

平成23年度ウエストナイルウイルス感染症防疫技術検討会

日時：平成24年2月28日（火）

15：00～16：30

場所：農林水産省消費・安全局第2・3会議室

議 事 次 第

1 開 会

2 あいさつ

3 議 事

（1）座長の選出

（2）ウエストナイルウイルス感染症防疫マニュアルの改正について

（3）その他

4 閉 会

平成23年度ウエストナイルウイルス感染症防疫技術検討会
委員名簿

【委員】

池田 秀利 日本獣医生命科学大学獣医学部獣医学科教授

大坪 岳彦 千葉県中央家畜保健衛生所
細菌ウイルス課専門員

近藤 高志 日本中央競馬会競走馬総合研究所栃木支所
分子生物研究室主任研究役

筒井 俊之 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構
動物衛生研究所ウイルス・疫学研究領域長補佐

(敬称略、五十音順)

【オブザーバー】

厚生労働省健康局結核感染症課

農林水産省動物検疫所

環境省自然環境局野生生物課

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

平成23年度ウエストナイルウイルス感染症防疫技術検討会

配布資料一覧

資料1 平成23年度ウエストナイルウイルス感染症防疫技術検討会の開催について

資料2 ウエストナイルウイルス感染症対策の概要について

資料3 ウエストナイルウイルス感染症防疫マニュアルの改正について

3-1 ウエストナイルウイルス感染症防疫マニュアルの改正ポイント
(案)

3-2 ウエストナイルウイルスの感染範囲の比較

3-3 ウエストナイルウイルス感染症サーベイランス体制の変更案

3-4 ウエストナイルウイルス感染症防疫マニュアル新旧対照表(案)

参考1 ウエストナイルウイルス感染症防疫マニュアル

参考2 平成20年度～22年度新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業「我が国における家畜伝染病のサーベイランスに関する研究」
(抜粋)

参考3 馬のウエストナイルウイルス感染症

平成 23 年度ウエストナイルウイルス感染症防疫技術検討会の開催について

平成 24 年 2 月 14 日
農林水産省消費・安全局動物衛生課長

第 1 趣旨

ウエストナイルウイルス感染症は、近年、その発生が減少傾向にあるものの、依然として北米等を中心に発生が継続しており、我が国への本病のウイルスの侵入が懸念される状況にある。本病の防疫に当たっては、家畜伝染病予防法（昭和 26 年法律第 166 号）、「家畜防疫を総合的に推進するための指針」（平成 13 年 9 月 6 日農林水産大臣公表）等に基づいて、事前対応及び危機管理の視点に立った防疫対策を総合的に推進することが重要である。

このため、ウエストナイルウイルス感染症に関する防疫措置を適切かつ円滑に行うための技術的な検討を行うに当たって、科学的・専門的な意見を聴くための場として、「平成 23 年度ウエストナイルウイルス感染症防疫技術検討会」（以下「検討会」という。）を開催する。

第 2 検討会の所掌事務

検討会は、ウエストナイルウイルス感染症に関する次に掲げる事項について意見を述べるものとする。

- （１）国内外における最新の科学的知見及び研究成果の集積、防疫措置への反映等に関すること。
- （２）発生予防及びまん延防止に関すること。
- （３）サーベイランスの実施等のリスク管理に関すること。
- （４）その他防疫措置全般に関する科学的な助言に関すること。

第 3 検討会の構成

- 1 検討会の委員は、ウエストナイルウイルス感染症に関し科学的・専門的な知識を有する者であって次に掲げるもののうちからそれぞれ 1 名ずつ農林水産省消費・安全局動物衛生課長が選任するものとする。

- （１）都道府県の家畜衛生に関する事務を担当する職員
- （２）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の職員
- （３）日本中央競馬会の職員
- （４）その他学識経験を有する者

- 2 検討会には、座長を置く。
- 3 座長は、委員の互選により選出する。
- 4 座長は、検討会の会議の議事を運営する。

第4 検討会の会議の運営

1 検討会の会議の運営については、次のとおりとする。

(1) 検討会の会議は、公開とする。

(2) 検討会の会議の資料及び議事概要は、検討会の会議の終了後、農林水産省のホームページにおいて公表する。

2 1にかかわらず、個人の権利又は利益を害するおそれのある場合、企業秘密に触れることになる場合その他座長が委員の了承を得た上で必要と判断した場合には、検討会の会議を非公開とし、検討会の会議の資料を非公表とすることができる。

第5 検討会の庶務

検討会の庶務は、農林水産省消費・安全局動物衛生課において処理する。

第6 その他

第1から第5までに定めるもののほか、検討会の運営に関する事項その他必要な事項については、座長が委員の了承を得た上でその取扱いを決定するものとする。

平成24年2月28日
農 林 水 産 省

ウエストナイルウイルス感染症対策の概要について

1 経緯

ウエストナイルウイルス感染症（家畜伝染病予防法上の家畜伝染病である「馬」の「流行性脳炎」の一つ）は、我が国では未発生の感染症であるが、米国における本病の発生を受け、平成15年1月、ウエストナイルウイルス感染症防疫マニュアル（国内におけるサーベイランス及び発生時における防疫措置を規定）を策定し、以後本マニュアルに基づき対策を講じているところ。

2 現状

（１）サーベイランスについて

マニュアルに基づき、各都道府県家畜保健衛生所において、蚊及び野鳥のサーベイランスを実施し、これまでのところ、蚊・野鳥とも全検体で陰性を確認している。

【参考】これまでの検査実績

	15年度	16年度	17年度	18年度	19年度	20年度	21年度
蚊	11,361匹	12,737匹	10,784匹	8,624匹	4,141匹	12,560匹	14,396匹
野鳥	312羽	230羽	267羽	245羽	70羽	152羽	114羽

	22年度	合計
蚊	10,914匹	85,517匹
野鳥	107羽	1,497羽

なお、家畜伝染病予防法における本病の対象動物である馬での発生状況は、米国及び世界全体で直近5年間で減少傾向にある。

(参考：馬における発生状況（件数）)

	2006年	2007年	2008年	2009年	2010年
米国	1,032	468	176	275	114
世界累計	1,051	598	463	438	279

(出典：OIE WAHID)

(2) 海外からの侵入防止対策について

米国及びカナダからの輸入馬に対して、我が国との間で合意した家畜衛生条件に基づき、①輸出前60日の間半径50km以内にウエストナイルウイルス感染症の発生がない施設において、日本向け輸出前14日間以上飼養されていたこと、又は②有効な予防注射を受けていること等の証明を求めている。

(3) ワクチンについて

- ① 我が国においては、本病ワクチンは承認されているが、これまで使用実績はなく、現在、ワクチンの備蓄はしていない。
- ② 馬の飼養者等がワクチンを使用する場合には、マニュアルに基づき、家畜防疫員の指導の下、ワクチンを接種した当該馬のワクチン接種歴について確実に記録し、保存することとしている。

【参考】他機関におけるウエストナイルウイルスの調査結果について
(出典：厚生労働省)

(1) 検疫所における調査結果

① 北米からの直行便における機内及びコンテナ貨物の蚊属調査

	実施機数 (機)	調査結果	備考
平成14年	211	1機から1匹捕獲 (ウイルス保有検査は陰性)	成田・関空・名古屋空港
平成15年	1,193	6機から6匹捕獲 (ウイルス保有検査は陰性)	成田・関空・名古屋空港
平成16年	1,460	12機から12匹捕獲 (ウイルス保有検査は陰性)	成田・関空・名古屋空港
平成17年	418	1機から1匹捕獲 (ウイルス保有検査は陰性)	成田・関空・名古屋空港 及び中部空港
平成18年	486	1機から1匹捕獲 (ウイルス保有検査は陰性)	成田・関空・中部空港
平成19年	355	4機から6匹捕獲 (ウイルス保有検査は陰性)	成田・関空・中部空港
平成20年	432	8機から52匹捕獲 (ウイルス保有検査は陰性)	成田・関空・中部空港
平成21年	184	1機から1匹捕獲 (ウイルス保有検査は陰性)	成田・関空・中部空港
平成22年	205	2機から2匹捕獲 (ウイルス保有検査は陰性)	成田・関空・中部空港
合計	4,944		

② 空・海港における蚊属調査

	捕獲数	ウイルス保有検査結果	備考
平成12年	3,361	陰性	全検疫所
平成13年	17,247	陰性	全検疫所
平成14年	14,373	陰性	全検疫所
平成15年	8,832	陰性	全検疫所
平成16年	6,112	陰性	全検疫所
平成17年	3,579	陰性	全検疫所
平成18年	11,716	陰性	全検疫所
平成19年	10,629	陰性	全検疫所
平成20年	16,357	陰性	全検疫所
平成21年	13,460	陰性	全検疫所
平成22年	13,534	陰性	全検疫所
合計	119,470	陰性	全検疫所

(2) 自治体における調査結果

	蚊	野鳥
平成15年	12,376 (6自治体)	179 (8自治体)
平成16年	28,932 (10自治体)	95 (9自治体)
平成17年	61,750 (15自治体)	104 (9自治体)
平成18年	36,342 (25自治体)	150 (8自治体)
平成19年	54,649 (27自治体)	187 (10自治体)
平成20年	37,825 (20自治体)	77 (5自治体)
平成21年	36,617 (27自治体)	28 (5自治体)
合計	陰性	陰性

平成24年2月28日
農 林 水 産 省

ウエストナイルウイルス感染症防疫マニュアルの改正ポイント（案）

本病が米国で流行して以降10年が経過するが、①これまで我が国の家畜での発生はなく、国内のサーベイランス結果は全て陰性であること、②海外の馬における発生状況も毎年発生数が減少し、現在はピーク時の1／3程度となっていること等から現状では国内の家畜で本病が発生するリスクは低いものと考えられる。

また、当省の「新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業」の中の「我が国における家畜伝染性疾病的サーベイランスに関する研究」の中ではこうした現状も踏まえ、サーベイランス方法を見直すべきと提言されたことから（参考2）、都道府県の家畜衛生部局でマニュアルに基づき行ってきたサーベイランスを以下のとおり見直し、より効率的なものとする。

○ 陽性確認時の野鳥及び馬の強化サーベイランス

- ・ 平時に家畜保健衛生所で実施されていた蚊及び野鳥のサーベイランスを取り止める。
- ・ 国内の空・海港、自治体及び調査・研究等で実施されている蚊及び野鳥における本病の検査で陽性となった場合や馬で患畜が確認された場合に、死亡野鳥の検査や異常馬の有無を確認するために設定する「本ウイルス確認地域」及び「本ウイルス感染確認地域」の範囲を20kmから10kmに縮小する。

〔 本病ウイルスに対する感受性が高いとされるカラスの行動範囲が最大で10kmであることが明らかになったことを踏まえたもの。 〕

○ 発生状況に応じた本ウイルス感染確認地域の拡大

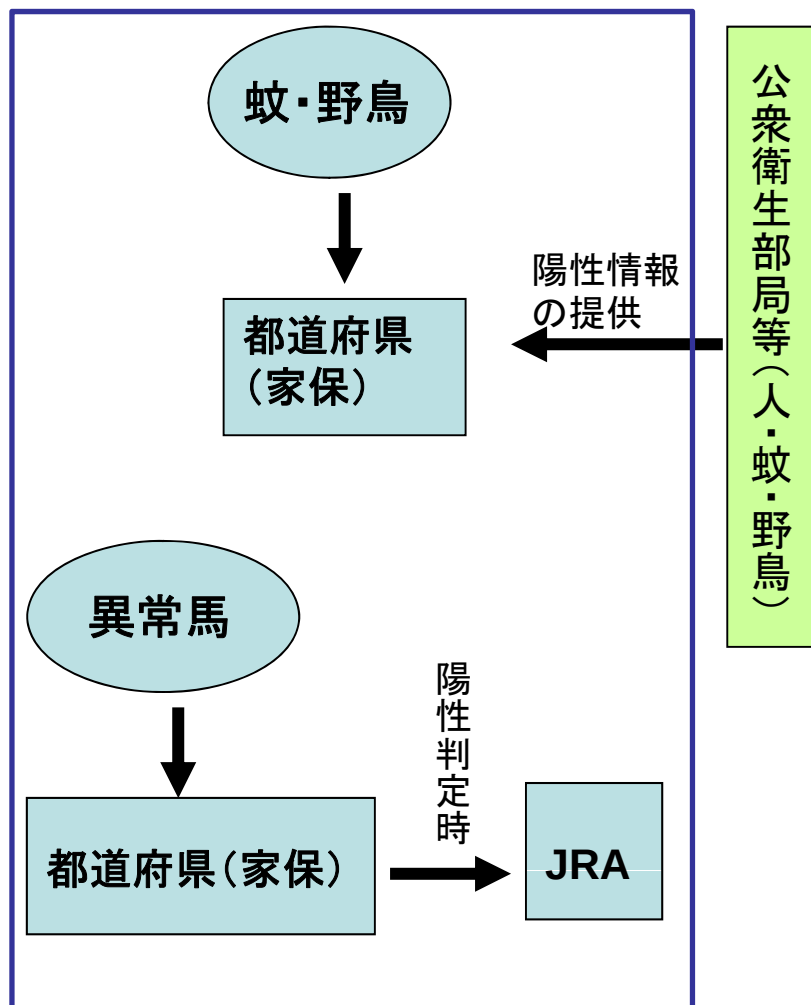
- ・ 本病は、口蹄疫等と比較すると面的に感染が拡大する疾病ではないが、吸血昆虫及び野鳥が媒介することにより、広範囲に拡大する可能性があるため、新たな措置として、発生状況等により感染が広がっていると考えられる場合は、当該地域を10kmの範囲を超えて拡大できることとする。

