

## 第21 家畜集合施設の開催等の制限等（法第26条、第33条及び第34条）

### 1 移動制限区域内の制限

- (1) 都道府県は、動物衛生課と協議の上、移動制限区域内における次の事業の実施、催物の開催等を停止する。
- ① と畜場における豚等のと畜
  - ② 家畜市場等の豚等を集合させる催物
  - ③ 豚等の放牧
- (2) 都道府県は、移動制限区域内のと畜場や化製処理施設等の所有者に対し、期限を定めて必要な消毒をすべき旨を命ずるとともに、必要に応じて必要な消毒設備を設置させるものとする。

#### 【留意事項82】家畜集合施設の消毒の実施期間

原則として、移動制限区域の解除を目安とする。

### 2 と畜場の再開

#### (1) 再開の要件

移動制限区域内のと畜場について、次の要件のいずれにも該当する場合には、都道府県は、動物衛生課と協議の上、事業を再開させることができる。なお、と畜場で豚熱が発生した場合には、これらの要件に加え、場内の消毒が完了している必要がある。

- ① 車両消毒設備が整備されていること。
- ② 生体受入施設は、施設の他の場所と明確に区別されていること。
- ③ 定期的に清掃・消毒をしていること。
- ④ 衛生管理マニュアルが適切に定められており、かつ、実際に従業員が当該マニュアルに従って業務を行っていること。
- ⑤ (2)の事項を遵守する体制が整備されていること。

#### (2) 再開後の遵守事項

再開後には、移動制限が解除されるまでは次の事項を遵守するよう徹底する。

- ① 作業従事者がと畜施設に立ち入る場合には、専用の作業服、靴、帽子、手袋等を使用すること。
- ② 車両の出入り時の消毒を徹底すること。
- ③ 豚等の搬入は農場ごとに行い、運搬車両は複数の農場に立ち寄らないこと。
- ④ 移動制限区域内の農場から豚等を搬入する場合には、搬入時にと畜場内に他の農場から搬入する車両が存在しないよう調整するとともに、当該豚等を搬入する前後に生体受入場所を消毒すること。
- ⑤ 移動制限区域内の農場から豚等を搬入する場合には、その日の最後に搬入し、搬入したその日のうちにと畜解体をすること。
- ⑥ 搬入した豚等について、と畜場法に基づき、と畜解体をすることが不相当と判断された場合には、農場には戻さず、速やかに処分すること。
- ⑦ 搬入した豚等は、農場ごとに区分管理すること。

- ⑧ 豚等及び製品の搬出入に関する記録を作成し、保存すること。

**【留意事項 83】 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、陽性であると判定された野生いのししが確認された地点を中心に徹底した消毒を行うことにより、豚熱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、豚熱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22 消毒ポイントの設置（法第28条の2）

- 1 都道府県は、第17により野生いのししにおいて豚熱が陽性であると判定する旨の連絡を受けた後、必要に応じて、速やかに、市町村、管轄の警察署、道路管理者等の協力を得て、ウイルスの拡大を防止することに重点を置き、消毒ポイントを設置する。
- 2 具体的な消毒ポイントの設置場所については、次の事情を考慮し、第17により陽性であると判定された野生いのししが確認された地点周辺の山道の出入口、近隣の農場の周辺、移動制限区域の境界その他の場所を中心に選定する。また、豚等において発生があった場合は、その都度、設置場所を見直す。
  - (1) 山道・道路網の状況
  - (2) 人・一般車両の通行量
  - (3) 畜産関係車両の通行量
  - (4) 山、河川等による地域の区分
- 3 消毒ポイントの設置に当たっては、車両等によるウイルスの拡散防止が徹底できるよう、畜産関係車両や防疫関係車両のみならず、必要に応じて一般車両も効率的かつ確実に消毒されるよう、消毒設備の構造等を工夫する。

特に、畜産関係車両や防疫関係車両については、消毒ポイントを通行するよう指導し、運転手や車両内部を含め、厳重な消毒を徹底する。

また、都道府県は、消毒ポイントにおける車両の交差汚染を防止するため、出入口の設置場所や車両の動線等に注意の上、必要に応じて、消毒ポイントを一地点につき、複数か所設置する等の措置を講じる。

なお、第17により陽性であると判定された野生いのししが確認された地点周辺の山道等に消毒ポイントを設置する場合は、ウイルスの野生いのししへの拡散を防ぐため、当該地点を通過する人の消毒を徹底する。

