリース

〇〇年〇〇月〇〇日
農 林 水 産 省
〔 都 道 府 県 名 〕

豚コレラの患畜〔疑似患畜〕の発生について

1 発生場所

〇〇〔都道府県名〕〇〇〔市町村名〕に所在する〔飼養形態〕農場（飼養頭数〇〇頭）

2 経緯

- (1) 〇〇月〇〇日、当該農場の所有者から本病を疑う豚を発見した旨、〇〇家畜保健衛生所に通報があった。
- (2) 同日、〇〇家畜保健衛生所の家畜防疫員が当該農場の立入調査を行うとともに、病性鑑定を実施した。
- (3) 立入検査では、約〇〇頭の豚に〇〇、〇〇等本病を疑う症状が見られ、また、〇〇月〇〇日、〇〇検査で陽性となったことから、本病の患畜〔疑似患畜〕と決定した。

3 今後の対応

家畜伝染病予防法及び豚コレラに関する特定家畜伝染病防疫指針に基づき、

- (1) 発生農場においては、患畜〔疑似患畜〕の殺処分、豚舎等の消毒等を実施。
- (2) 発生農場を中心とした半径〇〇km以内の区域を防疫区域、半径〇〇km以内の区域を監視区域として、豚等の移動の制限、家畜市場の閉鎖等を実施。
- (3) 周辺農場及び疫学関連農場の立入検査等を実施。
- (4) 現地家畜保健衛生所、〇〇〔都道府県名〕庁及び農林水産省消費・安全局動物衛生課に、それぞれ防疫対策本部を設置。

- ・豚コレラは、豚、いのしし特有の病気であり、人に感染することはありません。
- ・また、ウイルスを原因とする豚コレラは、コレラ菌を原因とする人のコレラとは関係ありません。

(別添2)

豚及びいのししの伝染病の豚コレラが〇〇〔市町村名〕で発生し、下記のとおり豚コレラ現地防疫対策本部を設けました。

豚房の隅にうずくまったり飼料を食べないなど元気がなく、また、発熱し、耳端・四肢・下腹部に紫色の斑（チアノーゼ）が現れている豚、いのししはこの病気にかかっているおそれがありますので、すぐ防疫対策本部まで通報してください。

この病気は伝染が激しいので、早く届けて処置をしないと広い範囲にひろがる可能性がありますので、発生地域での豚及びいのししのほか、豚コレラをひろげるおそれがある物品の移動は禁止されます。

不明な点があれば、防疫対策本部にお問い合わせください。

なお、万が一、感染豚の豚肉を食べたとしても人に感染することはありません。

記

豚コレラ現地防疫対策本部（〇〇家畜保健衛生所内）

電 話 〇〇〇〇－〇〇〇－〇〇〇〇

携 帯 電 話 〇〇〇〇－〇〇〇－〇〇〇〇

ファックス 〇〇〇〇－〇〇〇－〇〇〇〇

※夜間連絡も上記で受け付けます。

(別添3)

殺処分命令書

番 号
年月日

〇〇〇〇 殿

都道府県知事 〇〇〇〇 印

あなたが所有する〔管理する〕下記の家畜は、豚コレラの患畜〔疑似患畜〕と決定されたので、家畜伝染病予防法（昭和26年法律第166号）第17条第1項の規定に基づき、〇〇年〇〇月〇〇日までに下記により家畜を殺処分することを命ずる。

記

- 1 家畜の所在する場所：
- 2 家畜の種類及び頭数：

備 考

- ・この命令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。
- ・この命令に違反した場合は、家畜伝染病予防法第63条第3号の規定に基づき、3年以下の懲役又は100万円以下の罰金に処せられます。
- ・この命令により殺処分された家畜については、家畜伝染病予防法第58条の規定に基づき、手当金が交付されます。

(別添4)

番 号
年月日

〇〇〇〇 殿

〇〇家畜保健衛生所
家畜防疫員〇〇〇〇

と畜場出荷許可書

あなたが所有する（管理する）下記の家畜は、検査の結果、豚コレラに感染していないことが確認されたので、家畜伝染病予防法第32条第1項の規定に基づく移動の制限の対象外とし、と畜場への出荷を許可する。

