

23 日 獣 発 第 42 号

平成 23 年 5 月 2 日

地方獣医師会会長 各位

社団法人 日本獣医師会

会 長 山 根 義 久

(公印及び契印の押印は省略)

「高病原性鳥インフルエンザ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」の一部改正について

このことについて、平成 23 年 4 月 25 日付け 23 消安第 757 号をもって、農林水産省消費・安全局長から別添写しのとおり通知があったので、貴会関係者に周知方お願いします。

このたびの通知の内容は、今般、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が、国内で発生が確認されているウイルス株をよりの確に検出できるリアルタイムPCR法（A型インフルエンザウイルス遺伝子の検出）の開発に成功したため、「高病原性鳥インフルエンザ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 11 月 18 日付け 16 消安第 6227 号農林水産省消費・安全局長通知）」を平成 23 年 4 月 25 日付けで改正し、①移動制限区域内からの卵の出荷を認めるための検査に当該手法を用いた検査を追加したこと、②これまで、強毒タイプが発生した場合、運用上、移動制限区域内にある農場からの卵の出荷制限を、ウイルス分離検査の結果を待って解除することとしていたが、今般の一連の強毒タイプの発生において、PCR検査及びリアルタイムPCR検査により、ウイルスが検出できることが確認されたことから、専門家の意見も踏まえ、今後は、強毒タイプの発生においても臨床検査と合わせ、PCR検査又はリ

アルタイムPCR検査を活用し、農林水産省消費・安全局動物衛生課と協議の上、同制限の解除を認めることとしたことについて、各都道府県知事あてに通知したので、本会あて了知の上、迅速かつ円滑な防疫措置の実施に協力が依頼されたものです。

本件内容の問合せ先

日本獣医師会事業担当 長野

TEL 03-3475-1601



23 消安 第757号
平成23年4月25日

社団法人 日本獣医師会会長 殿

農林水産省消費・安全局長



「高病原性鳥インフルエンザ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」の一部改正について

平素より、家畜衛生行政の推進に御協力賜りありがとうございます。

このことについて、別添のとおり都道府県知事あて通知しましたので、御了知の上、迅速かつ円滑な防疫措置の実施に御協力いただくようお願いします。



写

23 消安 第757号
平成23年4月25日

各都道府県知事 殿

農林水産省消費・安全局長

「高病原性鳥インフルエンザ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」の一部改正について

今般、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が、国内で発生が確認されているウイルス株をよりの確に検出できるリアルタイムPCR法（A型インフルエンザウイルス遺伝子の検出）の開発に成功しました。このため、「高病原性鳥インフルエンザ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11月18日付け16消安第6227号農林水産省消費・安全局長通知）」を本日付けで別添のとおり改正し、移動制限区域内からの卵の出荷を認めるための検査に当該手法を用いた検査を追加しました。

なお、これまで強毒タイプが発生した場合、運用上、移動制限区域内にある農場からの卵の出荷制限を、ウイルス分離検査の結果を待って解除することとしていました。今般の一連の強毒タイプの発生において、PCR検査及びリアルタイムPCR検査により、ウイルスが検出できることが確認されたことから、専門家の意見も踏まえ、今後は、強毒タイプの発生においても臨床検査と合わせ、PCR検査又はリアルタイムPCR検査を活用し、農林水産省消費・安全局動物衛生課と協議の上、同制限の解除を認めることとします。

つきましては、これらについて御了知いただき、本病の防疫措置の迅速かつ的確な実施に御協力いただくようお願いいたします。

○高病原性鳥インフルエンザ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11月18日付け16消安第6227号）の一部変更案新旧対照表

| 改正案 | 現行 |
|--|--|
| <p>1～7 (略)</p> <p>8 農場への指導 <u>移動制限区域内の農場に対して、毎日の健康観察を徹底するよう指導するとともに、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条の規定に基づき、当日の死亡羽数については毎日、次の（1）から（4）までに掲げるいずれかの異常を確認した場合については直ちに、報告を行うよう求める。</u> <u>（1）飼養鶏の1日の死亡羽数が、直近3週間の平均死亡羽数と比較して2倍以上となった鶏舎がある場合（圧死、食害等本病による死亡でないことが明らかなる場合を除く。）</u> <u>（2）5羽以上の飼養鶏が、まとまって死亡している、又はまとまって衰弱していることを確認した場合（圧死、食害等本病による死亡でないことが明らかなる場合を除く。）</u> <u>（3）飼養鶏に鶏冠、肉垂等のチアノーゼ、卵墜又は沈うつを確認した場合</u> <u>（4）その他本病への感染が疑われるような異常を確認した場合</u></p> | <p>1～7 (略) (新設)</p> <p>8 移動制限の例外 (1) (略) (2) 移動の際の検査 ア 家さんの卵の移動の際の検査</p> |
| <p>9 移動制限の例外 (1) (略) (2) 移動の際の検査 ア 家さんの卵の移動の際の検査</p> | <p>8 移動制限の例外 (1) (略) (2) 移動の際の検査 ア 家さんの卵の移動の際の検査</p> |