### 【留意事項84】 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) 消毒の実施に係る記録

消毒ポイントにおいて車両消毒を実施した場合は、移動先で消毒を実施した旨を確認できるよう証明書を発行し、これを当該車両とともに携行するよう指導するとともに、都道府県においても実施した車両を特定できるよう記録し、これを保管すること。

#### 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。

### 3 消毒ポイントの設置期間

原則として、移動制限区域の解除を目安とするが、ウイルスの浸潤状況等に応じて、動物衛生課と協議の上、適宜見直す。

### 4 正確な情報提供・指導

発生都道府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、発生都道府県車両の出入りが制限されることがないように、正確な情報提供・指導を行うこと。

## 第23 ウイルスの浸潤状況の確認等

### 1 ウイルスの浸潤状況の確認

都道府県は、第17により野生いのししにおいて豚熱が陽性であると判定する旨の連絡を受けた場合には、動物衛生課と協議の上、以下の措置を講ずる。

なお、これらの措置は、必要に応じて、第17の病性の判定前に実施することができる。

#### (1) 野生いのししにおける検査等

都道府県は、当該野生いのししが確認された地点を中心とした半径10km以内の区域において死亡し、又は捕獲された野生いのししについて、ウイルスの浸潤状況の確認のために、原則として、抗原検査及び抗体検査を実施する。また、当該区域においては、野生いのしし間及び野生いのししから飼養豚等への感染拡大の防止を図る。

#### 【留意事項85】 野生いのししにおける検査等に関する事項

都道府県は、防疫指針第23の1の(1)の検査に当たっては、少なくとも28日間、原則としてPCR検査又はリアルタイムPCR検査を実施する。特に、半径3km以内の区域については採材を積極的に実施する。また、必要に応じ、血清抗体検査を実施する。

都道府県は、猟友会等の関係者に対して、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を捕獲した場合には、担当部局に連絡すること及びこれらの野生いのししからの検体の採材に協力することについて依頼する。なお、感染の拡大状況等によっては、小委の委員等の専門家の意見を踏まえ、対象区域の拡大に加え、実施期間の「少なくとも28日間」については、当面継続とする。

#### 【留意事項86】 野生いのしし間及び野生いのししから飼養豚等への感染拡大の防止

都道府県は、国、専門家等の意見、当該区域の野生いのししにおけるウイルス浸潤状況、環境要因（野生いのししの生息状況、周辺農場数、豚等の飼養密度、山、河川の有無等の地理的状況等）等を踏まえて、必要に応じて、野生いのししの捕獲による生息密度の低減に加え、防護柵の設置、狩猟の自粛要請、調査捕獲の調整、農地周辺の収穫残渣等の誘引物の除去、その他効果的な方法による対策を検討する。

#### (2) 豚等における検査

都道府県は、移動制限区域内の農場（豚等を6頭以上飼養するものに限る。）に対する立入検査を行い、特定症状の有無を確認する。その際、必要に応じて、病性鑑定を実施するための検体を採材し、PCR検査及び血清抗体検査を実施する。

### 2 周辺の野生いのししにおけるウイルス拡散防止対策

都道府県は、1の(1)により検査された野生いのししが確認された地点の消毒

を徹底するとともに、ウイルスの拡散を防止するため、速やかな焼却又は埋却等により適切に処理するよう、猟友会等の関係者に対し、協力を要請する。

**【留意事項 87】 野生いのししにおけるウイルス拡散防止対策**

ウイルスの拡散を防止するため、死亡した野生いのししや捕獲された野生いのししの適切な扱いについては、手引きを参照する。

**3 飼養衛生管理基準の遵守状況の確認（法第 34 条の 2）**

(1) 都道府県は、第 17 により野生いのししにおいて豚熱が陽性であると判定する旨の連絡を受けた場合には、速やかに、立入検査、直近の飼養衛生管理基準の遵守状況調査及び第 1 の 3 の (2) によるこれまでの飼養衛生管理に係る指導の結果等により、移動制限区域内を中心に豚等を飼養する農場における飼養衛生管理基準の遵守状況を確認する。