記

- 1 家畜の種類：
- 2 搬入頭数：
- 3 と畜を行う場所：
- 4 その他：

農場調査票

調査年月日	年 月 日 時 分～ 時 分		
調査者	(所属)、(所属) (計 名)		
農場名		所有者 (管理者)	
農場住所 (連絡先)	TEL: 、FAX :		
従業員	名		
飼養状況 (内訳)	【飼養形態】 頭 (棟) (農場内の配置図を添付) (繁殖雄豚: 頭、繁殖雌豚: 頭、肥育豚: 頭)		
導入の状況 (過去40日)	年 月 日、 から 頭導入 (関連農場:) 年 月 日、 から 頭導入 (関連農場:)		
出荷の状況 (過去40日)	年 月 日、 ～ 頭出荷 (関連農場:) 年 月 日、 ～ 頭出荷 (関連農場:)		
精液購入販売 (過去40日)	(関連農場:)		
死体処理の状況	(関連農場:)		
糞尿処理の状況	(関連農場:)		
飼料会社	(運送会社:) (関連農場:)		
薬品会社	(運送会社:) (関連農場:)		
関連獣医師	(関連農場:)		
ワクチンの 接種状況			
衛生管理の状況			
その他	(食品残さの給与状況等を記載。)		

検査対象農場等の抽出方法

- 1 都道府県畜産主務課は、当該都道府県内の農場戸数に応じて、次に掲げる表により、年間の抽出戸数、抽出頭数を決定する。

都道府県内農場戸数	抽出戸数	抽出頭数
250戸未満	50戸	10頭
250戸以上	100戸	10頭

- 2 検査農場及び検査豚は、無作為に抽出する。
- 3 農場で採材する場合は、都道府県内の農場を家畜保健衛生所管轄区域ごとに区分し、各家畜保健衛生所の農場戸数割合に応じて、家畜保健衛生所ごとに抽出戸数を定め、10頭の豚を無作為に抽出する。10頭以下の飼養規模の農場の場合は全頭を対象とする。

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。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”ボタン状”潰瘍がみられる。

組織病理学的所見に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又は伴わない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、反すう動物のペスチウイルスとの交差反応の問題があり確実性が乏しいばかりか、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、本病の摘発に利用するよりもむしろ清浄性の監視に利用すべきである。

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を開始する。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（シーケンスと遺伝子解析が必要）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及び確認を行い、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及び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) 臨床症状を示している豚のほか、これと同居している複数頭（30頭以上）の豚の体温測定及び白血球数の測定を行い、発熱し、又は白血球数が減少（ $10,000$ 個/ mm^3 以下）している豚について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（片側すべて）、腎臓（髓皮質を含む。）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・採材器具は高力価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（血清又は凝固防止血液）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 $1\text{ cm} \times 5\text{ mm}$ （扁桃）あるいは $1\text{ cm} \times 1\text{ cm}$ （腎臓、脾臓）程度の大きさで、それぞれ3個ずつ切り出す。
- イ 残りの組織 1 g 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のデュ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%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。なお、乳剤中のウイルス量が少ないこともあるので、少なくとも1週間は観察を続ける必要があり、その場合には培養開始後4日目に培養上清を継代する。

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) 培養細胞の継代

- 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 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ティルティング操作を15～20分ごとに計1時間行い、PBS-又は培地で細胞面を洗浄する。
 - エ 5%血清添加培養液を添加し、37℃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細胞が培養可能かのロットチェック等が必要である。
 - オ 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。
 - カ 風乾し、カバースリップ標本とする。

5 蛍光抗体染色

3の(2)のクのスライドグラス標本及び4の(2)のカのカバースリップ標本の蛍光染色には、市販の本病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、抗体や蛍光顕微鏡がうまく働いていることが確認でき、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本病蛍光抗体液に添付の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が、交差汚染やPCR産物の同定等の問題から、診断の中心的な検

査ではなく、4のウイルス分離の補助的な検査として実施する。

(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нка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 μ 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。また、交差汚染の問題から、陽性対照となる検体は取り扱わず、水などの陰性対照を置く。

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 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46 bp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238 bp）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、陽性又は疑陽性と思われる所見が得られた場合は、直ちに動物衛生課に連絡するとともに、速やかに独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構動物衛生研究所海外病研究部（以下「動物衛生研究所海外病研究部」という。）に当該検査材料を搬入する。