ウエストナイルウイルスの感染範囲の比較

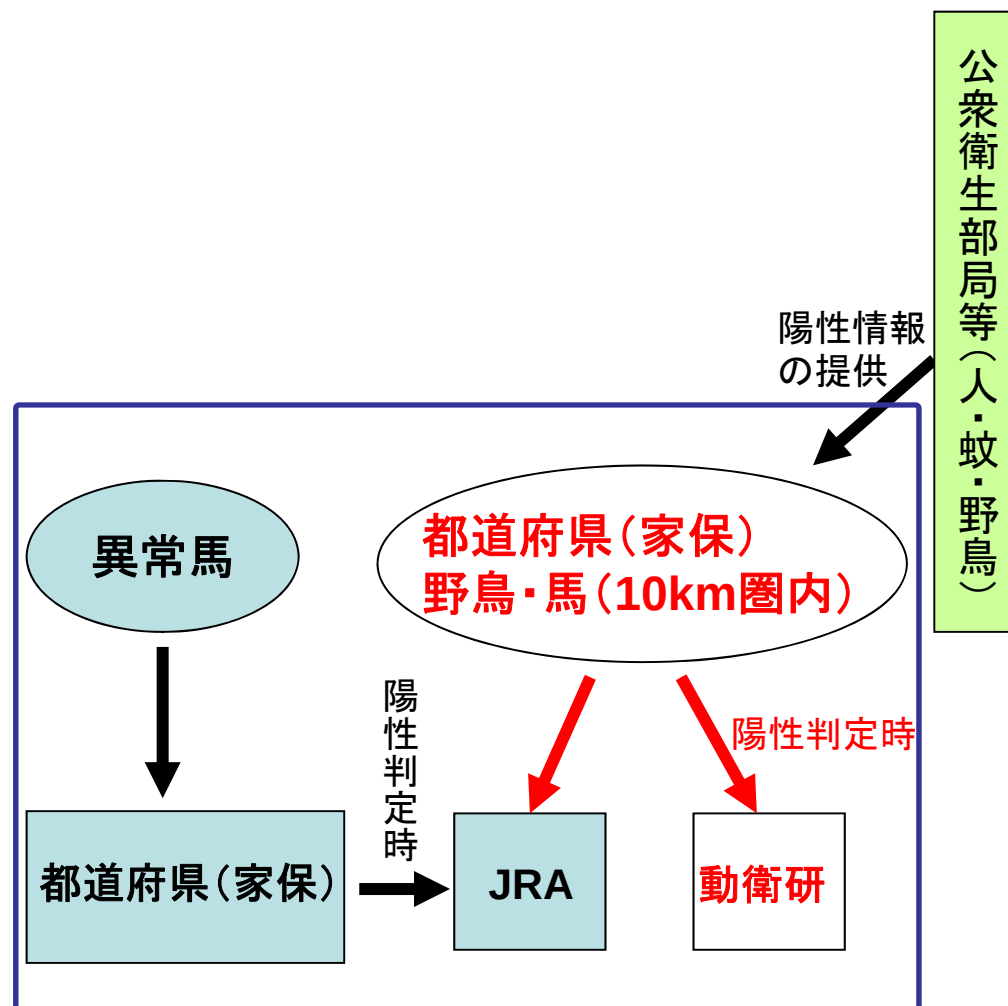
	ウイルスの感染範囲			サーベイランス実施地域 (案)
	蚊	死亡野鳥	馬 (終末宿主)	
蚊から ウイルス検出	○	△	×	10km
死亡野鳥から ウイルス検出	○	○	×	10km
異常馬から ウイルス検出	○	○	○	10km

ウエストナイルウイルス感染症の検査・サーベイランス体制の変更案

<現行>



<変更案>



【発生時の対応】

- 発生農場: 異常馬・同居馬の移動制限、経過観察、施設等の消毒、吸血昆虫の駆除、野鳥忌避対策等
- 周辺地域: 馬飼養施設、動物診療施設等への周知、吸血昆虫の駆除、野鳥のサーベイランスの強化等

○ウエストナイルウイルス感染症防疫マニュアル（平成15年1月21日付け14生畜第5419号農林水産省生産局畜産部長通知）
 変更案新旧対照条文（案）

改 正 案	現 行
I・II （略） III <u>野鳥及び馬のサーベイランス</u> <u>ウエストナイルウイルス（以下「本ウイルス」という。）は、蚊によって媒介されるが、米国における知見では、馬での本病の発生に先立ち野鳥の死亡が散発する場合があることを踏まえ、馬での本病の発生の予防及びまん延防止を図る観点から、野鳥及び馬について、次のとおりサーベイランスを実施するものとする。</u> <u>1 本ウイルス確認地域</u> <u>国内で実施されている蚊又は野鳥の本病に係る検査で陽性が確認された場合には、当該蚊又は野鳥を採取した場所（以下「採取地」という。）を中心として半径10km以内を「本ウイルス確認地域」とする。ただし、海外から到着した航空機内及びコンテナ貨物内で採取した蚊で陽性が確認された場合は、この限りでない。</u> <u>なお、確認状況等から本ウイルス確認地域外にもウイルスが存在すると考えられる場合には、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。）と協議の上、本ウイルス確認地域の範囲を拡大することができる。</u> <u>2 野鳥</u> <u>（1）検体の採取</u> <u>採取地を管轄する家畜保健衛生所（以下「家保」という。）</u>	I・II （略） III <u>蚊及び野鳥のサーベイランス</u> <u>ウエストナイルウイルス（以下「本ウイルス」という。）は蚊によって媒介され、米国における知見では、馬での発生に先立ち野鳥の死亡が散発する場合があることを踏まえ、蚊及び野鳥における本ウイルスの保有状況について、次のとおりサーベイランスを実施するものとする。</u> <u>1 検体の採取</u> <u>（1）蚊</u> <u>家畜保健衛生所（以下「家保」という。）は、都道府県畜産主務課（以下「県畜産主務課」という。）が別紙2－1の1に定める方法に従い作成した調査計画に基づき、雌蚊について、調査対象地域内の1ヵ所から当該地域における発生時期に応じて、別紙2－1の2の（1）に定める方法に従い毎月1回定期的に10匹以上捕獲し、記録するものとする。</u> <u>（2）野鳥</u> <u>① 家保は、県畜産主務課が別紙2－1の1に定める方法に従い作成した調査計画に基づき、また、環境部局からの情報提供や検体の提供を活用し、調査対象地域における死亡野鳥を別紙2－1の2の（2）に定める方法に従い採取し、記録するものとする。</u>

は、動物衛生課と協議の上、1の検査で陽性が確認された日から少なくとも14日間、本ウイルス確認地域（港又は飛行場の区域を除く。）において、別紙2-1に従い死亡野鳥を採取し、記録するものとする。

(2) 検体の検査

採取した検体については、採取日又はその翌日に別紙2-2に定める方法に従い検査を行うものとする。

(3) 連絡及び検査材料の送付

家保における(2)の検査において、本ウイルスの存在を否定することができない結果が得られた場合には、家保は、直ちに都道府県畜産主務課（以下「県畜産主務課」という。）を経由して動物衛生課及び独立行政法人農業・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。）に別記様式1により連絡するとともに、別紙3及び別紙4に定める方法に従い当該検査材料（生材料、乳剤及びPCR産物）を動物衛生研究所に送付するものとする。

なお、この時点では、非特異反応等が検査結果に影響を与えている可能性も考慮し、関係機関は、Vの病性検査の結果が得られるまでの間、当該情報の取扱いに留意するものとする。

3 馬

採取地を管轄する家保は、動物衛生課と協議の上、1の検査で陽性が確認された日から少なくとも14日間、獣医師及び飼養者等（以下「飼養者等」という。）内の協力を得て、本ウイルス確認地域（港又は飛行場の区域を除く。）内の馬飼育施設への立入調査等を実施し、別紙5の症状を示す馬（以下「異常馬」という。）の有無を確認するとともに、関係施設における

なお、採取羽数については、異常が疑われない場合にあっては毎月1羽程度定期的に採取するものとし、死亡野鳥の増加等異常が疑われる場合にあっては農林水産省消費・安全局動物衛生課（以下「動物衛生課」という。）及び独立行政法人農業・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。）に連絡して対応を協議するものとする。

② 県畜産主務課は、野鳥の死亡等の通報があった場合には、日時、種類等を記録しておくものとする。

2 検査

(1) 家保は、1の(1)の蚊及び(2)の野鳥について、採取日又はその翌日に別紙2-1の2の(3)に定める方法に従い検査を行うものとする。

(2) 県畜産主務課は、当月分のサーベイランスの検査実績を取りまとめ、別記様式1により翌月20日までに動物衛生課へ連絡するものとする。

3 連絡及び検査材料の送付

(1) 家保における2の検査において、本ウイルスの存在を否定できない結果が得られた場合には、家保は直ちに県畜産主務課を経由して動物衛生課及び動物衛生研究所に別記様式2により連絡するとともに、別紙3及び別紙4に定める方法に従い当該検査材料（生材料、乳剤及びPCR産物）を動物衛生研究所に送付するものとする。

なお、この時点では、非特異反応等が検査結果に影響を与えている可能性も考慮し、関係機関は、Vの病性検査の結果が得られるまでの間、当該情報の取扱いに留意するものとする。

吸血昆虫の駆除等を指導するものとする。

なお、馬飼育施設への立入調査等により異常馬が確認された場合には、Ⅳの２から４までに基づき対応するものとする。

Ⅳ 異常馬発見時の措置等

１ 異常馬の通報

県畜産主務課は、飼養者等に対し、異常馬を発見したときは、直ちに家保に通報するよう周知するものとする。

２・３ （略）

４ 連絡

県畜産主務課は、家畜防疫員が馬の検査材料を採材した場合には、その内容を別記様式２により動物衛生課及びＪＲＡ栃木支所に連絡するものとする。

Ⅴ 病性検査

１ 動物衛生研究所及びＪＲＡ栃木支所は、Ⅲの２の（３）又はⅣの３により送付された死亡野鳥及び馬の検査材料について直ちに病性検査を実施するものとする。

なお、当分の間、病原学的検査にあつてはウイルス分離・同定、ＰＣＲ法を用いた遺伝子診断（以下「ＰＣＲ法」という。）等により、血清学的検査にあつては中和試験及びＥＬＩＳＡ法により行うものとし、必要に応じて病理組織学的検査を行うものとする。

Ⅳ 異常馬発見時の措置等

１ 異常馬の通報

県畜産主務課は、獣医師及び飼養者等（以下「飼養者等」という。）に対し、別紙５の症状を示した馬（以下「異常馬」という。）を発見したときは、直ちに家保に通報するよう周知するものとする。

２・３ （略）

４ 連絡

県畜産主務課は、家畜防疫員が馬の検査材料を採材した場合には、その内容を別記様式３により動物衛生課及びＪＲＡ栃木支所に連絡するものとする。

Ⅴ 病性検査

１ 動物衛生研究所及びＪＲＡ栃木支所は、Ⅲの３又はⅣの３により送付された蚊、死亡野鳥及び馬の検査材料について直ちに病性検査を実施するものとする。

なお、当分の間、病原学的検査にあつてはウイルス分離・同定、ＰＣＲ法を用いた遺伝子診断（以下「ＰＣＲ法」という。）等により、血清学的検査にあつては中和試験及びＥＬＩＳＡ法により行うものとし、必要に応じて病理組織学的検査を行うものとする。

2 病性鑑定施設においては、本ウイルスの外部への漏出を防止するため、死亡野鳥及び馬の検査材料を「安全キャビネット」内で取り扱うことを原則とするとともに、施設及び器具の消毒や吸血昆虫の駆除等を行うものとする。また、検査実施者は、ゴム手袋、マスク等を用いて感染予防措置を講ずるものとする。

3 報告及び連絡

動物衛生研究所及びＪＲＡ栃木支所は、Ⅲの２の（３）又はⅣの３により送付された死亡野鳥及び馬の病性検査の結果を県畜産主務課に連絡するとともに、動物衛生課に報告するものとする。

Ⅵ 本病発生時の措置等

1 患畜等の定義

（１）・（２）（略）

（３）本ウイルス感染確認地域及び本ウイルス抗体等確認地域

① 馬において患畜が確認された場合は、その確認された場所を中心として半径１０ｋｍ以内を「本ウイルス感染確認地域」とする。なお、確認状況等から本ウイルス感染確認地域外での発生が多発すると考えられる場合には、動物衛生課と協議の上、本ウイルス感染確認地域の範囲を拡大することができる。

② 馬において疑似患畜が確認された場合は、その確認された場所を中心として半径１０ｋｍ以内を「本ウイルス抗体等確認地域」とする。なお、確認状況等から本ウイルス抗体確認地域外での発生が多発すると考えられる場合には、動物衛生課と協議の上、本ウイルス抗体等確認地域の範囲

2 病性鑑定施設においては、本ウイルスの外部への漏出を防止するため、蚊、死亡野鳥及び馬の検査材料を「安全キャビネット」内で取り扱うことを原則とするとともに、施設及び器具の消毒や吸血昆虫の駆除等を行うものとする。また、検査実施者は、ゴム手袋、マスク等を用いて感染予防措置を講ずるものとする。

3 報告及び連絡

動物衛生研究所及びＪＲＡ栃木支所は、Ⅲの３又はⅣの３により送付された蚊、死亡野鳥及び馬の病性検査の結果を県畜産主務課に連絡するとともに、動物衛生課に報告するものとする。

Ⅵ 本病発生時の措置等

1 患畜等の定義

（１）・（２）（略）

（３）本ウイルス感染確認地域及び本ウイルス抗体等確認地域

① 馬において患畜が確認された場合、蚊若しくは野鳥において本ウイルスが分離・同定若しくはＰＣＲ法により陽性とされた場合又は都道府県公衆衛生部局で本ウイルスが確認された場合は、当該患畜等が存在する場所を中心として半径２０ｋｍ以内を「本ウイルス感染確認地域」とする。

② 馬において疑似患畜が確認された場合は、その確認された場所を中心として半径２０ｋｍ以内を「本ウイルス抗体等確認地域」とする。

を拡大することができる。

2 本病発生時の連絡体制

(1) 動物衛生研究所及びJRA栃木支所は、野鳥の病性検査において本ウイルスが確認された場合又は異常馬若しくは同居馬の病性検査において患畜若しくは疑似患畜を疑う結果が得られた場合には、その旨を直ちに検査を依頼した県畜産主務課及び動物衛生課に連絡するものとする。

(2) (1) の連絡を受けた県畜産主務課は、家保、公衆衛生等の関係部局、隣接県畜産主務課及び当該馬等が所在する市町村に、動物衛生課は、厚生労働省及び環境省に連絡するものとする。