(2) 都道府県は、(1) の結果、豚等の所有者が、飼養衛生管理基準のうちに掲げる事項を遵守しておらず、直ちに改善しなければ豚熱がまん延する可能性が高いと認める場合には、当該豚等の所有者に対して、期限を定め、改善すべき事項等を記載した文書を交付することにより、改善すべき旨の勧告を行う。

- ① 衛生管理区域内における家畜の伝染性疾病の病原体による汚染の拡大の防止の方法に関する事項
- ② 衛生管理区域外への家畜の伝染性疾病の病原体の拡散の防止の方法に関する事項

**【留意事項 88】 都道府県が飼養衛生管理基準の遵守について文書の提示で勧告を行う場合の期間及び記載事項**

留意事項 68 に準じる。

(3) 都道府県は、(2) の勧告を受けた豚等の所有者が、当該勧告に従わない場合には、期限を定め、改善すべき事項等を記載した文書を交付することにより、当該勧告に係る措置をとるべき旨を命ずる。

**【留意事項 89】 都道府県が飼養衛生管理基準の遵守について文書の提示で命令を行う場合の期間及び記載事項**

留意事項 69 に準じる。

## 第24 経口ワクチンの散布

国及び都道府県は、第3-1の4、第12の6又は第23の1の(1)の調査等の結果、既に野生いのししに豚熱ウイルスが相当程度浸潤している可能性が高いと認める場合には、野生いのししにおける豚熱のまん延の防止及び農場へのウイルス侵入防止のため、市町村、猟友会等の関係団体と連携し、原則として、以下の措置を講ずる。

- 1 農林水産省は、野生いのししへのウイルスの浸潤状況等を考慮し、経口ワクチンの使用の是非について、野生いのししの専門家等の意見を踏まえて決定する。
- 2 農林水産省は、1により経口ワクチンの散布を決定したときは、経口ワクチンの使用方法、経口ワクチンの散布の効果・有効性の分析・評価方法等について記載した「豚熱経口ワクチンの野外散布実施に係る指針」(3において「実施指針」という。)を作成し、公表する。
- 3 都道府県は、実施指針に基づき、国、市町村、猟友会等の関係団体の協力を得て、経口ワクチンの散布に係る都道府県計画を策定し、有効的かつ効率的な散布を行う。

### 【留意事項90】 経口ワクチンの散布等について

都道府県は、国、専門家等の意見を踏まえて、経口ワクチンの散布及び野生いのししの捕獲による生息密度の低減を実施し、必要に応じてその他効果的な方法による対策を検討する。

## 第4章 その他

### 第25 その他

- 1 種豚など遺伝的に重要な豚を含め、畜産関係者の保有する豚等について、個別の特例的な扱いは、一切行わない。畜産関係者は、このことを前提として、凍結精液や凍結受精卵などによる遺伝資源の保存、種豚の分散配置等により、日頃からリスク分散を図る。
- 2 農林水産省消費・安全局長は、必要に応じ、本指針に基づく防疫措置の実施に当たっての留意事項を別に定める。
- 3 農林水産省は、防疫措置の改善等に寄与する研究・開発を進め、その成果が出た場合は、本指針を速やかに見直す。
- 4 都道府県は、豚熱が終息した後も、豚等の所有者や防疫措置従事者が精神的ストレスを継続している事例があることに鑑み、農場への訪問、相談窓口の運営の継続等のきめ細やかな対応を行うよう努める。

## 豚熱の診断マニュアル

豚熱ウイルス (CSFV) 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。豚熱 (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、豚熱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、困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、いずれも豚熱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、アフリカ豚熱、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 CSFV 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、BVDV 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。

## A 飼養豚等

### 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 CSFV 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 $-80^{\circ}\text{C}$ 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 2 の症状が確認され、豚熱が疑われる場合は、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（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、組織構造を壊さないように留意して採材を行う。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1cm×5mm（扁桃）あるいは1cm×1cm（腎臓、脾臓）程度の大きさに、それぞれ3個ずつ切り出す。
- イ 乳剤作製用に残りの組織から1g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、扁桃は陰窩の縦断面が、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 6μm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BVDV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、0.45μmのフィルターで濾過する。この際、あらかじめガラスフィルターを通して目詰まりを防げる。

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℃で培養する。なお、添加する血清はBVDV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）のクのスライドガラス標本及び4の（2）のキのカバースリップ標本の蛍光染色には、市販の豚熱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熱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。また、交差汚染が起きた際の判別を的確に行うため、次とおり2種類の陽性対照試料を用いた手法で検査を実施する。ただし、(1)の②の陽性対照試料が確保できない等の場合には、7により CSFV ワクチン株 (GPE-株) を陽性対照試料とした従前法により検査を実施する。