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、抗体検査は抗原検査と異なり、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（3～5年後）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細胞で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、25cm² (75cm²) 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℃、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℃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、ティルティング操作を15分～20分ごとに計1時間行い、PBS-又は培地で細胞面を洗浄する。

(イ) 5%血清添加培養液を加え、37℃で培養する。

(ウ) 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。

(エ) 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 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。

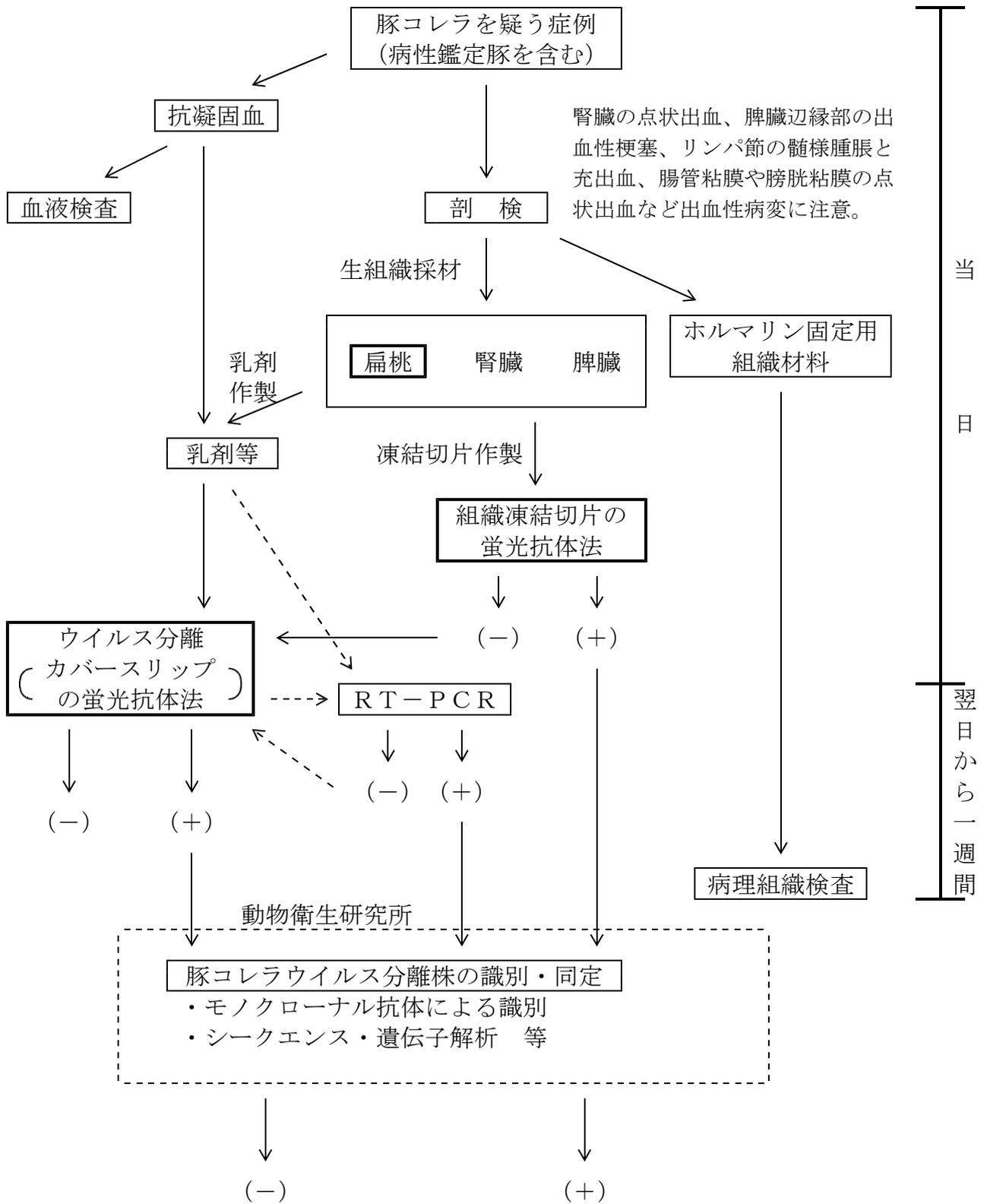
(カ) 細胞表層に認められるCPEを指標に中和抗体価を求める。

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、直ちに動物衛生課に連絡するとともに、速やかに動物衛生研究所海外病研究部に血清材料を搬入する。また、同時に疫学調査、立入調査等を開始し、豚コレラウイルスの感染が否定できない場合には直ちに抗原検査を実施する。