3 患畜及び疑似患畜確認時の措置等

(1) 患畜、疑似患畜等の措置

① 患畜及び疑似患畜

家畜防疫員は、患畜又は疑似患畜の飼養者に、当該馬をみだりに農場外へ移動させないように指示するとともに、動物衛生課と協議の上、移動の制限を開始してから少なくとも14日間、当該馬の経過観察を行い、PCR法により本ウイルスが血液中に存在しないことを確認した場合には、移動の制限を解除するものとする。

なお、PCR法により陽性とされた場合は、さらに検査を継続するものとする。

② 同居馬

家畜防疫員は、必要があると認めるときは、患畜又は疑似患畜が別紙5の症状を示した日から遡って14日以内に当該馬と同居していた馬について、必要に応じて獣医師と連携し、当該同居馬の経過観察を行うとともに、必要に応

2 本病発生時の連絡体制

(1) 動物衛生研究所及びJRA栃木支所は、蚊若しくは野鳥の病性検査において本ウイルスが確認された場合又は異常馬若しくは同居馬の病性検査において患畜若しくは疑似患畜を疑う結果が得られた場合には、その旨を直ちに検査を依頼した県畜産主務課及び動物衛生課に連絡するものとする。

(2) (1) の連絡を受けた県畜産主務課は、家保、公衆衛生等の関係部局、隣接県畜産主務課及び当該馬等が所在する市町村に、動物衛生課は、厚生労働省に連絡するものとする。

3 患畜及び疑似患畜確認時の措置等

(1) 患畜、疑似患畜等の措置

① 患畜及び疑似患畜

家畜防疫員は、患畜又は疑似患畜の飼養者に、当該馬をみだりに農場外へ移動させないように指示するとともに、移動の制限を開始してから14日間当該馬の経過観察を行い、PCR法により本ウイルスが血液中に存在しないことを確認した場合には、移動の制限を解除するものとする。

なお、PCR法により陽性とされた場合は、さらに検査を継続するものとする。

② 同居馬

家畜防疫員は、必要があると認めるときは、患畜又は疑似患畜が別紙5の症状を示した日から遡って14日以内に当該馬と同居していた馬について、必要に応じて獣医師と連携し、当該同居馬の経過観察を行うとともに、必

じてEDTA加血液を採材し、本ウイルスの有無等を確認するものとする。

また、家畜防疫員は、上記の観察及び採材を行う上で必要があるときは、患畜又は疑似患畜の同居馬の飼養者に対し、動物衛生課と協議の上、患畜又は疑似患畜が別紙5の症状を示した日から少なくとも14日間、その飼養場所から移動させないよう指示することができる。

4 本ウイルス感染確認地域及び本ウイルス抗体等確認地域における措置

(1) 本ウイルス感染確認地域

① (略)

② 家保は、動物衛生課と協議の上、患畜等が確認された日から少なくとも14日間、飼養者等の協力を得て、本ウイルス感染確認地域内の馬飼育施設への立入調査等を実施し、異常馬の有無を確認するとともに、本ウイルス感染確認地域の周辺地域において、野鳥のサーベイランスを実施するものとする。

なお、馬飼育施設への立入調査等により異常馬が確認された場合には、IVの2から4までに基づき対応するものとする。

(2) 本ウイルス抗体等確認地域

① (略)

② 家保は、本ウイルス抗体等確認地域において、週1回（抗体確認以降14日以上の間）、採材回数や場所を増加して、野鳥のサーベイランスを実施するものとする。

VII (略)

要に応じてEDTA加血液を採材し、本ウイルスの有無等を確認するものとする。

また、家畜防疫員は、上記の観察及び採材を行う上で必要があるときは、患畜又は疑似患畜の同居馬の飼養者に対し、患畜又は疑似患畜が別紙5の症状を示した日から14日間は、その飼養場所から移動させないよう指示することができる。

4 本ウイルス感染確認地域及び本ウイルス抗体等確認地域における措置

(1) 本ウイルス感染確認地域

① (略)

② 家保は、当該地域において、患畜等が確認された日から14日間は、飼養者等の協力を得て異常馬の有無を観察するとともに、当該地域の周辺地域において、蚊及び野鳥のサーベイランスを実施するものとする。

(2) 本ウイルス抗体等確認地域

① (略)

② 家保は、当該地域において、週1回（抗体確認以降14日以上の間）、採材回数や場所を増加して、蚊及び野鳥のサーベイランスを実施するものとする。

VII (略)

(略) (別紙 1) (別紙 2 - 1) 野鳥のサーベイランスについて 1 死亡野鳥の採取及び記録 (1) 状態の良好な死亡野鳥(明白な変質又は腐敗がないもの)を採取する。 (2) 採取した際には、採取日、採取羽数、種類、採取場所、採取時の状態等を記録する。 2 サーベイランス時の野鳥の脳の処理 別紙 2 - 2 の実施例に従い、又はこれに準じて処理を行うこと。	(略) (別紙 1) (別紙 2 - 1) 蚊及び野鳥のサーベイランスについて 1 調査計画の作成 県畜産主務課は、家保が実施するサーベイランスに先立ち、次の(1)及び(2)を内容とする調査計画を作成するものとする。 (1) 調査対象地域 環境部局、衛生部局等と連携し、馬の飼養状況、野鳥の種類及び生息状況、蚊の種類、発生源、季節的な消長等の情報を把握した上で、調査対象地域を設定する。 (2) 調査対象期間 調査対象地域における蚊及びその幼虫の生息状況並びに発生時期を確認した上で、調査対象期間を設定する。 2 サーベイランスの実施 (1) 雌蚊の捕獲及び記録 ① 雌蚊(少なくとも10匹以上)を、捕虫網、ライトトラップ、ドライアイス・トラップ等を用いて捕獲する(吸血する雌蚊を効率的に採取するため、ドライアイス・トラップを用いることが好ましい)。 ② 捕獲した際には、捕獲日、主な種類、捕獲数及び捕獲場所のほか、天候、気温、付近で確認された野鳥の種類等を記録する。なお、記録に基づき必要に応じて調査計画を見直すこと。
--	--

サーベイランス時の野鳥のPCR検査の手順等について (略) (削る。)	(2) <u>死亡野鳥の採取及び記録</u> ① <u>状態の良い死亡野鳥（明白な変質又は腐敗がないもの）を採取する。</u> ② <u>採取した際には、採取日、採取羽数、種類、採取場所、採取時の状態等を記録する。なお、記録に基づき必要に応じて調査計画を見直すこと。</u> (3) <u>サーベイランス時の蚊及び野鳥の脳の処理</u> <u>別紙2-2の実施例に従い、又はこれに準じて処理を行うこと。</u> (別紙2-2) サーベイランス時の蚊および野鳥のPCR検査の手順等について (略) 第1 <u>蚊の検査方法</u> 1 <u>作業手順</u> <u>蚊の検査方法に係る作業手順については、次のとおりとする。</u> (1) <u>採集：野外で蚊を採集する。</u> (2) <u>殺虫：-20℃以下の低温で殺虫する。</u> (3) <u>分類：雌蚊を分離し、分類する。</u> (4) <u>乳剤作製：捕獲場所・捕獲日・種毎にプールし、乳剤を作製する。</u> (5)・(6) (略)
--	--

(7) 結果報告：結果を判定し、所定様式で報告する。処理に使った方法（装置、キット名、試薬名、抽出したRNAの濃度など）を別記様式2に記入する。

2 作業手順の詳細

1で掲げた作業手順のうち、1の（4）から（6）までの詳細な作業手順は次のとおりとする。

(1) 乳剤作製について（1の（4））

* ウイルスの失活を防ぐために、検体を氷等で冷やしながら作業を行うとともに、作業室は高温にならないよう努めること。

ア 大検体破碎装置を利用する方法

（ア）プール毎に蚊を1.5mlチューブに、1本あたり最大50匹を超えないように入れ計量後、液体窒素（無い場合は-80℃）で凍結する。

（イ）破碎用のビーズ（3～5mmφ、RNase free処理したもの）を適量加える。

（ウ）直ちに装置にセットし、破碎する。

（エ）氷冷したMEM培地（5%FCS（0.2%BSAで代用可）、抗生物質添加）を約10%の乳剤になるように加え、ミキサーなどで懸濁させる。直ちに次に進まない場合は、-80℃で保存する。

（オ）9,000 ×g（10,000 rpm程度）、4℃で30分間遠心する。

（カ）上清をRNA抽出に必要な量だけ新しいRNase freeのチューブに移し、残りを再懸濁してRNA抽出終了まで4℃で保存する。

イ ハンディー型破碎装置を利用する方法

（ア）プール毎に蚊を1.5mlチューブに1本あたり最大50匹を超えないように入れ計量後、クラッシャー（RNase free処

理したもの）を入れる。

（イ）チューブを内筒にセットし、液体窒素（無い場合は-80℃）で凍結する。

（ウ）直ちに外筒にセットし、1分間（-80℃で処理した場合は3分間）手で激しく振盪する。

（エ）チューブを取り出し、蚊が十分破碎されたことを確認する。

（オ）氷冷したMEM培地（5%FCS(0.2%BSAで代用可)、抗生物質添加）を10%乳剤になるように加え、ミキサーなどで懸濁させる。直ちに次に進まない場合は、-80℃で保存する。

（カ）軽く遠心分離してからピンセット（RNase free処理したもの）でクラッシャーを取り出し、9,000 × g（10,000 rpm程度）、4℃で30分間遠心分離する。

（キ）上清をRNA抽出に必要な量だけ新しいRNase freeのチューブに移し、残りを再懸濁してRNA抽出終了まで4℃で保存する。

ウ 乳鉢又はガラスホモジナイザーを用いる方法

（ア）乳鉢又はガラスホモジナイザーは、器とホモジナイザーとを別にアルミホイルで包み、180℃で5時間処理して、RNase freeにする。あるいは、器、ホモジナイザー及びアルミホイルを市販のRNase除去剤で処理した後、包んでも良い。

（イ）乳鉢又はガラスホモジナイザーはあらかじめ氷冷しておく。

（ウ）プール毎に蚊を1.5mlチューブに、1本あたり最大50匹を超えないように入れ計量後、乳鉢又はガラスホモジナイザーに入れる。

（エ）氷冷したMEM培地（5%FCS(0.2%BSAで代用可)、抗生物質添加）を少しずつ加えながら氷上で、破碎する。最終的

に10%乳剤を作製する。直ちに次に進まない場合は、-80℃で保存する。

(オ) 乳剤を全てチューブにとり、9,000 × g (10,000 rpm程度)、4℃で30分間遠心分離する。

(カ) 上清をRNA抽出に必要な量だけ新しいRNase freeのチューブに移し、残りを再懸濁してRNA抽出まで4℃で保存する。

(2) RNA抽出について (1の(5))

通常の市販のキットを使用してRNAを抽出する。RNA抽出の正否は分光光度計などでRNA濃度を測定して確認する。RNA抽出後、残りの懸濁液は2本以上のチューブに分注して-80℃で保存する。

ア RNA濃度の測定

(ア) RNAをRNase free水で希釈する。50~100 μlの液量で測定するタイプの場合は、50~200倍程度。数 μlで測定可能な機械がある場合は希釈の必要はない。

(イ) RNase free水 (希釈していない場合はRNA抽出に使ったバッファー) をブランクにして260nmに対する吸光度を測定する。

(ウ) RNAの濃度は吸光度 × 40 × 希釈倍率 μg/mlと算出する。

* キットによって抽出されるRNA濃度は変わるので、キットに付属の説明書等を参考にするか、販売元に問い合わせること。

イ RNA濃度の測定 (代替法)

分光光度計が利用出来ない場合などは、以下の方法で「何らかの原因でRNAが全く取れていないこと」を否定の上、次のステップに進むこととする。

(ア) 手袋をして、核酸実験用のナイロンメンブレンを適当な
大きさ (2サンプルの場合3cm×8 cm程度に切り取る。

(イ) 鉛筆で下図のように印を付ける。

N ·	1 ·	2 ·
-----	-----	-----

(ナイロンメンブレンにN(水) サンプル番号を書き込み、横に
点をうつ。)

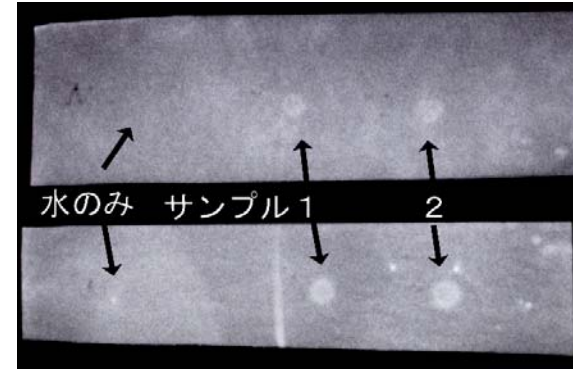
(ウ) 点をうった位置にRNase free水とサンプルを各3～5μl
ずつ滴下する。

(エ) RNA染色色素 (Invitrogen社のSYBR Green II など : 1×
に調製する。) などにメンブレンをいれ、15分程度染色す
る。

(オ) UVトランスイルミネーターで検出する。サンプルがSYBR
Green II で検出できる程度のRNAを含んでいれば、RNAは
抽出されていると考えられる。

* エチジウムブロマイド (0.44mg/ml 程度 of 原液を10,000
倍希釈したもの) でも染色可能だが、波長の問題等で
肉眼での判定は困難なので、撮影した写真で判断す
ること。

* UVトランスイルミネーターで撮影する場合、通常エチ
ジウムブロマイドで染色したゲルを撮影する際と同じ
フィルターで撮影が可能である。



(図 1 : ナイロンメンブレンによるRNA抽出確認例)
水のみでは光らないが、RNAサンプルは光る。
上のナイロンメンブレンはエチジウムブロマイド染色。
下のナイロンメンブレンはSYBR Green II 染色。

ウ RT-PCRについて (1の(6))

RT-PCRは国立感染症研究所の方法に準拠した以下の方法により、WNV E遺伝子の部分領域を増幅するPCRを実施する。

プライマー (市販品) :

