24 日獣発第 20 号
平成 24 年 4 月 18 日

地方獣医師会会長　各 位

公益社団法人　日本獣医師会
会 長　　山 根 義 久
（公印及び契印の押印は省略）

ウエストナイルウイルス感染症防疫マニュアルの一部改正について

このことについて、平成24年３月16日付け23消安第6303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りましたので、貴会関係者に周知方よろしくお願い申し上げます。

このたびの通知の内容は、本年２月28日に開催された「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」における検討結果を踏まえ、主に下記の点等について、ウエストナイルウイルス感染症防疫マニュアルの一部改正を行い、別添のとおり都道府県知事宛てに通知したので旨了知願いたい旨と、会員各位等に対し周知及び迅速かつ円滑な防疫措置の実施についての協力を依頼されたものです。

記

１　これまで平時に家畜保健衛生所において実施されていた蚊及び野鳥を対象とするサーベイランスを取りやめる。

２　国内で実施されている本病に係る調査・研究等で陽性となった場合に、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「本病ウイルス感染確認地域」等の範囲を半径20㎞から半径10㎞に変更する。

３　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には、２の地域を半径10㎞の範囲を超えて拡大できる。

４　一定の範囲で死亡野鳥の増加等の異常があり、本病が疑われる場合には、必要に応じて当該死亡野鳥についての検査を実施する。

本件内容の問合せ先
日本獣医師会事業担当　笹川
TEL　03－3475－1601

写

２３消安第６３０３号
平成２４年３月１６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

ウエストナイルウイルス感染症防疫マニュアルの一部改正について

平素から、家畜衛生行政の推進に御協力賜り、誠にありがとうございます。

標記のことについて、ウエストナイルウイルス感染症防疫マニュアルの一部改正を行い、別添のとおり都道府県知事宛てに通知しましたので、御了知の上、貴傘下会員各位等に対する周知及び迅速かつ円滑な防疫措置の実施につき協力方よろしくお願いいたします。

社団法人日本獣医師会
受付
24.3.21
第818号

写

２３消安第６３０３号
平成２４年３月１６日

都道府県知事　殿

農林水産省消費・安全局長

ウエストナイルウイルス感染症防疫マニュアルの一部改正について

今般、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）を別紙のとおり改正したので、お知らせします。

本改正は、本年２月28日に開催された「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」における検討結果を踏まえ、

① これまで平時に家畜保健衛生所において実施されていた蚊及び野鳥を対象とするサーベイランスを取りやめる

② 国内で実施されている本病に係る調査・研究等で陽性となった場合に、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」等の範囲を半径20kmから半径10kmに変更する

③ 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には、②の地域を半径10kmの範囲を超えて拡大できる

④ 一定の範囲で死亡野鳥の増加等の異常があり、本病が疑われる場合には、必要に応じて、当該死亡野鳥についての検査を実施する

等の改正を行うものです。

貴職におかれましては、本マニュアルに基づき、引き続き、本病の防疫措置に遺漏のないようお願いいたします。

○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

改　正　案	現　　行
Ⅰ・Ⅱ　（略）	Ⅰ・Ⅱ　（略）
Ⅲ　野鳥及び馬のサーベイランス 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。 １　本ウイルス確認地域 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。 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。 ２　野鳥 （１）検体の採取 採取地を管轄する家畜保健衛生所（以下「家保」という。）	**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。

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、非特異反応等の可能性があることも考慮し、関係機関は、Ⅵ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。）の協力を得て、本ウイルス確認地域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、家畜市場等の関係施設（以下「関係施設」という。）における吸血昆虫の駆除等を指導するものとする。