(ア)・(イ) (略)

(ウ) 検査方法

a (略)

b ウイルス遺伝子検出検査

死亡家さんを含む(イ)の検体及びその他家畜防疫員が必要と認める検体の気管スワブ及びクロアスワブについて、別紙4の検査、別紙5の検査若しくは別紙6の検査又は動物用医薬品として承認された診断薬による検査を行う。当該検査の結果、陽性であった検体については、1の(1)の検査を行う。

c (略)

(エ) (削る。)

イ・ウ (略)

エ 異常発見時の措置

移動制限の例外の適用を受け、家さんの卵、家さん又はひなの移動を行う農場の家さんに8の(1)から(4)までに掲げるいずれかの異常が認められた場合は、直ちに、家さんの卵、家さん及びひなの移動を制限する。

当該制限は、本病による異常でないことが明らかとなるとき、継続する。

1.0 清浄性確認のための検査

(1)・(2) (略)

(3) 検査方法

ア (略)

イ 検体数

(ア)・(イ) (略)

(ウ) 検査方法

a (略)

b ウイルス遺伝子検出検査

死亡家さんを含む(イ)の検体及びその他家畜防疫員が必要と認める検体の気管スワブ及びクロアスワブについて、別紙4の検査若しくは別紙5の検査又は動物用医薬品として承認された診断薬による検査を行う。当該検査の結果、陽性であった検体については、1の(1)の検査を行う。

c (略)

(エ) その他

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条の規定に基づき、異常の有無、死亡率等については毎週、本病を疑う症例を発見した場合には直ちに、報告を求めらる。

イ・ウ (略)

(新設)

9 清浄性確認のための検査

(1)・(2) (略)

(3) 検査方法

ア (略)

イ 検体数

(ア) 家きん飼養農場
9の(2)のイに定めるところにより、採材する。
 (イ) (略)
 ウ 検査方法
 検査対象となつたすべての農場等について次の(ア)及び(イ)の検査を実施する。
 (ア) 臨床検査
9の(2)のウの(ア)に定めるところにより、検査する。
 (イ) (略)
 エ (略)
11～15 (略)

(別表2)
 GPセンター等の再開に当たつての確認事項

| 確認事項 | 備考 |
|--|------------------------------------|
| 1 車両(原卵運搬、製品運搬等)に使用する車両を含む。以下同じ。)及び作業従事者(関係者を含む。以下同じ。)は、入場前及び出場後、移動制限区域内の家きん飼養場所を含む関連施設には立ち入らないこと。また、家きん卵の収集は農場毎に行い、他の農場には立ち寄りしないこと。 | <input type="checkbox"/> 運搬ルート等の確認 |
| 2・3 (略) | |
| 4 集卵トレー、ラック等は農場専用のものを利用すること。 | <input type="checkbox"/> 現場確認 |

(ア) 家きん飼養農場
8の(2)のイに定めるところにより、採材する。
 (イ) (略)
 ウ 検査方法
 検査対象となつたすべての農場等について次の(ア)及び(イ)の検査を実施する。
 (ア) 臨床検査
8の(2)のウの(ア)に定めるところにより、検査する。
 (イ) (略)
 エ (略)
10～14 (略)

(別表2)
 GPセンター等の再開に当たつての確認事項

| 確認事項 | 備考 |
|--|------------------------------------|
| 1 車両(原卵運搬、製品運搬等)に使用する車両を含む。以下同じ。)及び作業従事者(関係者を含む。以下同じ。)は、入場前及び出場後、移動制限区域内の家きん飼養場所を含む関連施設には立ち入らないこと。 | <input type="checkbox"/> 運搬ルート等の確認 |
| 2・3 (略) | |
| (新設) | |

※「備考」は、確認事項の実施・遵守状況を確認する方法。

(別紙5)
家きん卵出荷監視検査におけるウイルス遺伝子検出検査（リアルタイムRT-PCR検査・輸入）

Matrix遺伝子の保存領域を標的にしたプライマーでA型インフルエンザウイルスを検出するとともに、必要に応じて、HA遺伝子HA2領域を標的にしたプライマーでH5亜型、H7亜型の同定を行う。