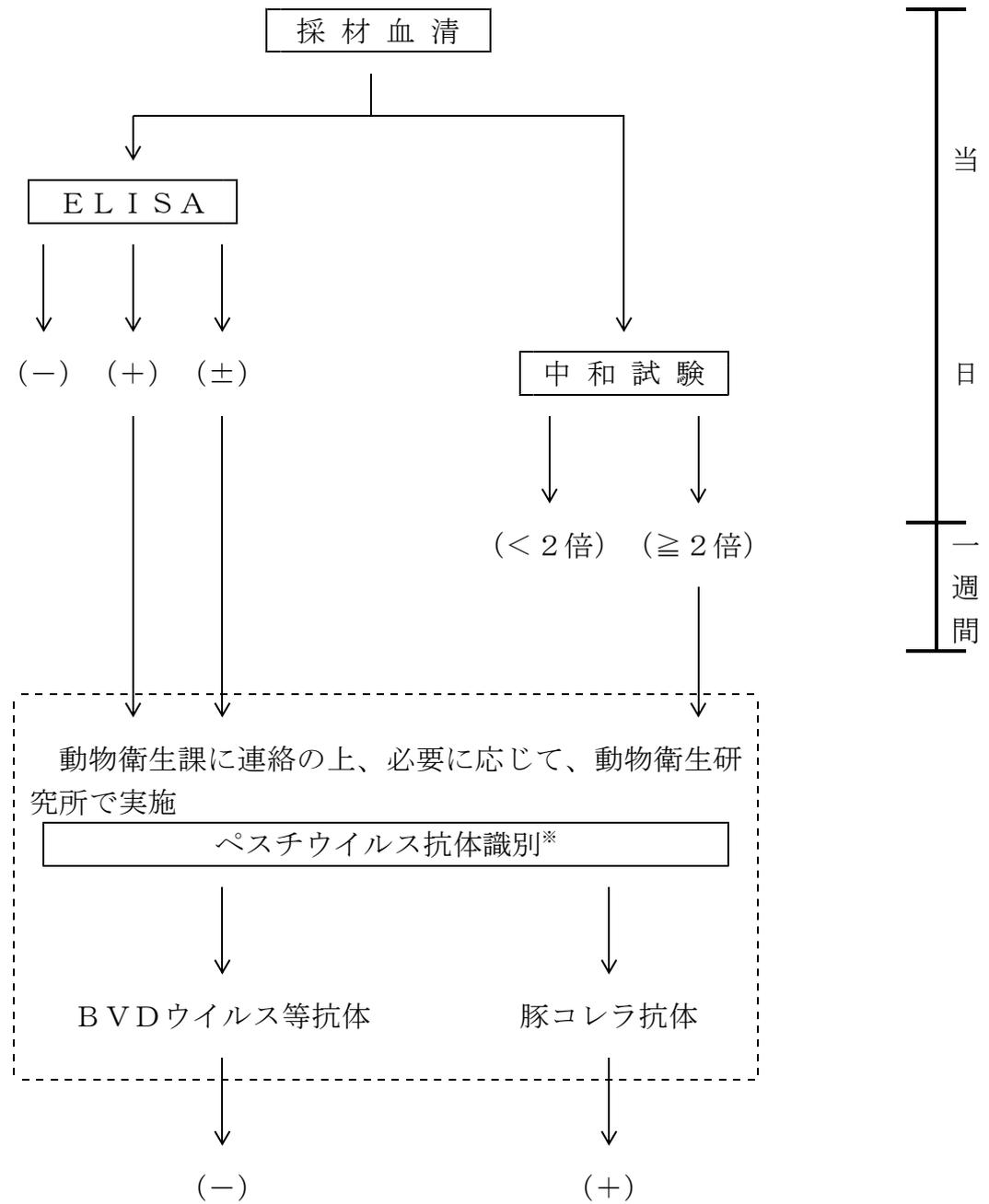
(参考)