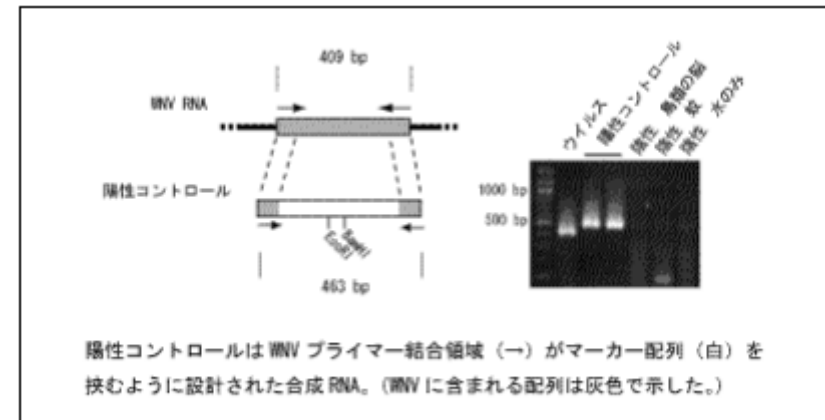
WNNY514new: 5' - Cgg CgC CTT CAT ACA CW -3'

WNNY904: 5' - gCC TTT gAA CAg ACg CCA TA -3'

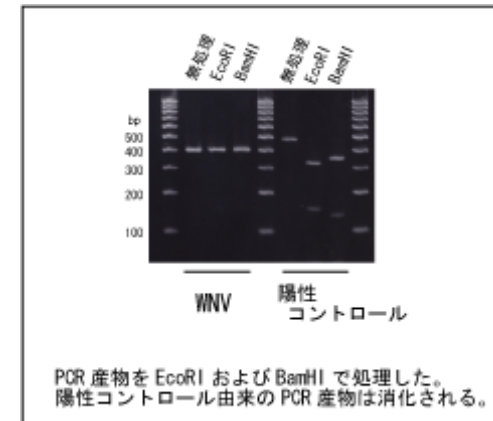
プライマーはRNase free水で、 $100\mu\text{M}$ (= $100\mu\text{mol/l}$ = $100\text{pmol}/\mu\text{l}$;業者によって表記が異なる。)あるいは $50\mu\text{M}$ master stock solutionとして調製し、希釈して $10\mu\text{M}$ および $2\mu\text{M}$ working stock solutionを調製する。working stock solutionは10回分程度に分注する。master stock solution、working stock solution とともに -20°C 以下で保存する。

陽性コントロール (動物衛生研究所より配布)

陽性コントロールは、プライマー結合領域を含む合成RNAがエタノール中に調製され1回使い切りになっている。プライマー結合部位以外はWNV配列を含まず、WNVよりも大きなサイズのDNA断片が増幅される(WNV: 409bp、陽性コントロール463bp)。交差汚染を防ぐために、陽性コントロールは、サンプルの調整後に使用する。また、本来のWNVにはない制限酵素EcoRI、BamHI切断部位が内在しており、これを利用して交差汚染を検出できる。



(図 2 : RT-PCRの結果 (例) と陽性コントロールの構造)



(図3：陽性コントロール制限酵素処理後の泳動パターン)

エ

(ア) RTとPCRを別に行う場合

a RT反応：M-MLV reverse transcriptaseとRibonuclease Inhibitorを使用し 氷上で調製する。

(a) RNase freeのPCR用チューブをサンプル数+2本用意し、以下の試薬を加える。

2 μ M WNNY904プライマー	1 μ l
10 mM dNTP	1 μ l

(b) 各チューブに材料由来のRNA溶液を10 μ lずつ加える。チューブの蓋をする。(c) RNase free水10 μ lを陰性コントロールのチューブに加える。チューブの蓋をする。

(d) 陽性コントロールの入ったチューブを-20℃から取り出し、13,000 $\times$ g (12000rpm程度)、4℃で5分間遠心し、上清を除去・風乾(15分～30分程度)するRNase free水10 μ lを加えてコントロールを溶かし、陽性コントロールのチューブに全量入れる。チューブの蓋をする。

(e) 65℃で5分間インキュベートし、急速氷冷する。

(f) 軽く遠心してスピンドウン後、各チューブに以下の試薬を加える。

<u>5× First-Strand Buffer</u>	<u>4 μ l</u>
<u>0.1M DTT</u>	<u>2 μ l</u>
<u>Ribonuclease Inhibitor</u>	<u>1 μ l</u>

蓋を閉めタッピングで軽く混和後、37°Cで2分間インキュベートする。

(g) M-MLV reverse transcriptaseを1 μ lずつ加える。

(h) 37°Cで50分間インキュベートして、RT反応を起こさせる。

(i) そのまま70°Cで15分間インキュベートして、酵素を失活させる。

(j) チューブを氷上に移す。

b PCR反応 : Ex Taqを使用し、PCR反応を行い、電気泳動を行う。

(a) PCR溶液をサンプル数+4本分調製し、サンプル数+3本のPCRチューブに24 μ lずつ分注する。

(1本量)

<u>10 × Buffer</u>	<u>2.5 μ l</u>
<u>2.5mM dNTPs</u>	<u>2 μ l</u>
<u>10 μ M WNNY514new</u>	<u>2 μ l</u>
<u>10 μ M WNNY904</u>	<u>2 μ l</u>
<u>Ex Taq</u>	<u>0.125 μ l</u>
<u>DW</u>	<u>15.375 μ l</u>
<u>合計</u>	<u>24 μ l</u>

(b) DW1 μ lをチューブに加え、非逆転写陰性コントロールとし

て用いる。

(c) サンプル由来RT産物を1 μ lずつチューブに加える。チューブの蓋をする。(d) 陰性コントロールRT産物を1 μ lチューブに加える。チューブの蓋をする。(e) 陽性コントロールRT産物を1 μ lチューブに加える。チューブの蓋をする。(f) PCR装置にセットして反応させる。

pre-denature: 94°C 2分

↓

{	<u>denature: 94°C</u>	<u>30秒</u>	}	<u>40サイクル</u>
	<u>annealing: 53°C</u>	<u>1分</u>		
	<u>extension: 72°C</u>	<u>1分</u>		

↓

post-extension: 72°C 7分

(g) 各反応液10 μ lを2%アガロースゲルで電気泳動する。エチジウムブロマドで染色して、UVで検出する。

(ア) 1チューブ法でRTとPCRを実施する場合

酵素: Tth DNA polymeraseを使用し、氷上で調製する。(Tth DNA polymerase Reverse transcription活性とDNA polymerase活性両方を持つ酵素である。)

a RT反応のステップ

(a) RT反応液をサンプル数+3本分調製し、サンプル数+2本のPCRチューブに9 μ ずつ分注する。

(1本量)

<u>10 × Reverse Transcription buffer</u>	<u>1 μl</u>
<u>2.5mM dNTPs</u>	<u>0.8 μl</u>
<u>MnCl₂</u>	<u>1 μl</u>
<u>10 μM WNNY904</u>	<u>0.75 μl</u>
<u>Tth polymerase</u>	<u>0.5 μl</u>
<u>RNase free 水</u>	<u>0.95 μl</u>
<u>合計</u>	<u>5 μl</u>

(b) サンプル由来RNAを5 μlずつチューブに加える。蓋を閉める。

(c) RNase free水を5 μlチューブに加え陰性コントロールにする。蓋を閉める。(d) 陽性コントロールの入ったチューブを-20℃から取り出し、13,000 × g(12000rpm程度)、4℃で5分間遠心し、上清を除去・風乾(15分~30分程度)するRNase free水5 μlを加えてコントロールを溶かし、陽性コントロールのチューブに全量入れる。チューブの蓋をする。

(e) 70℃で20分インキュベートし、急氷冷する。

b PCR反応のステップ

(f) 20分のインキュベートの間に以下の試薬をサンプル数+3本分調製する。

(1本量)

<u>10 μM WNNY 514new</u>	<u>0.75 μl</u>
<u>Tth DNA Chelate 10 × Buffer</u>	<u>4.0 μl</u>
<u>MgCl₂</u>	<u>4.0 μl</u>
<u>DW水</u>	<u>31.25 μl</u>
<u>合計</u>	<u>40 μl</u>

(g) 急冷後、各チューブに40 μ lずつ加える。

(h) PCR装置にセットして反応を行う。

pre-reaction:

94°C 2分

70°C 20分

94°C 2分

↓

{	<u>denature: 94°C</u>	<u>30秒</u>	}	<u>40サイクル</u>
	<u>annealing: 53°C</u>	<u>1分</u>		
	<u>extension: 72°C</u>	<u>1分</u>		

↓

post-extension: 72°C 7分

(i) 各反応液10 μ lを2%アガロースゲルで電気泳動する。エチジウムブロマイドで染色して、UVで検出する。

第1 死亡野鳥の検査方法

1 作業手順
(略)

2 作業手順の詳細

1で掲げた作業手順のうち、1の(3)から(5)までについての詳細な作業手順は、次のとおりとする。

(1) (略)

第2 死亡野鳥の検査方法

1 作業手順
(略)

2 作業手順の詳細

(1) (略)

(2) RNA抽出(1の(4))～RT-PCRの実施(1の(5))
について

通常の市販のキットを使用してRNAを抽出する。RNA抽出の正否は分光光度計などでRNA濃度を測定して確認できる(ただし、キャリアーRNAを使用するキットで抽出した場合は、RNA濃度測定の意義はない)。RNA抽出後、残りの懸濁液は2本以上のチューブに分注して-80℃で保存する。

ア RNA濃度の測定

(ア) RNAをRNase free水で希釈する。50～100 μ lの液量で測定するタイプの場合は、50～200倍程度。数 μ lで測定可能な機械がある場合は希釈の必要はない。

(イ) RNase free水(希釈していない場合はRNA抽出に使ったバッファー)をブランクにして260nmに対する吸光度を測定する。

(ウ) RNAの濃度は吸光度 $\times$ 40 $\times$ 希釈倍率 μ g/mlと算出する。

* キットによって抽出されるRNA濃度は変わるので、キットに付属の説明書等を参考にするか、販売元に問い合わせること。

イ RNA濃度の測定(代替法)

分光光度計が利用出来ない場合などは、以下の方法で「何らかの原因でRNAが全く取れていないこと」を否定の上、次のステップに進むこととする。

(ア) 手袋をして、核酸実験用のナイロンメンブレンを適当な大きさ(2サンプルの場合3cm $\times$ 8 cm程度に切り取る。

(イ) 鉛筆で下図のように印を付ける。

(2) RNA抽出(1の(4))～RT-PCRの実施(1の(5))
について

蚊の処理方法を参照すること。

N・

1・

2・

(ナイロンメンブレンにN(水) サンプル番号を書き込み、横に点をうつ。)

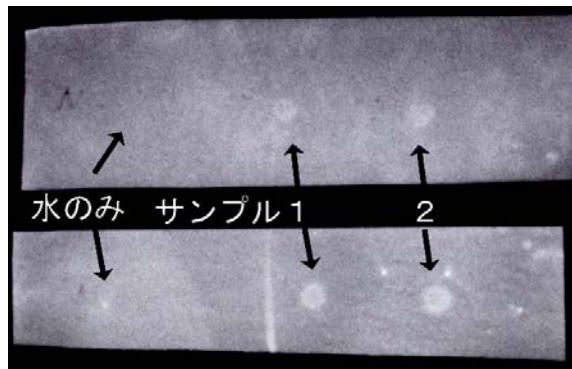
(ウ) 点をうった位置にRNase free水とサンプルを各3~5 μ lずつ滴下する。

(エ) RNA染色色素 (Invitrogen社のSYBR Green II など:1 $\times$ に調製する。) などにメンブレンをいれ、15分程度染色する。

(オ) UVトランスイルミネーターで検出する。サンプルがSYBR Green II で検出できる程度のRNAを含んでいれば、RNAは抽出されていると考えられる。

* エチジウムブロマイド(0.44mg/ml程度の原液を10,000倍希釈したもの)でも染色可能だが、波長の問題等で肉眼での判定は困難なので、撮影した写真で判断すること。

* UVトランスイルミネーターで撮影する場合、通常エチジウムブロマイドで染色したゲルを撮影する際と同じフィルターで撮影が可能である。



(図1：ナイロンメンブレンによるRNA抽出確認例)

水のみでは光らないが、RNAサンプルは光る。

上のナイロンメンブレンはエチジウムブロマイド染色。

下のナイロンメンブレンはSYBR Green II 染色。

ウ RT-PCRについて (1の(6))

RT-PCRは国立感染症研究所の方法に準拠した以下の方法により、WNV E遺伝子の部分領域を増幅するPCRを実施する。

プライマー (市販品) :

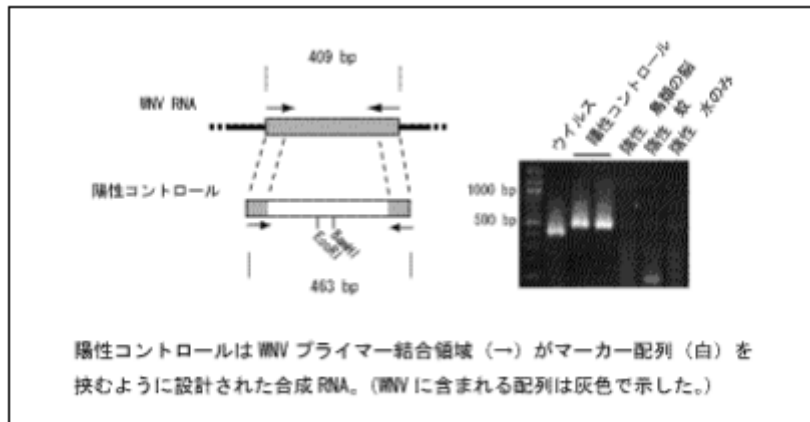
WNNY514new: 5' - Cgg CgC CTT CAT ACA CW -3'

WNNY904: 5' - gCC TTT gAA CAg ACg CCA TA -3'