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。

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、Ⅵの２から４までに基づき対応するものとする。	
Ⅳ　死亡野鳥の増加等異状が認められた際の措置等 １　死亡野鳥の検査 県畜産主務課は、死亡野鳥の増加等の異状があり、本病の感染が疑われる場合には、死亡野鳥の検査を行う必要があるかどうかについて、当該都道府県の関係部局と調整を行うものとし、当該調整の結果、必要があると判断される場合には、家保に別紙２－２に定める方法に従い、死亡野鳥の検査を行わせることができる。 ２　連絡及び検査材料の送付 家保における１の検査については、Ⅲの２の（３）を準用する。	
Ⅴ　異常馬発見時の措置等 １　異常馬の通報等 県畜産主務課は、飼養者等に対し、別紙５の症状を周知するとともに、異常馬を発見したときは、直ちに家保に通報するよう指導するものとする。 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。	**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。

Ⅵ　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Ⅴ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、病原学的検査にあってはウイルス分離・同定、ＰＣＲ法を用いた遺伝子診断（以下「ＰＣＲ法」という。）等により、血清学的検査にあっては中和試験及び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Ⅴ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。 **Ⅶ　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、Ⅵ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	**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、病原学的検査にあってはウイルス分離・同定、ＰＣＲ法を用いた遺伝子診断（以下「ＰＣＲ法」という。）等により、血清学的検査にあっては中和試験及び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～ｆ　（略）

（２）疑似患畜
　別紙５の症状を示し、かつ、Ⅵ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～ｆ　（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

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～ｆ　（略）

（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～ｆ　（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。

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

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。

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（港又は飛行場の区域を除く。）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、Ｖ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（港又は飛行場の区域を除く。）において、週１回（抗体確認以降１４日以上の期間）、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。 Ⅷ　（略） （別紙１） （略） （別紙２－１） 野鳥のサーベイランスについて	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　の ①　（略） ②　家保は、当該地域において、週１回（抗体確認以降１４日以上の期間）、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） （別紙１） （略） （別紙２－１） 蚊及び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。	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。
（別紙２－２） 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。）	（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　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）・（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　大検体破砕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）破砕用のビーズ(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、破砕する。

（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　ハンディー型破砕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、蚊が十分破砕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、破砕する。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。50～100μl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。）

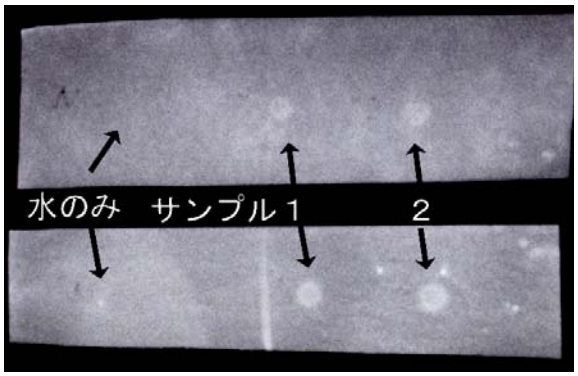
（ウ）点をうった位置にRNase free水とサンプルを各3～5μlずつ滴下する。

（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）:

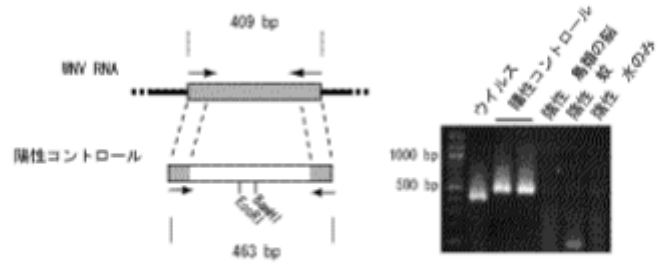
WNNY514new: 5’- Cgg CgC CTT CAT ACA CW -3’

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

プライマーはRNase free水で、100μM(=100μmol/l=100pmol/μl;業者によって表記が異なる。)あるいは50μM master stock solutionとして調製し、希釈して10μM および2μM 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。