- 1 RNA抽出
キアゲン社のRNeasy MiniKit又はこれと同等の能力を有するRNA抽出キットを用い、それぞれ添付マニュアルに従う。
- 2 リアルタイムRT-PCR検査
x-0v0社のThe FLOCKSCREEN AI-4 PCR Kitを用い、以下の方法で検査を行う。なお、A型インフルエンザウイルスの検出を先に行い、陽性であった検体について、必要に応じて、H5亜型及びH7亜型のA型インフルエンザウイルスの検出を行う。

(1)～(4) (略)

3 注意事項

(1)～(6) (略)

(7) 再検査の結果、陽性又は陰性と判定できなかったものは、ウイルス分離検査を行う。

※「備考」は、確認事項の実施・遵守状況を確認する方法。

(別紙5)
家きん卵出荷監視検査におけるウイルス遺伝子検出検査（リアルタイムRT-PCR検査）

Matrix遺伝子の保存領域を標的にしたプライマーでA型インフルエンザウイルスを検出するとともに、必要に応じて、HA遺伝子HA2領域を標的にしたプライマーでH5亜型、H7亜型の同定を行う。

- 1 RNA抽出
キアゲン社のRNeasy MiniKit若しくはこれと同等の能力を有するRNA抽出キットを用い、それぞれ添付マニュアルに従う。
- 2 リアルタイムRT-PCR検査
x-0v0社のThe FLOCKSCREEN AI-4 PCR Kit（以下「リアルタイムPCRキット」という。）を用い、以下の方法で検査を行う。なお、A型インフルエンザウイルスの検出を先に行い、陽性であった検体について、必要に応じて、H5亜型及びH7亜型のA型インフルエンザウイルスの検出を行う。

(1)～(4) (略)

3 注意事項

(1)～(6) (略)

(新設)

(新設)

(別紙6)

家きん卵出荷監視検査におけるウイルス遺伝子検出検査（リアルタイムRT-PCR検査・国産）

A型インフルエンザに広く保存されているNP (Nucleoprotein) 遺伝子領域を標的にしたプライマー及びプローブで、A型インフルエンザウイルスを検出する。

1. RNA抽出

キアゲン社のRNeasy MiniKitを用い、添付マニュアルに従ってサンプルからRNAを抽出する。

2. 相補鎖DNA (cDNA) の合成

cDNA合成試薬[PrimeScript RT reagent Kit, Takara]を用いて、以下の方法でサンプルRNAからcDNAを合成する。

(1) RT master mixtureの作成

1 サンプル当たり以下の試薬と容量で、RT master mixtureを調整し、ウエル（チューブを用いる場合はチューブ。以下「ウエル等」という。）当たり5.0 μ Lずつ分注する。

| 試薬 | 容量 |
|--|-------------|
| RNase-free 蒸留水 | 2.0 μ L |
| 5x PrimeScript Buffer (for Real Time) | 2.0 μ L |
| PrimeScript RT Enzyme Mix | 0.5 μ L |

| | |
|------------------------|--------|
| Random 6 mers (100 μM) | 0.5 μL |
| 合計 | 5.0 μL |

(2) ウイルスRNAの添加
 サンプルのウエル等にはサンプルRNAを、陰性対照のウエル等には蒸留水を、陽性対照のウエル等には陽性対照のウイルスRNAをそれぞれ5 μLずつ添加する。

(3) cDNAの合成
 (2) によりウイルスRNAを添加したチューブ又はプレートにPCR装置にセットし、以下のプログラムに従って、cDNAを合成する。

37°C 15分間 → 85°C 5秒間 → 4°C

3. リアルタイムPCR検査
 リアルタイムPCR試薬[Premix Ex Taq (Perfect Real Time), Takara RR039A]、NP遺伝子検査用のプライマー及びプローブを用いて、以下の方法でNP遺伝子を検出する。

(1) PCR master mixtureの調整
 ア 1 サンプル当たり以下の試薬と容量で、PCR master mixtureを調整する（検査には1 サンプルに対し2つのウエル等を使用する。）

| 試薬 | 容量 |
|-----------------------------|---------|
| PreMix Ex Taq | 20.0 μL |
| Forward Primer (10 pmol/μL) | 4.0 μL |

| | |
|-----------------------------------|--------------|
| Reverse Primer (10 pmol/ μ L) | 4.0 μ L |
| Probe (5 pmol/ μ L) | 4.0 μ L |
| Dye IIの5倍希釈液 | 4.0 μ L |
| RNase-free 蒸留水 | 2.0 μ L |
| 合計 | 38.0 μ L |