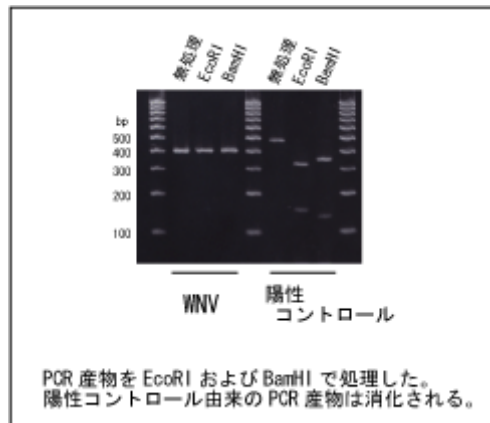
プライマーはRNase free水で、100 μ M (=100 μ mol/l=100pmol/ μ l; 業者によって表記が異なる。)あるいは50 μ M master stock solutionとして調製し、希釈して10 μ M および2 μ M working stock solutionを調製する。working stock solutionは10回分程度に分注する。master stock solution、working stock solution とともに-20℃以下で保存する。

陽性コントロール (動物衛生研究所より配布)

陽性コントロールは、プライマー結合領域を含む合成RNAがエタノール中に調製され1回使い切りになっている。プライマー結合部位以外はWNV配列を含まず、WNVよりも大きなサイズのDNA断片が増幅される (WNV: 409bp、陽性コントロール463bp)。
交差汚染を防ぐために、陽性コントロールは、サンプルの調整後に使用する。また、本来のWNVにはない制限酵素EcoRI、BamHI切断部位が内在しており、これを利用して交差汚染を検出できる。



(図 2 : RT-PCRの結果 (例) と陽性コントロールの構造)



(図 3 : 陽性コントロール制限酵素処理後の泳動パターン)

エ

(ア) RTとPCRを別に行う場合

- a RT反応 : M-MLV reverse transcriptaseとRibonuclease Inhibitorを使用し 氷上で調製する。

(a) RNase freeのPCR用チューブをサンプル数+2本用意し、以下の試薬を加える。

<u>2 μ M WNNY904プライマー</u>	<u>1 μ l</u>
<u>10 mM dNTP</u>	<u>1 μ l</u>

(b) 各チューブに材料由来のRNA溶液を10 μ lずつ加える。

チューブの蓋をする。

(c) RNase free水10 μ lを陰性コントロールのチューブに加える。チューブの蓋をする。

(d) 陽性コントロールの入ったチューブを-20°Cから取り出し、13,000 $\times$ g (12000rpm程度)、4°Cで5分間遠心し、上清を除去・風乾 (15分~30分程度) するRNase free水10 μ lを加えてコントロールを溶かし、陽性コントロールのチューブに全量入れる。チューブの蓋をする。

(e) 65°Cで5分間インキュベートし、急速氷冷する。

(f) 軽く遠心してスピンドウン後、各チューブに以下の試薬を加える。

<u>5$\times$ First-Strand Buffer</u>	<u>4 μ l</u>
<u>0.1M DTT</u>	<u>2 μ l</u>
<u>Ribonuclease Inhibitor</u>	<u>1 μ l</u>

蓋を閉めタッピングで軽く混和後、37°Cで2分間インキュベートする。

(g) M-MLV reverse transcriptaseを1 μ lずつ加える。

(h) 37°Cで50分間インキュベートして、RT反応を起こさせる。

(i) そのまま70°Cで15分間インキュベートして、酵素を失活させる。

(j) チューブを氷上に移す。

b) PCR反応：Ex Taqを使用し、PCR反応を行い、電気泳動を行う。

(a) PCR溶液をサンプル数+4本分調製し、サンプル数+3本のPCRチューブに24 μ ずつ分注する。

(1本量)

<u>10 × Buffer</u>	<u>2.5μl</u>
<u>2.5mM dNTPs</u>	<u>2μl</u>
<u>10μM WNNY514new</u>	<u>2μl</u>
<u>10μM WNNY904</u>	<u>2μl</u>
<u>Ex Taq</u>	<u>0.125μl</u>
<u>DW</u>	<u>15.375μl</u>

<u>合計</u>	<u>24μl</u>
-----------	----------------------------

(b) DW1 μ lをチューブに加え、非逆転写陰性コントロールとして用いる。

(c) サンプル由来RT産物を1 μ lずつチューブに加える。チューブの蓋をする。

(d) 陰性コントロールRT産物を1 μ lチューブに加える。チューブの蓋をする。

(e) 陽性コントロールRT産物を1 μ lチューブに加える。チューブの蓋をする。

(f) PCR装置にセットして反応させる。

pre-denature: 94°C 2分

↓

denature: 94°C 30秒

<u>annealing: 53°C</u>	<u>1分</u>	<u>40サイクル</u>
<u>extension: 72°C</u>	<u>1分</u>	

↓

post-extension: 72°C 7分

(g) 各反応液10 μ lを2%アガロースゲルで電気泳動する。エチジウムブロマドで染色して、UVで検出する。

(ア) 1チューブ法でRTとPCRを実施する場合

酵素：Tth DNA polymeraseを使用し、氷上で調製する。(Tth DNA polymerase Reverse transcription活性とDNA polymerase活性両方を持つ酵素である。)

a RT反応のステップ

(a) RT反応液をサンプル数+3本分調製し、サンプル数+2本のPCRチューブに9 μ ずつ分注する。

(1本量)

<u>10 × Reverse Transcription buffer</u>	<u>1μl</u>
<u>2.5mM dNTPs</u>	<u>0.8μl</u>
<u>MnCl₂</u>	<u>1μl</u>
<u>10μM WNNY904</u>	<u>0.75μl</u>
<u>Tth polymerase</u>	<u>0.5μl</u>
<u>RNase free 水</u>	<u>0.95μl</u>
<u>合計</u>	<u>5μl</u>

(b) サンプル由来RNAを5 μ lずつチューブに加える。蓋を閉める。

(c) RNase free水を5 μ lチューブに加え陰性コントロールに

する。蓋を閉める。(d) 陽性コントロールの入ったチューブを-20℃から取り出し、13,000 × g (12000rpm程度)、4℃で5分間遠心し、上清を除去・風乾(15分~30分程度)するRNase free水5μlを加えてコントロールを溶かし、陽性コントロールのチューブに全量入れる。チューブの蓋をする。

(e) 70℃で20分インキュベートし、急氷冷する。

b PCR反応のステップ

(f) 20分のインキュベートの間に以下の試薬をサンプル数+3本分調製する。

(1本量)

<u>10 μ M WNNY 514new</u>	<u>0.75 μ l</u>
<u>Tth DNA Chelate 10 × Buffer</u>	<u>4.0 μ l</u>
<u>MgCl₂</u>	<u>4.0 μ l</u>
<u>DW水</u>	<u>31.25 μ l</u>
<u>合計</u>	<u>40 μ l</u>

(g) 急冷後、各チューブに40μlずつ加える。

(h) PCR装置にセットして反応を行う。

pre-reaction:

94℃ 2分

70℃ 20分

94℃ 2分

↓

denature: 94℃

30秒

annealing: 53℃

1分

extension: 72℃

1分

40サイクル

↓
post-extension: 72°C 7分

(i) 各反応液10 μ lを2%アガロースゲルで電気泳動する。エチジウムブロマイドで染色して、UVで検出する。

* 陽性コントロールの入っていたチューブは、オートクレーブ後廃棄すること。

第2 検査材料の取扱いについて (略)

(別紙3)

野鳥及び馬の検査材料の送付について

(削る。)

異常馬及びその同居馬から採材した血液及び血清にあっては4℃、死亡野鳥から採材した脳（乳剤を含む）並びに死亡した馬又は

* 陽性コントロールの入っていたチューブは、オートクレーブ後廃棄すること。

第3 検査材料の取扱いについて (略)

(別紙3)

検査材料の送付について

1 蚊

家保におけるウイルス遺伝子検出検査の結果、捕獲した蚊から本ウイルスの存在を否定できない結果が得られた場合であって、陽性対象材料との交差汚染が否定された場合は、当該蚊を含んだ乳剤及び当該蚊由来のRNAの一部を、送付中における交差汚染の発生がないように密封した上で、さらにバイオセーフティ対応容器に密封し、ドライアイスによる凍結状態で動物衛生研究所に送付する。

2 野鳥及び馬

異常馬及びその同居馬から採材した血液及び血清にあっては4℃、死亡野鳥から採材した脳（乳剤を含む）並びに死亡した馬又は

予後不良馬から採材した中枢神経系組織（脳、脊髄及び脊髄液）及び各種臓器にあつては－８０℃（状態の良好な材料の場合は４℃）で一時保管するとともに、ドライアイス入りクーラーボックス（４℃保存材料については、アイスパック入りクーラーボックス）に入れて送付する（別紙４）。

また、馬の病理組織学的検査材料を送付する場合は、１０％中性緩衝ホルマリン液で固定し、常温で送付する。

（削る。）

（別記様式１）

は予後不良馬から採材した中枢神経系組織（脳、脊髄及び脊髄液）及び各種臓器にあつては－８０℃（状態の良好な材料の場合は４℃）で一時保管するとともに、ドライアイス入りクーラーボックス（４℃保存材料については、アイスパック入りクーラーボックス）に入れて送付する（別紙４）。

また、馬の病理組織学的検査材料を送付する場合は、１０％中性緩衝ホルマリン液で固定し、常温で送付する。

（別記様式１）

蚊及び野鳥のサーベイランスの検査実績

都道府県名：

平成 年 月分

1 蚊： 匹

（種類の内訳）

（例）

コダカアカイエカ：〇〇匹

シナハマダラカ：〇〇匹

ヒトスジシマカ：〇〇匹

2 野鳥： 羽

（種類の内訳）

（例）

スズメ目：〇〇羽

ハト目：〇〇羽

カモ目：〇〇羽

（別記様式２）

野鳥の検査材料の詳細 都道府県： 家畜保健衛生所： 平成 年 月 日 (削る。) 野鳥 (略) (略) (別記様式 2)	蚊又は野鳥の検査材料の詳細 都道府県： 家畜保健衛生所： 平成 年 月 日 蚊 1 捕獲日 平成 年 月 日 2 捕獲場所 3 検査材料の詳細（匹数、種類等） 4 検査日 5 備考 野鳥 (略) (略) (別記様式 3)
---	--

ウエストナイルウイルス感染症防疫マニュアル

平成15年1月21日付け14生畜第5419号農林水産省生産局畜産部長通知

平成18年12月26日付け18消安第10592号農林水産省消費・安全局長通知

平成20年4月16日付け20消安第14887号農林水産省消費・安全局長通知

I 目的

このマニュアルは、国内におけるウエストナイルウイルス感染症（以下「本病」という。）に係るサーベイランス及び発生時における防疫措置を適切に実施することを目的とする。

なお、本通知は地方自治法（昭和22年法律第67号）第245条の4に定める技術的な助言である。

II 本病の特性

本病の特性は、別紙1のとおりである。

III 蚊及び野鳥のサーベイランス

ウエストナイルウイルス（以下「本ウイルス」という。）は蚊によって媒介され、米国における知見では、馬での発生に先立ち野鳥の死亡が散発する場合があることを踏まえ、蚊及び野鳥における本ウイルスの保有状況について、次のとおりサーベイランスを実施するものとする。

1 検体の採取

（1）蚊

家畜保健衛生所（以下「家保」という。）は、都道府県畜産主務課（以下「県畜産主務課」という。）が別紙2-1の1に定める方法に従い作成した調査計画に基づき、雌蚊について、調査対象地域内の1ヵ所から当該地域における発生時期に応じて、別紙2-1の2の（1）に定める方法に従い毎月1回定期的に10匹以上捕獲し、記録するものとする。

（2）野鳥

- ① 家保は、県畜産主務課が別紙2-1の1に定める方法に従い作成した調査計画に基づき、また、環境部局からの情報提供や検体の提供を活用し、調査対象地域における死亡野鳥を別紙2-1の2の（2）に定める方法に従い採取し、記録するものとする。

なお、採取羽数については、異常が疑われない場合にあっては毎月1羽程度定期的に採取するものとし、死亡野鳥の増加等異常が疑われる場合にあっては農林水産省消費・安全局動物衛生課（以下「動物衛生課」という。）及び独立行政法人農業・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。）に連絡して対応を協議するものとする。

- ② 県畜産主務課は、野鳥の死亡等の通報があった場合には、日時、種類等を記録しておくものとする。

2 検査

- （1）家保は、1の（1）の蚊及び（2）の野鳥について、採取日又はその翌日に別紙2-1の2の（3）に定める方法に従い検査を行うものとする。

- （2）県畜産主務課は、当月分のサーベイランスの検査実績を取りまとめ、別記様式1により翌月20日までに動物衛生課へ連絡するものとする。

3 連絡及び検査材料の送付

- (1) 家保における2の検査において、本ウイルスの存在を否定できない結果が得られた場合には、家保は直ちに県畜産主務課を経由して動物衛生課及び動物衛生研究所に別記様式2により連絡するとともに、別紙3及び別紙4に定める方法に従い当該検査材料（生材料、乳剤及びPCR産物）を動物衛生研究所に送付するものとする。

なお、この時点では、非特異反応等が検査結果に影響を与えている可能性も考慮し、関係機関は、Vの病性検査の結果が得られるまでの間、当該情報の取扱いに留意するものとする。

IV 異常馬発見時の措置等

1 異常馬の通報

県畜産主務課は、獣医師及び飼養者等（以下「飼養者等」という。）に対し、別紙5の症状を示した馬（以下「異常馬」という。）を発見したときは、直ちに家保に通報するよう周知するものとする。

2 臨床検査等

- (1) 家保は、飼養者等から1の通報があったときは、家畜防疫員による臨床検査を行うものとする。

- (2) 当該検査の結果、異常馬と確認された場合は、飼養者等に対し、吸血昆虫の駆除等を指導するとともに、当該異常馬及びその同居馬から、EDTA加血液及び抗体検査用血清を採材するものとする。

また、死亡した馬又は予後不良馬を剖検する場合は、中枢神経系組織（脳、脊髄及び脊髄液）及び各種臓器（以下「中枢神経系組織等」という。）を併せて採材するものとする。

- (3) 死亡した馬又は予後不良馬の剖検及び採材に当たっては、本ウイルスの外部への漏出を防止するため、非開放の解剖室内で行い、採材した中枢神経系組織等を「安全キャビネット」内で取り扱うことを原則とするとともに、施設及び器具の消毒や吸血昆虫の駆除等を行うものとする。