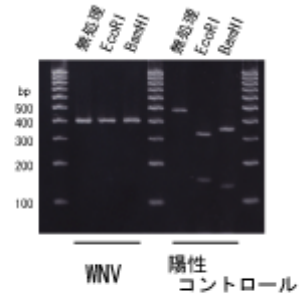
陽性コントロール（動物衛生研究所より配布）

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。



陽性コントロールは WNV プライマー結合領域（→）がマーカー配列（白）を挟むように設計された合成 RNA。（WNV に含まれる配列は灰色で示した。）

（図２：RT－PCRの結果（例）と陽性コントロールの構造）



PCR 産物を EcoRI および BamHI で処理した。
陽性コントロール由来の PCR 産物は消化される。

（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、以下の試薬を加る。

2μM WNNY904プライマー	1μl
10 mM dNTP	1μl

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

（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 ×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10μlを加えてコントロールを溶かし、陽性コントロールのチーブに全量入れる。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ダウン後、各チューブに以下の試薬を加える。

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

蓋を閉めタッピングで軽く混和後、37℃で2分間インキュベートする。

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

（ｈ）37℃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℃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24μずつ分注する。

（1本量）

10 × Buffer	2.5μl
2.5mM dNTPs	2μl
10μM WNNY514new	2μl
10μM WNNY904	2μl
Ex Taq	0.125μl
DW	15.375μl
合計	24μl

（ｂ）DW1μl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1μl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1μl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1μl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℃　2分

↓

denature: 94℃	30秒	40サイクル
anneling: 53℃	1分	
extension: 72℃	1分	

↓

post-extension: 72℃　　7分

（ｇ）各反応液10μl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 polymeraseReverse transcrptation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9μずつ分注する。

（1本量）

10 × Reverse Transcriptation buffer	1μl
2.5mM dNTPs	0.8μl
MnCl2	1μl
10μM WNNY904	0.75μl
Tth polymerase	0.5μl
RNase free 水	0.95μl
合計	5μl

（ｂ）サンプル由来RNAを5μlずつチューブに加える。蓋を閉める。

（ｃ）RNase free水を5μl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）

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

（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	40サイクル
anneling: 53℃	1分	
extension: 72℃	1分	

	↓ post-extension: 72℃　　7分 （ｉ）各反応液10μl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） （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。50～100μl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	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 蚊の処理方法を参照すること。

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。

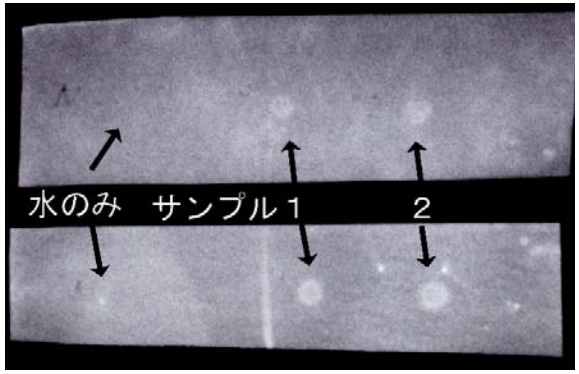
N・　　1・　　2・

（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。

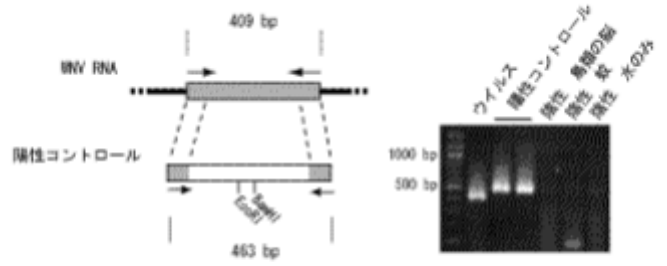
プライマー（市販品）:
WNNY514new: 5’- Cgg CgC CTT CAT ACA CW -3’
WNNY904: 5’- gCC TTT gAA CAg ACg CCA TA -3’

プライマーはRNase free水で、100μM(=100μmol/l=100pmol/μl;業者によって表記が異なる。)あるいは50μM master

stock solutionとして調製し、希釈して10μM および2μM 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。