イ 1サンプルにつき2つのウェル等に19 μ Lずつ分注する。

鳥インフルエンザウイルスのNP遺伝子を検出するプライマーとプローブ

| プライマーと プローブの番 号 | プライマーと プローブの場所 | 塩基配列 |
|-----------------------|-------------------|----------------------------------|
| #551 | NP-1200F | AGRTAYTGGGCYATAAGRACGC |
| #806 | NP-1529R | ATTGCTCCGAAGAAATAAG |
| #553 | NP-Probe | FAM-ATCGGGYTCGTGGCCTTTTCGTCY-BHQ |

※ PCRの増幅産物のサイズは330bp

※※RはAとGの混合塩基、YはTとCの混合塩基

注意：ROX Dyeの調整は、機種及び解析ソフトによって異なるため、事前にメーカーに問い合わせて確認すること。なお、

代表的なリアルタイムPCR機器に使用するROX Dyeの種類と添加量は以下のとおり。

| メーカー | 機種 | 使用するDyeの種類 | Master Mixture調整 | |
|------------|---------------|----------------------------|------------------|-----|
| | | | 希釈 | 添加量 |
| ABI | 7300、7900HT | ROX Reference Dye (50×) | Dye:DW = 2:8 | 2μl |
| | 7500、7500Fast | ROX Reference Dye II (50×) | Dye II:D = 2:8 | 2μl |
| | Step One Plus | ROX Reference Dye (50×) | Dye:DW = 2:8 | 2μl |
| Bio-rad | CFD3240 | 不要 | DW | 2μl |
| | CFX96 | 不要 | DW | 2μl |
| | iQ5 | 不要 | DW | 2μl |
| Stratagene | MX3000P | ROX Reference Dye II (50×) | Dye II:DW = 2:8 | 2μl |
| Takara | TP800 | 不要 | DW | 2μl |

(2) cDNAの添加

ア cDNAを1μLずつウェル等に添加する。
イ プレートをシール後、遠心 (1000 rpm 5秒間) し、試薬

をウェル等の底に落とす。

(3) 遺伝子増幅

ア プレートをリアルタイムPCR装置にセットし、蛍光ファイ
ルターをFAMに設定し、以下のプログラムで遺伝子増幅反
応を行う。

イ 増幅プログラム

(ア) 95°C 30秒間 1回

(イ) 95°C 10秒間 → 50°C 20秒間 → 60°C 32秒
間を35サイクル

ウ 以下の (ア) 及び (イ) が認められない場合、その検査
は無効とみなし、再検査を行うこと。

(ア) 陽性対照に明瞭な増幅曲線が認められ、Cycle thre
shold (Ct) 値が15～25回の間を示すこと。

(イ) 陰性対照に明瞭な増幅曲線が認められないこと。

(4) 結果の判定

以下により結果の判定を行う。

ア 明瞭な蛍光増殖が2つのウェル等に認められCt値が33回
以内の場合は、陽性と判定する。

イ 以下の場合は陰性と判定する。

(ア) 閾値以上の明瞭な増幅曲線が2つのウェル等ともに
認められなかった場合

(イ) 1つのウェル等に明瞭な増幅曲線が認められず、1
つのウェル等に非増殖性の蛍光ラインが認められる
場合

(ウ) 2つのウェル等ともに非増殖性の蛍光ラインが認め
られる場合

(エ) 1つのウェル等に明瞭な増幅曲線が認められず、
もう1つのウェル等でCt値が34回以降に弱い増幅曲線
が認められた場合

ウ 以下の場合は再検査を実施する。

(ア) Ct値が9未満の場合、抽出した被検RNAをRNase-free
e 蒸留水で10倍希釈し、cDNAを合成後、再検査を実施する。

(イ) Ct値が2つのウェル等で34～35回で、弱いながらも一定の蛍光上昇を示す場合、疑陽性とみなし、再検査を実施する。

4. 注意事項

(1) プローブは反応検出のためFAMで標識されているため、FAM
に対するファイルターを有するリアルタイムPCR機器を使用す
ること。

(2) 検査の全過程を通して、酵素、プライマー及びプローブが
含まれる溶液は4℃前後に保つこと。

(3) 1で抽出したRNAは-70℃で、cDNAは-20℃でそれぞれ保存
すること。

(4) 3のプライマー液、プローブ液（遮光）は分注して、-20
℃で保管すること。

(5) 陽性対照RNAは分注して、-70℃で保存すること。

(6) 3の(1)で調整したPCR master mixtureを入れたプレート
トは、確実にシールした状態であれば、-70℃で半年間程度
は保存することができる。

(7) 再検査の結果、陽性又は陰性と判定できなかったものは、
ウイルス分離検査を行う。