また、術者は、ゴム手袋、マスク等を用いて感染予防措置を講ずるものとする。

3 検査材料の送付

家保は、原則として日本中央競馬会競走馬総合研究所栃木支所（以下「JRA栃木支所」という。）と検体送付の必要性の有無を協議した上で、家畜防疫員が採材した血液、血清、中枢神経系組織等（以下「馬の検査材料」という。）を、病性検査等に供する材料として、別紙3に定める方法に従いJRA栃木支所に送付するものとする。

4 連絡

県畜産主務課は、家畜防疫員が馬の検査材料を採材した場合には、その内容を別記様式3により動物衛生課及びJRA栃木支所に連絡するものとする。

V 病性検査

- 1 動物衛生研究所及びJRA栃木支所は、Ⅲの3又はⅣの3により送付された蚊、死亡野鳥及び馬の検査材料について直ちに病性検査を実施するものとする。

なお、当分の間、病原学的検査にあつてはウイルス分離・同定、PCR法を用いた遺伝子診断（以下「PCR法」という。）等により、血清学的検査にあつては中和試験及びELISA法により行うものとし、必要に応じて病理組織学的検査を行うものとする。

2 病性鑑定施設においては、本ウイルスの外部への漏出を防止するため、蚊、死亡野鳥及び馬の検査材料を「安全キャビネット」内で取り扱うことを原則とするとともに、施設及び器具の消毒や吸血昆虫の駆除等を行うものとする。また、検査実施者は、ゴム手袋、マスク等を用いて感染予防措置を講ずるものとする。

3 報告及び連絡

動物衛生研究所及びＪＲＡ栃木支所は、Ⅲの３又はⅣの３により送付された蚊、死亡野鳥及び馬の病性検査の結果を県畜産主務課に連絡するとともに、動物衛生課に報告するものとする。

Ⅵ 本病発生時の措置等

1 患畜等の定義

(1) 患畜

別紙５の症状を示し、かつ、Ⅴの病性検査の結果が次のaからfまでのいずれかに該当する馬を患畜とする。なお、抗体検出については、日本脳炎ウイルス等、他のフラビウイルスの感染及びワクチン接種との鑑別に留意するものとする。

- a ウイルス分離
- b 4倍以上の中和抗体(PRNT)の変化(7日間以上の間隔をおくこと。)
- c IgM抗体(IgM-capture ELISA)検出、かつ、1:10以上の中和抗体(PRNT)
- d IgM抗体(IgM-capture ELISA)検出、かつ、PCR法陽性
- e IgM抗体(IgM-capture ELISA)検出、かつ、免疫組織化学的検査(IHC)陽性
- f PCR法陽性、かつ、免疫組織化学的検査(IHC)陽性

(2) 疑似患畜

別紙５の症状を示し、かつ、Ⅴの病性検査の結果が次のaからcまでのいずれかに該当する馬を疑似患畜とする。なお、抗体検出については、日本脳炎ウイルス等、他のフラビウイルスの感染及びワクチン接種との鑑別に留意するものとする。

- a IgM抗体(IgM-capture ELISA)検出、かつ、1:10未満の中和抗体(PRNT)(ただし、14日以上経過した後に中和抗体が陰性であった場合には、疑似患畜とはしない。)
- b PCR法陽性
- c 免疫組織化学的検査(IHC)陽性

注) 可能であればさらに検査を進め、患畜か否かを判断するものとする。

(3) 本ウイルス感染確認地域及び本ウイルス抗体等確認地域

- ① 馬において患畜が確認された場合、蚊若しくは野鳥において本ウイルスが分離・同定若しくはPCR法により陽性とされた場合又は都道府県公衆衛生部局で本ウイルスが確認された場合は、当該患畜等が存在する場所を中心として半径20km以内を「本ウイルス感染確認地域」とする。
- ② 馬において疑似患畜が確認された場合は、その確認された場所を中心として半径20km以内を「本ウイルス抗体等確認地域」とする。

2 本病発生時の連絡体制

- (1) 動物衛生研究所及びＪＲＡ栃木支所は、蚊若しくは野鳥の病性検査において本ウイルスが確認された場合又は異常馬若しくは同居馬の病性検査において患畜若しくは疑似患畜を疑う結果が得られた場合には、その旨を直ちに検査を依頼した県畜産主務課及び動物衛生課に連絡するものとする。

- (2) (1) の連絡を受けた県畜産主務課は、家保、公衆衛生等の関係部局、隣接県畜産主務課及び当該馬等が所在する市町村に、動物衛生課は、厚生労働省に連絡するものとする。

3 患畜及び疑似患畜確認時の措置等

(1) 患畜、疑似患畜等の措置

① 患畜及び疑似患畜

家畜防疫員は、患畜又は疑似患畜の飼養者に、当該馬をみだりに農場外へ移動させないように指示するとともに、移動の制限を開始してから14日間当該馬の経過観察を行い、PCR法により本ウイルスが血液中に存在しないことを確認した場合には、移動の制限を解除するものとする。

なお、PCR法により陽性とされた場合は、さらに検査を継続するものとする。

② 同居馬

家畜防疫員は、必要があると認めるときは、患畜又は疑似患畜が別紙5の症状を示した日から遡って14日以内に当該馬と同居していた馬について、必要に応じて獣医師と連携し、当該同居馬の経過観察を行うとともに、必要に応じてEDTA加血液を採材し、本ウイルスの有無等を確認するものとする。

また、家畜防疫員は、上記の観察及び採材を行う上で必要があるときは、患畜又は疑似患畜の同居馬の飼養者に対し、患畜又は疑似患畜が別紙5の症状を示した日から14日間は、その飼養場所から移動させないように指示することができる。

(2) 患畜が飼育されていた施設の措置等

家畜防疫員は、飼養者に対し、患畜が別紙5の症状を示した日から遡って14日間以内に当該患畜が飼育されていた施設の消毒及び吸血昆虫の駆除を命ずるとともに、その周辺環境における野鳥の忌避対策等を指導するものとする。

(3) 汚染物品の措置

患畜の血液等本ウイルスを含むおそれのあるものを汚染物品とし、飼養者は、当該汚染物品の消毒等を行うものとする。

(4) ワクチン接種

動物衛生課は、我が国において本ウイルスの存在が確認された場合には、その浸潤状況及び専門家の助言等を踏まえてワクチンの使用の可否について検討し、家畜防疫員がワクチンを使用する際にはその結果に従うこととする。

馬の飼養者等がワクチンを使用する場合には、家畜防疫員の指導の下、ワクチンを接種した当該馬のワクチン接種歴について確実に記録し、保存することとする。

4 本ウイルス感染確認地域及び本ウイルス抗体等確認地域における措置

(1) 本ウイルス感染確認地域

① 県畜産主務課は、本ウイルス感染確認地域内の馬飼育施設、動物診療施設等の所有者に対し、本病が発生したことを速やかに周知するとともに、関係施設における吸血昆虫の駆除等を指導するものとする。

② 家保は、当該地域において、患畜等が確認された日から14日間は、飼養者等の協力を得て異常馬の有無を観察するとともに、当該地域の周辺地域において、蚊及び野鳥のサーベイランスを実施するものとする。

(2) 本ウイルス抗体等確認地域

① 県畜産主務課は、本ウイルス抗体等確認地域内の馬飼育施設、動物診療施設等の所有者に対し、本ウイルスの抗体が確認されたことを速やかに周知するとともに

に、関係施設における吸血昆虫の駆除等を指導するものとする。

- ② 家保は、当該地域において、週 1 回（抗体確認以降 14 日以上の間）、採材回数や場所を増加して、蚊及び野鳥のサーベイランスを実施するものとする。

VII 連携及び協力

本病は、人畜共通感染症であることから、農林水産省は厚生労働省等と、県畜産主務課は公衆衛生等の関係部局と密接な連携の下で、防疫措置を実施するものとする。特に、都道府県公衆衛生部局が行う蚊の駆除等は、家畜防疫の観点からも有益であることから、県畜産主務課はその実施について積極的に協力するものとする。

また、県畜産主務課は、本病を疑う動物を確認した場合には、公衆衛生等の関係部局とともに市町村、団体等との間の連絡連携を強化し、当該確認地域における対応措置を進めるものとする。

ウエストナイルウイルス感染症の特性について

本病は、家畜伝染病予防法（昭和 26 年法律第 166 号）第 2 条第 1 項に定める流行性脳炎であり、その特性は次のとおりである。

1 病原体

- (1) ウエストナイルウイルス（Flavivirus科West Nile virus）であり、日本脳炎ウイルスと極めて類縁なウイルスである（日本脳炎ウイルス血清型群）。
- (2) 本ウイルスは、国立感染症研究所が定めた病原体等安全管理規定により、微生物取扱いに関する危険度分類のレベル 3 に該当し、P3 施設で取り扱うこととされている。

2 感染経路等

- (1) 蚊（イエカ、ヤブカ等）が媒介し、鳥、馬、人等が感染する。
- (2) 米国においては、カラス等の野鳥に高い感受性が確認されており、これらの野鳥が感染源となり、蚊を介して本病が拡大しているものと考えられている。
- (3) 馬及び人は終末宿主であり、一般的に他の哺乳類、鳥類又は蚊を感染させる量の本ウイルスを血液中に産生することはないと考えられる。

3 潜伏期間、感染性等

- (1) 馬の潜伏期間は、通常 5 ～ 10 日である。
- (2) 感染後の免疫抗体（中和抗体）は、2 年以上持続する。

4 病性

本ウイルスに感染した人又は馬の多くは不顕性感染に終わるが、脳炎を発症すると致死率は高い。

5 予防及び治療法

発症した場合は、治療法はなく、一般的には対症療法を行う。

蚊及び野鳥のサーベイランスについて

1 調査計画の作成

県畜産主務課は、家保が実施するサーベイランスに先立ち、次の(1)及び(2)を内容とする調査計画を作成するものとする。

(1) 調査対象地域

環境部局、衛生部局等と連携し、馬の飼養状況、野鳥の種類及び生息状況、蚊の種類、発生源、季節的な消長等の情報を把握した上で、調査対象地域を設定する。

(2) 調査対象期間

調査対象地域における蚊及びその幼虫の生息状況並びに発生時期を確認した上で、調査対象期間を設定する。

2 サーベイランスの実施

(1) 雌蚊の捕獲及び記録

① 雌蚊（少なくとも10匹以上）を、捕虫網、ライトトラップ、ドライアイス・トラップ等を用いて捕獲する（吸血する雌蚊を効率的に採取するため、ドライアイス・トラップを用いることが好ましい。）。

② 捕獲した際には、捕獲日、主な種類、捕獲数及び捕獲場所のほか、天候、気温、付近で確認された野鳥の種類等を記録する。なお、記録に基づき必要に応じて調査計画を見直すこと。

(2) 死亡野鳥の採取及び記録

① 状態の良好な死亡野鳥（明白な変質又は腐敗がないもの）を採取する。

② 採取した際には、採取日、採取羽数、種類、採取場所、採取時の状態等を記録する。なお、記録に基づき必要に応じて調査計画を見直すこと。

(3) サーベイランス時の蚊及び野鳥の脳の処理

別紙2-2の実施例に従い、又はこれに準じて処理を行うこと。

サーベイランス時の蚊および野鳥のPCR検査の手順等について

ウエストナイルウイルスのサーベイランスについては、次のとおりとする。なお、検査の実施に際しては、この検査手順等を踏まえた上で、各都道府県家畜保健衛生所で現在使用している機器等に適した方法により実施されたい。

第 1 蚊の検査方法

1 作業手順

蚊の検査方法に係る作業手順については、次のとおりとする。

- (1) 採集：野外で蚊を採集する。
- (2) 殺虫：-20℃以下の低温で殺虫する。
- (3) 分類：雌蚊を分離し、分類する。
- (4) 乳剤作製：捕獲場所・捕獲日・種毎にプールし、乳剤を作製する。
- (5) RNA抽出：乳剤からRNAを抽出する。残った乳剤は-80℃以下で保存する。
- (6) RT-PCR：RT-PCRを行う。なお、残ったRNAは-80℃以下で保存する。
- (7) 結果報告：結果を判定し、所定様式で報告する。処理に使った方法（装置、キット名、試薬名、抽出したRNAの濃度など）を別記様式2に記入する。

2 作業手順の詳細

1で掲げた作業手順のうち、1の(4)から(6)までについての詳細な作業手順は次のとおりとする。

(1) 乳剤作製について(1の(4))

- * ウイルスの失活を防ぐために、検体を氷等で冷やしながら作業を行うとともに、作業室は高温にならないよう努めること。

ア 大検体破碎装置を利用する方法

- (ア) プール毎に蚊を1.5mlチューブに、1本あたり最大50匹を超えないように入れ計量後、液体窒素（無い場合は-80℃）で凍結する。
- (イ) 破碎用のビーズ(3~5mmφ、RNase free処理したもの)を適量加える。
- (ウ) 直ちに装置にセットし、破碎する。
- (エ) 氷冷したMEM培地（5%FCS(0.2%BSAで代用可)、抗生物質添加）を約10%の乳剤になるように加え、ミキサーなどで懸濁させる。直ちに次に進まない場合は、-80℃で保存する。
- (オ) 9,000 × g (10,000 rpm程度)、4℃で30分間遠心する。
- (カ) 上清をRNA抽出に必要な量だけ新しいRNase freeのチューブに移し、残りを再懸濁してRNA抽出終了まで4℃で保存する。

イ ハンディー型破碎装置を利用する方法

- (ア) プール毎に蚊を1.5mlチューブに1本あたり最大50匹を超えないように入れ計量後、クラッシャー（RNase free処理したもの）を入れる。
- (イ) チューブを内筒にセットし、液体窒素（無い場合は-80℃）で凍結する。
- (ウ) 直ちに外筒にセットし、1分間（-80℃で処理した場合は3分間）手で激しく振盪する。
- (エ) チューブを取り出し、蚊が十分破碎されたことを確認する。
- (オ) 氷冷したMEM培地（5%FCS(0.2%BSAで代用可)、抗生物質添加）を10%乳剤にな