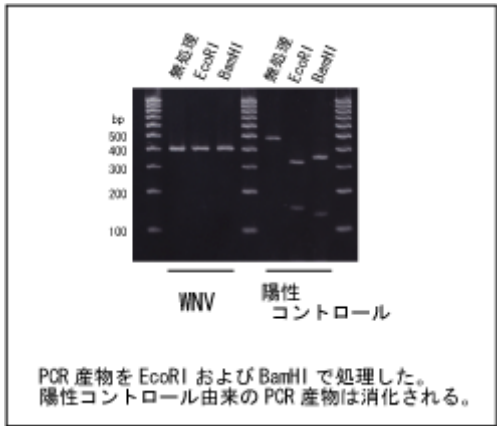
陽性コントロール（動物衛生研究所より配布）

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。



陽性コントロールは WNV プライマー結合領域（→）がマーカー配列（白）を挟むように設計された合成 RNA。（WNV に含まれる配列は灰色で示した。）

（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、以下の試薬を加る。

2μM WNNY904プライマー	1μl
10 mM dNTP	1μl

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

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

（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 ×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10μlを加えてコントロールを溶かし、陽性コントロールのチーブに全量入れる。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ダウン後、各チューブに以下の試薬を加える。

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

蓋を閉めタッピングで軽く混和後、37℃で2分間インキュベートする。

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

（ｈ）37℃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℃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24μずつ分注する。

（1本量）

10 × Buffer	2.5μl
2.5mM dNTPs	2μl
10μM WNNY514new	2μl
10μM WNNY904	2μl
Ex Taq	0.125μl

DW	15.375μl
合計	24μl

（b）DW1μl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1μl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1μl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1μl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℃　2分
↓

denature: 94℃	30秒	40サイクル
anneling: 53℃	1分	
extension: 72℃	1分	

↓
post-extension: 72℃ 7分

（g）各反応液10μl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 polymeraseReverse transcrptation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9μずつ分注する。

（1本量）

10 × Reverse Transcriptation buffer	1μl
2.5mM dNTPs	0.8μl
MnCl2	1μl
10μM WNNY904	0.75μl
Tth polymerase	0.5μl
RNase free 水	0.95μl
合計	5μl

（ｂ）サンプル由来RNAを5μlずつチューブに加える。蓋を閉める。

（ｃ）RNase free水を5μl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）

10μM WNNY 514new	0.75μl

Tth DNA Chelate 10 × Buffer	4.0μl
MgCl2	4.0μl
DW水	31.25μl
合計	40μl

（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	40サイクル
anneling: 53℃	1分	
extension: 72℃	1分	

↓
post-extension: 72℃ 7分

（ｉ）各反応液10μl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

＊　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）	（略）
（別紙３） 野鳥及び馬の検査材料の送付について	（別紙３） 検査材料の送付について
（削る。）	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。
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）及び各種臓器にあっては－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。	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）及び各種臓器にあっては－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） 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

（別記様式１）

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。）

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）

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）

野鳥 （略） （別記様式２） （略）	４　検査日 ５　備考 野鳥 （略） （別記様式３） （略）

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
平成２４年３月１６日付け２３消安第６３０３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　野鳥及び馬のサーベイランス

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。

１　本ウイルス確認地域

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。

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。

２　野鳥

（１）検体の採取

採取地を管轄する家畜保健衛生所（以下「家保」という。）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、非特異反応等の可能性があることも考慮し、関係機関は、Ⅵ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、家畜市場等の関係施設（以下「関係施設」という。）におけ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、Ｖの２から４までに基づき対応するものとする。

Ⅳ　死亡野鳥の増加等異状が認められた際の措置等

１　死亡野鳥の検査

県畜産主務課は、死亡野鳥の増加等の異状があり、本病の感染が疑われる場合には、死亡野鳥の検査を行う必要があるかどうかについて、当該都道府県の関係部局と調整を行うものとし、当該調整の結果、必要があると判断される場合には、家保に別紙２－２に定める方法に従い、死亡野鳥の検査を行わせるこことができる。

２　連絡及び検査材料の送付

家保における１の検査については、Ⅲの２の（３）を準用する。

Ⅴ　異常馬発見時の措置等

１　異常馬の通報等

県畜産主務課は、飼養者等に対し、別紙５の症状を周知するとともに、異常馬を発見したときは、直ちに家保に通報するよう指導するものとする。

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。

Ⅵ　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Ⅴ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、病原学的検査にあってはウイルス分離・同定、ＰＣＲ法を用いた遺伝子診断（以下「ＰＣＲ法」という。）等により、血清学的検査にあっては中和試験及び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Ⅴ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。