1 抗原検査のフローチャート



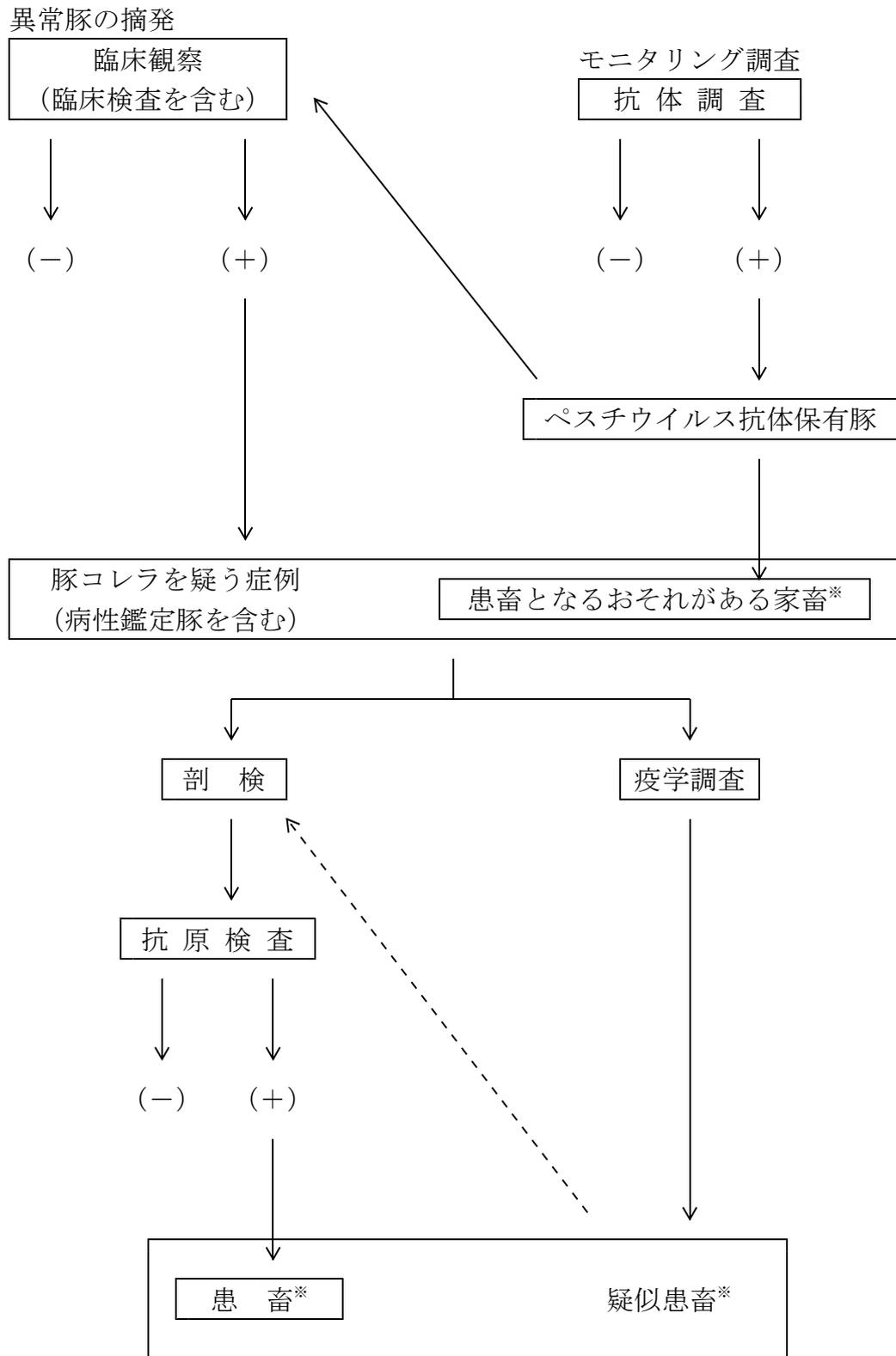
※太枠の検査や材料作製については優先的に実施すること。

2 抗体検査のフローチャート



※抗体識別については、技術的に明確な結果が得られないことがあるため、常に血清疫学的な判断ができるよう、対象農場の抗体陽性率や抗体保有豚の分布状況の把握に努めること。

3 豚コレラの診断



※患畜、疑似患畜等の最終判定は、動物衛生課との協議等を踏まえ、総合的に判断。