るように加え、ミキサーなどで懸濁させる。直ちに次に進まない場合は、 -80°C で保存する。

(カ) 軽く遠心分離してからピンセット (RNase free処理したもの) でクラッシャーを取り出し、 $9,000 \times g$ ($10,000 \text{ rpm}$ 程度)、 4°C で30分間遠心分離する。

(キ) 上清をRNA抽出に必要な量だけ新しいRNase freeのチューブに移し、残りを再懸濁してRNA抽出終了まで 4°C で保存する。

ウ 乳鉢又はガラスホモジナイザーを用いる方法

(ア) 乳鉢又はガラスホモジナイザーは、器とホモジナイザーとを別にアルミホイルで包み、 180°C で5時間処理して、RNase freeにする。あるいは、器、ホモジナイザー及びアルミホイルを市販のRNase除去剤で処理した後、包んでも良い。

(イ) 乳鉢又はガラスホモジナイザーはあらかじめ氷冷しておく。

(ウ) プール毎に蚊を 1.5ml チューブに、1本あたり最大50匹を超えないように入れ計量後、乳鉢又はガラスホモジナイザーに入れる。

(エ) 氷冷したMEM培地 (5%FCS (0.2%BSAで代用可)、抗生物質添加) を少しずつ加えながら氷上で、破碎する。最終的に10%乳剤を作製する。直ちに次に進まない場合は、 -80°C で保存する。

(オ) 乳剤を全てチューブにとり、 $9,000 \times g$ ($10,000 \text{ rpm}$ 程度)、 4°C で30分間遠心分離する。

(カ) 上清をRNA抽出に必要な量だけ新しいRNase freeのチューブに移し、残りを再懸濁してRNA抽出まで 4°C で保存する。

(2) RNA抽出について (1の(5))

通常の市販のキットを使用してRNAを抽出する。RNA抽出の正否は分光光度計などでRNA濃度を測定して確認する。RNA抽出後、残りの懸濁液は2本以上のチューブに分注して -80°C で保存する。

ア RNA濃度の測定

(ア) RNAをRNase free水で希釈する。 $50\sim 100\mu\text{l}$ の液量で測定するタイプの場合は、 $50\sim 200$ 倍程度。数 μl で測定可能な機械がある場合は希釈の必要はない。

(イ) RNase free水 (希釈していない場合はRNA抽出に使ったバッファー) をブランクにして 260nm に対する吸光度を測定する。

(ウ) RNAの濃度は吸光度 $\times 40 \times$ 希釈倍率 $\mu\text{g/ml}$ と算出する。

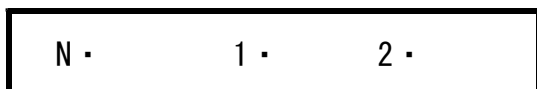
* キットによって抽出されるRNA濃度は変わるので、キットに付属の説明書等を参考にするか、販売元に問い合わせること。

イ RNA濃度の測定 (代替法)

分光光度計が利用出来ない場合などは、以下の方法で「何らかの原因でRNAが全く取れていないこと」を否定の上、次のステップに進むこととする。

(ア) 手袋をして、核酸実験用のナイロンメンブレンを適当な大きさ (2サンプルの場合 $3\text{cm} \times 8 \text{ cm}$ 程度に切り取る。

(イ) 鉛筆で下図のように印を付ける。



(ナイロンメンブレンにN(水) サンプル番号を書き込み、横に点をうつ。)

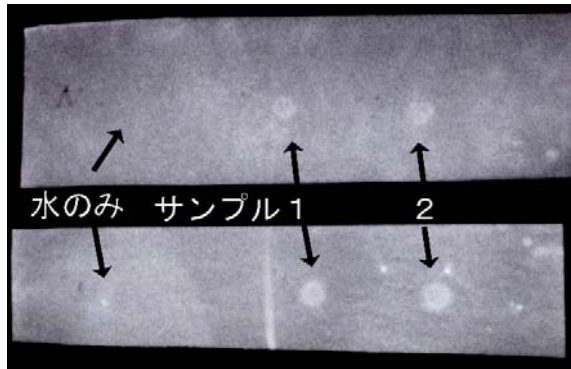
(ウ) 点をうった位置にRNase free水とサンプルを各 $3\sim 5\mu\text{l}$ ずつ滴下する。

(エ) RNA染色色素 (Invitrogen社のSYBR Green II など: 1×に調製する。) などにメンブレンをいれ、15分程度染色する。

(オ) UVトランスイルミネーターで検出する。サンプルがSYBR Green II で検出できる程度のRNAを含んでいれば、RNAは抽出されていると考えられる。

* エチジウムブロマイド(0.44mg/ml程度 of 原液を10,000倍希釈したもの) でも染色可能だが、波長の問題等で肉眼での判定は困難なので、撮影した写真で判断すること。

* UVトランスイルミネーターで撮影する場合、通常エチジウムブロマイドで染色したゲルを撮影する際と同じフィルターで撮影が可能である。



(図1: ナイロンメンブレンによるRNA抽出確認例)

水のみでは光らないが、RNAサンプルは光る。

上のナイロンメンブレンはエチジウムブロマイド染色。下のナイロンメンブレンはSYBR Green II 染色。

ウ RT-PCRについて (1の(6))

RT-PCRは国立感染症研究所の方法に準拠した以下の方法により、WNV E遺伝子の部分領域を増幅するPCRを実施する。

プライマー (市販品):

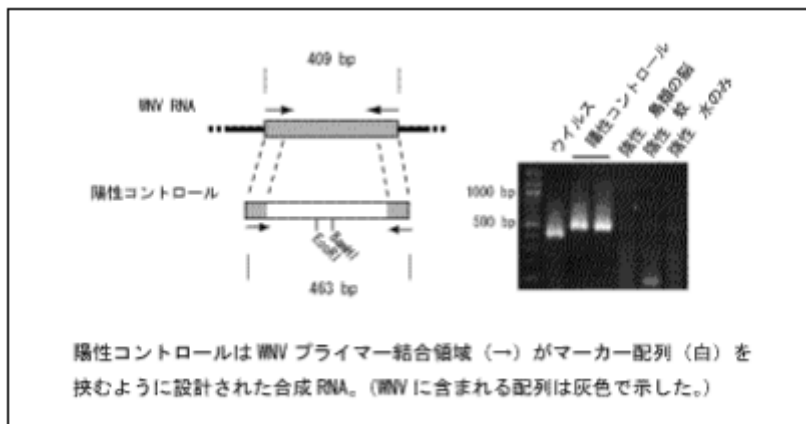
WNNY514new: 5' - Cgg CgC CTT CAT ACA CW -3'

WNNY904: 5' - gCC TTT gAA CAg ACg CCA TA -3'

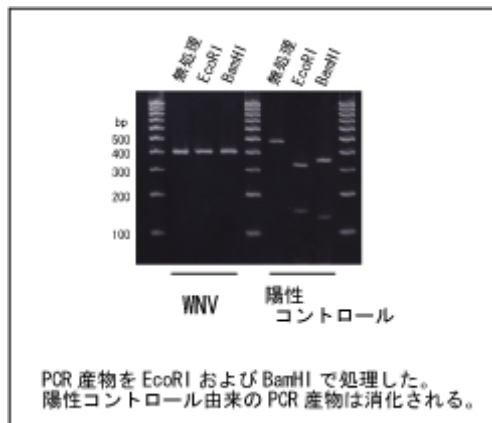
プライマーはRNase free水で、 $100\mu\text{M}$ ($=100\mu\text{mol/l}=100\text{pmol}/\mu\text{l}$; 業者によって表記が異なる。)あるいは $50\mu\text{M}$ master stock solutionとして調製し、希釈して $10\mu\text{M}$ および $2\mu\text{M}$ working stock solutionを調製する。working stock solutionは10回分程度に分注する。master stock solution、working stock solution とともに -20°C 以下で保存する。

陽性コントロール (動物衛生研究所より配布)

陽性コントロールは、プライマー結合領域を含む合成RNAがエタノール中に調製され1回使い切りになっている。プライマー結合部位以外はWNV配列を含まず、WNVよりも大きなサイズのDNA断片が増幅される(WNV: 409bp、陽性コントロール463bp)。交差汚染を防ぐために、陽性コントロールは、サンプルの調整後に使用する。また、本来のWNVにはない制限酵素EcoRI、BamHI切断部位が内在しており、これを利用して交差汚染を検出できる。



(図 2 : RT-PCRの結果 (例) と陽性コントロールの構造)



(図 3 : 陽性コントロール制限酵素処理後の泳動パターン)

エ

(ア) RTとPCRを別に行う場合

a RT反応 : M-MLV reverse transcriptaseとRibonuclease Inhibitorを使用し、氷上で調製する。

(a) RNase freeのPCR用チューブをサンプル数+2本用意し、以下の試薬を加える。

2 μ M WNNY904プライマー	1 μ l
10 mM dNTP	1 μ l

(b) 各チューブに材料由来のRNA溶液を10 μ lずつ加える。チューブの蓋をする。

(c) RNase free水10 μ lを陰性コントロールのチューブに加える。チューブの蓋をする。

(d) 陽性コントロールの入ったチューブを-20℃から取り出し、13,000 $\times$ g (12,000rpm程度)、4℃で5分間遠心し、上清を除去・風乾 (15分~30分程度) する。

RNase free水10 μ lを加えてコントロールを溶かし、陽性コントロールのチューブに全量入れる。チューブの蓋をする。

(e) 65℃で5分間インキュベートし、急速氷冷する。

(f) 軽く遠心してスピンドウン後、各チューブに以下の試薬を加える。

5× First-Strand Buffer	4 μ l
0.1M DTT	2 μ l
Ribonuclease Inhibitor	1 μ l

蓋を閉めタッピングで軽く混和後、37°Cで2分間インキュベートする。

- (g) M-MLV reverse transcriptaseを1 μ lずつ加える。
- (h) 37°Cで50分間インキュベートして、RT反応を起こさせる。
- (i) そのまま70°Cで15分間インキュベートして、酵素を失活させる。
- (j) チューブを氷上に移す。

b PCR反応 : Ex Taqを使用し、PCR反応を行い、電気泳動を行う。

- (a) PCR溶液をサンプル数+4本分調製し、サンプル数+3本のPCRチューブに24 μ lずつ分注する。

(1本量)

10 × Buffer	2.5 μ l
2.5mM dNTPs	2 μ l
10 μ M WNNY514new	2 μ l
10 μ M WNNY904	2 μ l
Ex Taq	0.125 μ l
DW	15.375 μ l

合計	24 μ l
----	------------

- (b) DW1 μ lをチューブに加え、非逆転写陰性コントロールとして用いる。
- (c) サンプル由来RT産物を1 μ lずつチューブに加える。チューブの蓋をする。
- (d) 陰性コントロールRT産物を1 μ lチューブに加える。チューブの蓋をする。
- (e) 陽性コントロールRT産物を1 μ lチューブに加える。チューブの蓋をする。
- (f) PCR装置にセットして反応させる。

pre-denature: 94°C 2分

↓

denature: 94°C	30秒	40サイクル
annealing: 53°C	1分	
extension: 72°C	1分	

↓

post-extension: 72°C 7分

- (g) 各反応液10 μ lを2%アガロースゲルで電気泳動する。エチジウムブロマイドで染色して、UVで検出する。

(ア) 1チューブ法でRTとPCRを実施する場合

酵素：Tth DNA polymeraseを使用し、氷上で調製する。(Tth DNA polymeraseは Reverse transcription活性とDNA polymerase活性両方を持つ酵素である。)

a RT反応のステップ

(a) RT反応液をサンプル数+3本分調製し、サンプル数+2本のPCRチューブに9 μ l ずつ分注する。

(1本量)

10 $\times$ Reverse Transcription buffer	1 μ l
2.5mM dNTPs	0.8 μ l
MnCl ₂	1 μ l
10 μ M WNNY904	0.75 μ l
Tth polymerase	0.5 μ l
RNase free 水	0.95 μ l

合計	5 μ l
----	-----------

(b) サンプル由来RNAを5 μ l ずつチューブに加える。蓋を閉める。

(c) RNase free水を5 μ l チューブに加え陰性コントロールにする。蓋を閉める。

(d) 陽性コントロールの入ったチューブを-20°Cから取り出し、13,000 $\times$ g (12,000rpm程度)、4°Cで5分間遠心し、上清を除去・風乾(15分~30分程度)する。
RNase free水5 μ l を加えてコントロールを溶かし、陽性コントロールのチューブに全量入れる。チューブの蓋をする。

(e) 70°Cで20分インキュベートし、急氷冷する。

b PCR反応のステップ

(f) 20分のインキュベートの間に以下の試薬をサンプル数+3本分調製する。

(1本量)

10 μ M WNNY 514new	0.75 μ l
Tth DNA Chelate 10 $\times$ Buffer	4.0 μ l
MgCl ₂	4.0 μ l
DW水	31.25 μ l

合計	40 μ l
----	------------

(g) 急冷後、各チューブに40 μ l ずつ加える。

(h) PCR装置にセットして反応を行う。

pre-reaction:

94°C 2分

70°C 20分

94°C 2分

↓

{	denature: 94°C	30秒	}	40サイクル
	annealing: 53°C	1分		
	extension: 72°C	1分		

↓

post-extension: 72°C 7分

(i) 各反応液10 μ lを2%アガロースゲルで電気泳動する。エチジウムブロマイドで染色して、UVで検出する。

第2 死亡野鳥の検査方法

1 作業手順

死亡野鳥の検査方法に係る作業手順については、次のとおりとする。

- (1) 採集：死亡野鳥を採集する。
- (2) 脳の回収：頭部を解剖し、脳を回収する。直ちに乳剤作製を行わない場合は、-80°C以下で保存する。
- (3) 乳剤作製：各検体の乳剤を作製する。
- (4) RNA抽出：乳剤からRNAを抽出する。残った乳剤は-80°C以下で保存する。
- (5) RT-PCR：RT-PCRを行う。残ったRNAは-80°C以下で保存する。
- (6) 結果報告：結果を判定し、所定様式で報告する。処理に使った方法（装置、キット名、試薬名、抽出したRNAの濃度など）を別紙で添付する。