Ⅶ　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、Ⅵ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、Ⅵ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は、その確認された場所を中心として半径1

０ｋｍ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。

（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、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養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（港又は飛行場の区域を除く。）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、Ｖ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　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、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、本ウイルス抗体等確認地域（港又は飛行場の区域を除く。）において、週１回（抗体確認以降１４日以上の期間）、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。

Ⅷ　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。

（別紙１）

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。

（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。

（別紙２－２）

サーベイランス時の野鳥の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　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℃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℃以下で保存する。
（５）RT-PCR：RT-PCRを行う。残ったRNAは-80℃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）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　大検体破砕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）破砕用のビーズ(3～5mmφ、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℃）で凍結したのち、直ちに装置にセットし、破砕する。
（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℃で保存する。
（オ）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。

イ　ハンディー型破砕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）破砕用のクラッシャー（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、脳組織が十分破砕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、破砕する。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

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。50～100μl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。

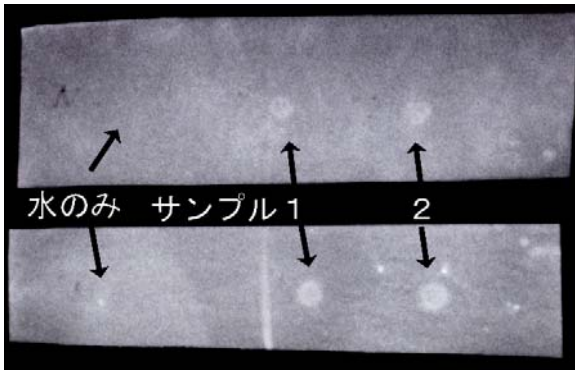
（イ）鉛筆で下図のように印を付ける。

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。



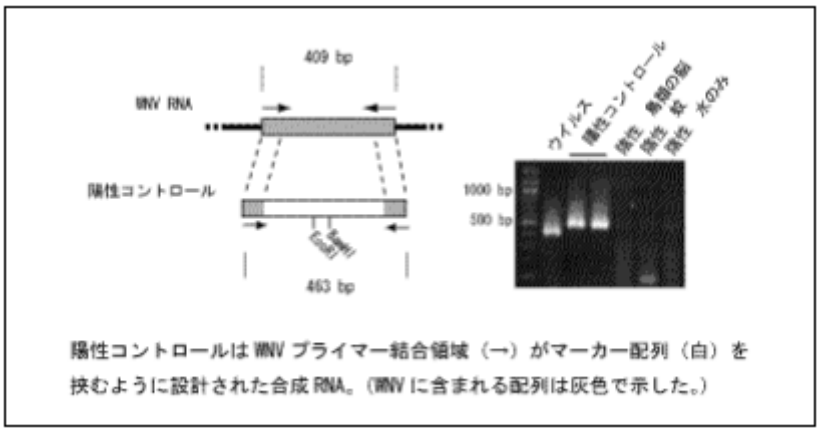
（図１：ナイロンメンブレンによるRNA抽出確認例）
水のみでは光らないが、RNAサンプルは光る。
上のナイロンメンブレンはエチジウムブロマイド染色。下のナイロンメンブレンはSYBR Green Ⅱ染色。

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’

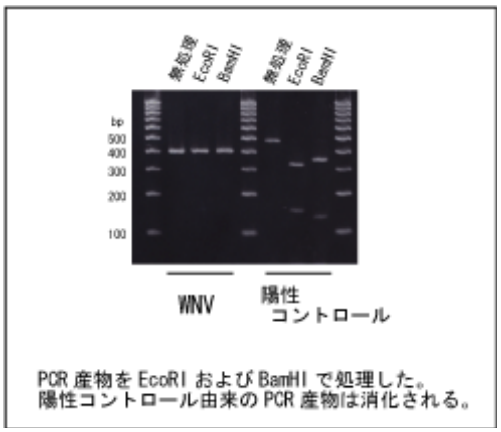
プライマーはRNase free水で、100μM(=100μmol/l=100pmol/μl;業者によって表記が異なる。)あるいは50μM master stock solutionとして調製し、希釈して10μM および2μM working stock solutionを調製する。working stock solutionは10回分程度に分注する。master stock solution、working stock solution ともに-20℃以下で保存する。