なお、精液を検査する場合においても同様の手法により検査することは可能であるが、材料が原液である場合には、精液用希釈溶液、PBS あるいは生理食塩水により市販されている精液と同程度に希釈 (50 倍希釈) するよう注意すること。

### (1) 陽性対照試料

#### ① 陽性対照試料 1 : BVDV 培養上清

BVDV 1 型又は 2 型の培養上清を用いる。当該試料は、被検材料と同様に RNA 抽出を行い、PCR 反応までの検査の成否を判定するための陽性対照試料とする。

#### ② 陽性対照試料 2 : CSFV (GPE-株) 改変 DNA

動物衛生研究部門より配布される DNA を用いる。当該試料は、PCR 反応から制限酵素処理までの検査の成否を判定する陽性対照試料とする。

### (2) 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、50~400  $\mu$ 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。また、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。

なお、RNA の抽出には陽性対照試料 1 についても必ず行うこと。当該試料は適当な容量ごとにチューブ等に分注し、凍結して保存しておくことが望ましい。

### (3) 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。ただし、市販キットの中には PCR 反応後の産物のキャリーオーバーによる交差汚染を防ぐ目的で、UNG 酵素 (Uracil-N-Glycosylase) を添加したものがあるが、本酵素は、交差汚染リスク

を減少させる効果が期待できる一方で、PCR 反応後の遺伝子解析（制限酵素処理やシーケンス解析等）には不向きであることを留意すること。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 CSFV 株の検出が可能であるが、BVDV 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、陽性対照として陽性対照試料 2 を、陰性対照として PBS をそれぞれ置くこととするが、交差汚染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 CSFV 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 55~57°C で行う。ディネーター（変性）温度、エクステンション（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'

#### 【反応液の組成】 Invitrogen 製 SuperScript III One-step RT-PCR kit の使用例

2 × Reaction Mix	12.5 μl
324 Primer (10pmol/μl)	0.5 μl
326 Primer (10pmol/μl)	0.5 μl
Enzyme Mix	1.0 μl
DW	8.0 μl
Sample	2.5 μl
<b>Total</b>	<b>25.0 μl/tube</b>

#### 【PCR 反応条件】

55°C 30min      94°C 15sec      68°C 5min  
 94°C 2min      55°C 30sec      15°C ∞  
 68°C 20Sec      35 Cycle

#### イ アガロース電気泳動と制限酵素処理

CSFV 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 1~2% 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。

BVDV 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 CSFV か、BVDV 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、制限酵素で消化すると、アガロース電気泳動により程度判別できる。

また、本マニュアルによる手法は、制限酵素処理により交差汚染の有無を確認することが可能である。制限酵素は、*Bg*/I と *Ecd*RV を用い、以下に示す反応液の組成等を参考に実施する。

CSFV の場合(処理前の PCR 産物は 284bp)、*Bg*/I でのみ切断され、処理前と比較してサイズが小さくなり、処理後はおおよそ 243bp となる(制限酵素によりおおよそ 41bp の断片が切り出される)。

一方で、陽性対照試料 1 の BVDV にあっては、*Bg*/I 及び *Ecd*RV のどちらでも切断されないことから、処理後も処理前と同様に 284bp となる。

また、陽性対照試料 2 の DNA にあっては、*Bg*/I 及び *Ecd*RV の両方で切断されることから、処理後のサイズは豚熱ウイルスより小さく 144bp となる(制限酵素によりおおよそ 41bp と 99bp が切り出される。)

#### 【反応液の組成】 *Bg*/I 及び *Ecd*RV を用いた処理

PCR 反応液	5.0 $\mu$ l
10 $\times$ high buffer	2.0 $\mu$ l
<i>Bg</i> /I	0.5 $\mu$ l
<i>Ecd</i> RV	0.5 $\mu$ l
DW	12.0 $\mu$ l
<hr/>	
Total	20.0 $\mu$ l/tube

#### 【制限酵素処理の反応条件】

37°C 60min

※市販の制限酵素処理の至適温度に従う。

## 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

急性経過をとる豚熱の場合、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、慢性経過をとる豚熱の場合、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 CSFV 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℃、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 CSFV を増殖させる能力が低いいため、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、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°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 $\mu$ 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。