2 作業手順の詳細

(1) 乳剤作製について（1の（3））

- * ウイルスの失活を防ぐために、検体を氷等で冷やしながら作業を行うとともに、作業室は高温にならないよう努めること。

ア 大検体破碎装置を利用する方法

- (ア) 脳組織を100mg程度計り取り、チューブに入れる。
- (イ) 破碎用のビーズ(3~5mm ϕ 、RNase free処理したもの)を適量加える。
- (ウ) 液体窒素（無い場合は-80°C）で凍結したのち、直ちに装置にセットし、破碎する。
- (エ) 氷冷したMEM培地（5%FCS(0.2%BSAで代用可）、抗生物質添加）を10%乳剤になるように加え、ミキサーなどで懸濁させる。直ちに次に進まない場合は-80°Cで保存する。
- (オ) 9,000 $\times$ g(10,000 rpm程度)、4°Cで30分間遠心分離する。
- (カ) 上清をRNA抽出に必要な量だけ新しいRNase freeのチューブに移し、残りを再懸濁してRNA抽出が終了するまで4°Cで保存する。

イ ハンディー型破碎装置を利用する方法

- (ア) 脳組織を100mg程度計り取り、チューブに入れる。
- (イ) 破碎用のクラッシャー (RNase free処理したもの) を入れる。
- (ウ) チューブを内筒にセットし、液体窒素 (無い場合は-80℃) で凍結する。
- (エ) 直ちに外筒にセットし、1分間 (-80℃で処理した場合は3分間) 手で激しく振盪する。
- (オ) チューブを取り出し、脳組織が十分破碎されたことを確認する。
- (カ) 氷冷したMEM培地 (5%FCS (0.2%BSAで代用可)、抗生物質添加) を10%乳剤になるように加え、ボルテックスミキサーなどで懸濁させる。直ちに次に進まない場合は-80℃で保存。
- (キ) 軽く遠心してからピンセット (RNase free処理したもの) でクラッシャーを取り出し、9,000 × g (10,000 rpm程度)、4℃で30分間遠心する。
- (ク) 上清をRNA抽出に必要な量だけ新しいRNase freeのチューブに移し、残りを再懸濁してRNA抽出が終了するまで4℃で保存する。

ウ 乳鉢あるいはガラスホモジナイザーを用いる方法

- (ア) 乳鉢又はガラスホモジナイザーは、器部とホモジナイザーとを別にアルミホイルで包み、180℃で5時間処理して、RNase freeにする。あるいは器部、ホモジナイザー及びアルミホイルを市販のRNase除去剤を用いた後、包んでも良い。
- (イ) 乳鉢又はガラスホモジナイザーはあらかじめ氷冷しておく。
- (ウ) 脳組織を100mg程度計り取り、乳鉢又はガラスホモジナイザーに入れる。
- (エ) 氷冷したMEM培地 (5%FCS (0.2%BSAで代用可)、抗生物質添加) を少しずつ加えながら氷上で、破碎する。最終的に10%乳剤を作製する。直ちに次に進まない場合は-80℃で保存する。
- (オ) 乳剤を全てチューブにとり、9,000 × g (10,000 rpm程度)、4℃で30分間遠心分離する。
- (カ) 上清をRNA抽出に必要な量だけ新しいRNase freeのチューブに移し、残りを再懸濁してRNA抽出が終了するまで4℃で保存する。

(2) RNA抽出 (1の(4)) ~ RT-PCRの実施 (1の(5)) について 蚊の処理方法を参照すること。

* 陽性コントロールの入っていたチューブは、オートクレーブ後廃棄すること。

第3 検査材料の取扱いについて

ウエストナイルウイルスは感染症法における4種病原体に指定されており、取扱いを行う検査室については、

- 1 検査室の内部の壁、床その他病原体によって汚染されるおそれのある部分は、その表面が消毒の容易な構造であること
 - 2 検査室に通話装置又は警報装置を備えていること
 - 3 検査室の内部に安全キャビネットを備えていること
 - 4 検査室には排水設備を設けること
 - 5 検査室にはかぎその他閉鎖のための設備又は器具を設けること
 - 6 滅菌等設備は、当該病原体等を取り扱う施設の内部に設けること
- 等の基準が設けられている。

また、その使用については、

- 1 病原体の使用は、実験室及び検査室の内部に備えられた安全キャビネットにおいて行

うこと

- 2 防御具を着用して作業すること
 - 3 検査室から退出するときは、防御具の表面の病原体等による汚染の除去をすること
 - 4 汚染のおそれのある物品は、検査室から持ち出す場合には、すべて滅菌等をする
 - 5 こと
- 摂氏121度以上で15分以上若しくはこれと同等以上の効果を有する条件で高圧蒸気滅菌をする方法、有効塩素濃度0.01パーセント以上の次亜塩素酸ナトリウム水による1時間以上の浸漬をする方法又は、これらと同等以上の効果を有する方法で滅菌等をする

こと
等の基準が設けられていることから、これらを踏まえ、検査材料の取り扱いには十分に留意すること。

検査材料の送付について

1 蚊

家保におけるウイルス遺伝子検出検査の結果、捕獲した蚊から本ウイルスの存在を否定できない結果が得られた場合であって、陽性対象材料との交差汚染が否定された場合は、当該蚊を含んだ乳剤及び当該蚊由来のRNAの一部を、送付中における交差汚染の発生がないように密封した上で、さらにバイオセーフティー対応容器に密封し、ドライアイスによる凍結状態で動物衛生研究所に送付する。

2 野鳥及び馬

異常馬及びその同居馬から採材した血液及び血清にあつては4℃、死亡野鳥から採材した脳（乳剤を含む）並びに死亡した馬又は予後不良馬から採材した中枢神経系組織（脳、脊髄及び脊髄液）及び各種臓器にあつては-80℃（状態の良好な材料の場合は4℃）で一時保管するとともに、ドライアイス入りクーラーボックス（4℃保存材料については、アイスパック入りクーラーボックス）に入れて送付する（別紙4）。

また、馬の病理組織学的検査材料を送付する場合は、10%中性緩衝ホルマリン液で固定し、常温で送付する。

検査材料の送付に当たっての注意点について

内国郵便約款第9条第4項の規定に基づき、国連規格容器による適切な包装等を行い、送付すること。

なお、送付にあたっては、当該郵便物の送付方法を自所の配達を受け持つ郵便事業株式会社の事業所（以下「受持郵便局」という。）に照会し、次のとおり措置の上、受け持つ郵便事業株式会社の事業所に差し出すこと。

1 送付の途中で航空機による輸送が行われない検査材料在中の郵便物

次の様式の紙片に必要事項をすべて記入し、郵便物の表面の見やすいところに貼付すること。

品 名：馬（野鳥）の組織等 「危険物」※
差出人：
自治体名：
検査所名：
住 所：
電話番号：
資 格：家畜防疫員（獣医師）
氏 名：

※朱記すること。

2 送付の途中で航空機による輸送が行われる検査材料在中の郵便物

(1) 次の様式の紙片に必要事項をすべて記入し、郵便物の表面の見やすいところに貼付すること。

品 名：馬（野鳥）の組織等 「危険物」※ ¹
国連番号：
差出人：
自治体名：
検査所名：
住 所：
電話番号：
資 格：家畜防疫員（獣医師）
氏 名：
ドライアイス〇〇kg 在中※ ²

※¹朱記すること。

※²ドライアイスを入れて送付する場合は朱記すること。

(2) 検体を格納する容器は「国連規格容器」とすること。

(3) 1容器当たりの内容量は、液体の場合にあつては1,000ml未満、個体の場合にあつては50gを限度とすること。

(4) 郵便物の表面の見やすいところに輸送許容物件表示ラベル（分類番号：6.2）を貼付すること（注2）。

(5) 国連規格容器の外側にドライアイスを入れダンボール等で包んだ場合は、郵便物の表面の見やすいところに輸送許容物件表示ラベル（分類番号：9）を貼付すること（注3）。

(6) 上記（5）の場合は、郵便物の引受時に、検査材料が国連規格容器に格納されているかどうかを確認するため、郵便事業株式会社の職員が外側のダンボール等の開示を求める場合がありますので、これに応じること。

（注1） 航空機による輸送が行われる場合、航空法第86条、航空法施行規則第194条、関係告示等による規制を受ける。

（注2，3） ラベルの様式は参考のとおり（受持郵便事業所に必要分を請求願います。）。

馬における特徴的な症状について

米国においては、運動失調（つまずき、よろめき、歩様の不調）に加え、次の症状のうち2つ以上を示す場合に、本病にかかっている疑いがあるものとしている。また発熱が一般的に認められる。

旋回 (circling)、後肢の虚弱 (weakness)、起立不能、複数肢の麻痺、筋痙攣、固有受容感覚 (proprioceptive) 不全、失明、口唇の下垂 (droop) 又は麻痺、歯ざしり、急死

蚊及び野鳥のサーベイランスの検査実績

都道府県名：

平成 年 月分

- 1 蚊： 匹
(種類の内訳)
(例)
コダカアカイエカ：〇〇匹
シナハマダラカ：〇〇匹
ヒトスジシマカ：〇〇匹

- 2 野鳥： 羽
(種類の内訳)
(例)
スズメ目：〇〇羽
ハト目：〇〇羽
カモ目：〇〇羽

蚊又は野鳥の検査材料の詳細

都道府県：
家畜保健衛生所：
平成 年 月 日

蚊

- 1 捕獲日 平成 年 月 日
- 2 捕獲場所
- 3 検査材料の詳細（匹数、種類等）
- 4 検査日
- 5 備考

野鳥

- 1 採取日 平成 年 月 日
- 2 採取場所
- 3 採取時の状態
- 4 検査材料の詳細（羽数、種類等）
- 5 検査日
- 6 備考

異常馬及びその同居馬の臨床検査等実施状況

都道府県：
家畜保健衛生所：
平成 年 月 日

- 1 通報受理年月日 平成 年 月 日
- 2 通報者
氏名
住所
- 3 馬の飼養場所
所有者氏名
住所
- 4 通報事項
異常馬頭数 種類 月齢
性別 用途 同居馬頭数
- 5 採材日及び検査材料
- 6 臨床症状
- 7 症状の経過
- 8 備考

平成 20 年度～22 年度新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業
「我が国における家畜伝染性疾患のサーベイランスに関する研究」(抜粋)

11 ウエストナイルウイルス感染症（野鳥・蚊）

1 疾病の概要

(区分)・法定伝染病（馬・流行性脳炎）・人獣共通感染症 ・OIE リスト疾病

(症状) 人・馬：多くは不顕性感染。脳炎を発症すると死亡率は高い。

野鳥：感受性が高いものは死亡する。

(発生状況) 家畜衛生統計

- ・国内での発生はない。(流行性脳炎のうち、ウエストナイルウイルス感染症に限る)
- ・1999 年以降、米国全土とカナダ南部で発生しており、毎シーズン数千人が感染し、死者は数十人に上る（米国 2008 年：感染者 1,370 名、死者 37 名）。
- ・感受性のある野鳥、蚊は日本にも存在するため、航空機などを介した侵入が懸念されている。
- ・人、馬は終末宿主であり、これらからさらに感染が拡大することはないと考えられている。

2 サーベイランスの実施状況

(実施根拠) 体制：ウエストナイルウイルス感染症防疫マニュアル、財源：都道府県交付金事業

(目的) ウイルスの国内侵入の早期摘発

(実施方法) 地域：全国、蚊：生息シーズンの雌、各県毎月 10 匹以上、死亡野鳥：(蚊のシーズン)、
各県毎月 1 羽程度

(検査方法) ①PCR（2007 年まで動衛研、2008 年からは都道府県）、②ウイルス分離（動衛研）

(判定条件) ウイルス分離、PCR 検査

(検査実績)

- ・米国での流行に伴い開始された。2008 年からは PCR の実施を都道府県に移し、陽性の場合にのみ動衛研に材料を送付することとなった。
- ・数県では家畜衛生主任者会議資料などに、「ウエストナイル（馬）」の記述があるが、内容は野鳥と蚊の検査数を合わせた実績。

(OIE の基準)

- ・診断法として、死亡野鳥の組織からのウイルス分離、RT-PCR および免疫組織化学的検査による病原体検索が診断マニュアルに記載されている。
- ・清浄国の認定条件は、過去 2 年間本病の発生が確認されていないことである。サーベイランスの条件については、まだ定められていない。

3 報告と分析の状況

(検査についての報告内容) ウエストナイルウイルス感染症防疫マニュアルの様式

- ・毎月、マニュアルの規定の様式により、蚊の合計匹数、種類ごと匹数、野鳥の合計羽数、種類ごと羽数を報告。

平成 20 年度～22 年度新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業
「我が国における家畜伝染性疾病のサーベイランスに関する研究」（抜粋）

（発生についての報告）

- ・都道府県における検査において、本ウイルスの存在を否定できない結果が得られた場合は、マニュアルの別記様式 2 により、蚊および野鳥について、捕獲日、捕獲場所、検査材料の詳細（匹数、種類等）、検査日を国に報告する。
- ・なお、野鳥や蚊は、家畜伝染病予防法の対象には含まれていないので、野鳥や蚊で確認された場合は法に基づく報告は不要。

（分析・活用）

- ・月別検査個体数（合計・種類別）をとりまとめているが、特に公表していない。
- ・陽性事例に的確に対応することが重要であり、陰性データに特段の重要性はない。

4 総合評価

- ・これまで蚊、野鳥ともにウイルスが分離された事例はない。
- ・米国での発生が終息しない限り、ウイルス媒介動物のモニタリングという観点からは調査が必要である。
- ・野鳥については、高病原性鳥インフルエンザと併せて、サーベイランスの方法や病性鑑定の対応を整理した方がいいのではないかな。
- ・蚊については、国内全域を対象にするよりも、海外からの侵入リスクが高い空海港地域を対象に重点的に実施した方がいいのではないかな。また、厚生労働省との連携、役割分担を検討する必要がある。