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。



陽性コントロールは WNV プライマー結合領域（→）がマーカー配列（白）を挟むように設計された合成 RNA。（WNV に含まれる配列は灰色で示した。）

（図２：RT－PCRの結果（例）と陽性コントロールの構造）



PCR 産物を EcoRI および BamHI で処理した。
陽性コントロール由来の PCR 産物は消化される。

（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。

2μM WNNY904プライマー	1μl
10 mM dNTP	1μl

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

（ｃ）RNase free水10μl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 ×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10μl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ダウン後、各チューブに以下の試薬を加える。

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

蓋を閉めタッピングで軽く混和後、37℃で2分間インキュベートする。

（ｇ）M-MLV reverse transcriptaseを1μlずつ加える。
（ｈ）37℃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℃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24μlずつ分注する。

（1本量）

10 × Buffer	2.5μl
2.5mM dNTPs	2μl
10μM WNNY514new	2μl
10μM WNNY904	2μl
Ex Taq	0.125μl
DW	15.375μl
合計	24μl

（ｂ）DW1μl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1μl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1μl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1μl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℃　2分
↓

denature: 94℃	30秒	40サイクル
anneling: 53℃	1分	
extension: 72℃	1分	

↓
post-extension: 72℃　7分

（ｇ）各反応液10μl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 transcrptation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9μlずつ分注する。

（1本量）

10 × Reverse Transcriptation buffer	1μl
2.5mM dNTPs	0.8μl
MnCl2	1μl
10μM WNNY904	0.75μl
Tth polymerase	0.5μl
RNase free 水	0.95μl
合計	5μl

（ｂ）サンプル由来RNAを5μlずつチューブに加える。蓋を閉める。

（ｃ）RNase free水を5μl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(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）

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

（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	40サイクル
anneling: 53℃	1分	
extension: 72℃	1分	

↓
post-extension: 72℃　7分

（ｉ）各反応液10μl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

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こと
５　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。

（別紙３）

野鳥及び馬の検査材料の送付について

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）及び各種臓器にあっては－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。

（別紙４）

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、液体の場合にあっては1,000ml未満、個体の場合にあっては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るので、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。）。

（別紙５）

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、歯ぎしり、急死

（別記様式１）

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

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

（別記様式２）

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23年度ウエストナイルウイルス感染症防疫技術検討会
議　事　概　要
（平成24年２月28日開催）

１　座長の選出について

本検討会の座長には、日本獣医生命科学大学の池田秀利教授が選出された。

２　家畜衛生部局におけるウエストナイルウイルス感染症サーベイランスの見直しについて

これまで我が国の家畜での発生がなく、国内のサーベイランス結果も全て陰性であることに加えて、海外における馬での発生件数は毎年減少していること等の状況を踏まえ、以下のとおりサーベイランス体制等を変更することで差し支えないとされた。

（１）これまで平時に都道府県の家畜保健衛生所において実施されていた蚊及び野鳥を対象とするサーベイランスを取り止める。

（２）国内で実施されている本病に係る調査・研究等で陽性となった場合に、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」の範囲を半径20km から半径10km に変更する。

（３）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、（２）の地域を半径10km の範囲を超えて拡大できる。

（４）一定の範囲でカラスなど本ウイルスに感受性が高い野鳥が多数死亡し、本病が疑われる場合には、当該死亡野鳥についての検査を実施する。

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

上記２の家畜衛生部局におけるサーベイランスの見直しを踏まえ、今後、事務局において本マニュアルの改正作業を進めることとされた。

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）