## B 野生いのしし

野生いのししの検査においても、本マニュアルを準用する。

なお、野生いのししの検体は、特に豚等の検体と交差汚染しないよう注意が必要であることから、PCR 反応後に電気泳動が不要であり、多検体処理が可能であるリアルタイム PCR 検査の活用も検討する。

リアルタイム PCR 検査の実施に当たっては、市販のキットが簡便である。ただし、リアルタイム PCR 検査はコンベンショナル PCR 検査に比べ、感度が落ちることが確認されているため、豚等を診断する際に用いず、サーベイランスとして実施する野生いのししの調査に限って使用することとする。また、リアルタイム PCR 検査では、制限酵素による CSFV とその他ペステウイルスとの判定ができないことから、野生いのししの初発事例で陽性が確認された場合等は、コンベンショナル PCR 検査及び動衛研で実施するシーケンスで確定診断を行うこと。さらに、リアルタイム PCR 検査が陰性の場合でも、死亡状況や解剖所見で強く豚熱が疑われる場合には、コンベンショナル PCR 検査を実施すること。

※ リアルタイム PCR 検査で使用する市販キットは、複数の蛍光色素を使用したプローブ法により被検材料の検出を行うもので、陽性対照試料、インターナルサンプルコントロールにより試験の成立及び結果を判断でき、また、ワンステップで、かつ、下記の反応条件により実施するものを推奨する。

逆転写：50°C で 15 分を 1 サイクル

変性：95°C で 1 分を 1 サイクル

増幅：95°C で 15 秒及び 60°C で 30 秒を 45 サイクル

## 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

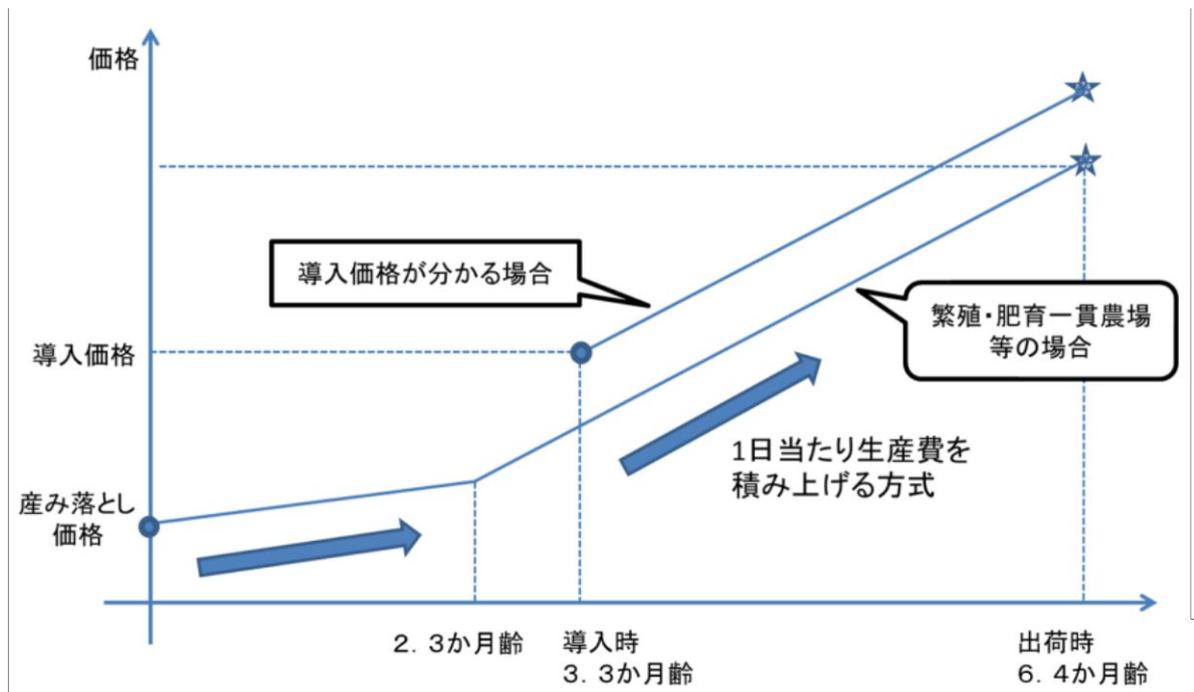
※この試算例では農作物価統計を用いて導入価格を設定

[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

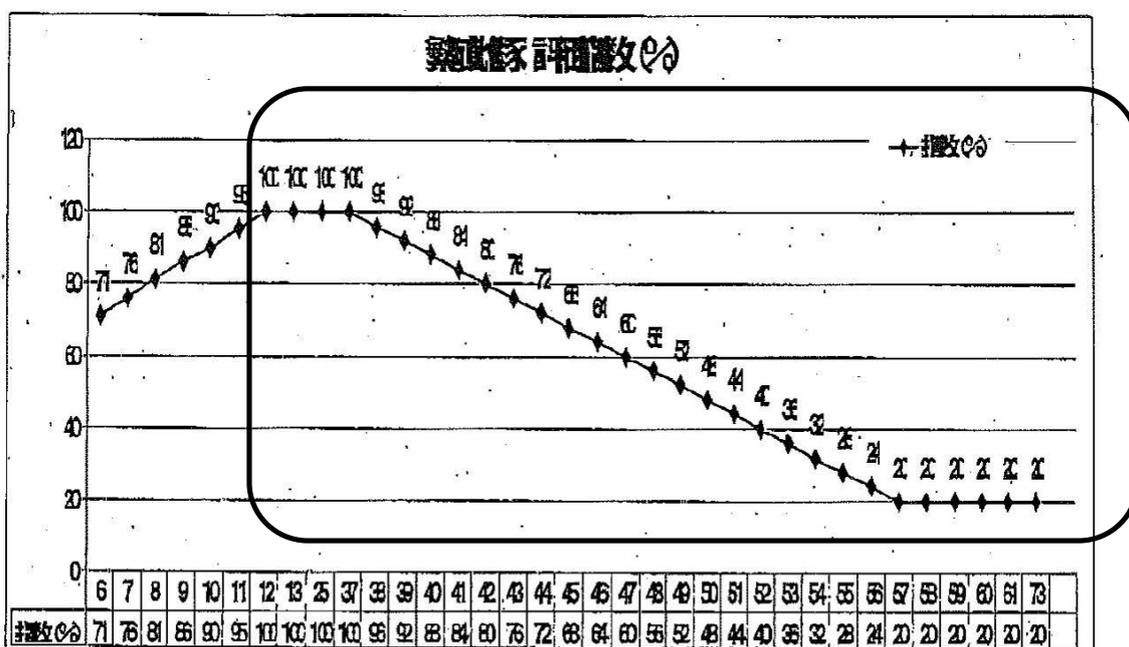
#### (2) 初産時基準価格及び評価指数の算定方法

- 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。
- 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。）。

【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



【例】 繁殖雌豚を初産時（約12か月齢）で評価

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

(留意事項)

別記様式 1～別記様式 12 (別添参照)

(別記様式1)

<p style="text-align: center;">認 定 証</p> <p style="text-align: center;">〇〇 〇〇 ( 年 月 日生)</p> <p style="text-align: center;">上記の者を豚熱に関する特定家畜伝染病防疫指針に 基づく知事認定獣医師と認める</p> <p style="text-align: center;">認定番号 第 号</p> <p style="text-align: center;">認定日 年 月 日</p> <p style="text-align: center;">〇〇県知事</p>
---

縦53.98mm、横85.60mm

豚熱予防的ワクチン接種プログラム

都道府県名

① 接種命令の対象区域の範囲及び範囲の考え方					
接種命令の対象区域					
範囲の考え方					
② 接種開始及び初回接種終了予定時期					
接種開始予定時期					
初回接種終了予定時期					
③ 接種対象頭数及び必要となるワクチン数量の見込み					
接種対象頭数(初回)					
ワクチン数量見込み	月	戸数	接種対象頭数をカバーするワクチン数		備考 初回接種
	○月	○戸	○頭	○本	
④ 対象区域内における農場の接種の進め方(家畜防疫員の確保及び認定民間獣医師の活用を含む。)					
⑤ 標識の方法					
⑥ 接種農場の出荷先となると畜場					
県内					
県外	接種地域				
	非接種地域				

⑦ ワクチン接種に係る正確な情報提供に関する事項

⑧ 接種区域における遵守事項の実施を担保する体制

⑨ その他ワクチン接種に当たり講じる措置の内容