



神奈川県

環境農政局農政部畜産課

平成 26 年度

家畜保健衛生業績発表会集録

平成 27 年 3 月

平成 26 年度 神奈川県家畜保健衛生業績発表会

開催月日 平成 27 年 1 月 9 日 (金)

開催場所 海老名市文化会館 小ホール
海老名市上郷 4 7 6 - 2

助言者

神奈川県環境農政局農政部畜産課長 石田 聡

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 病態研究領域 上席研究員 播谷 亮

神奈川県農業共済組合 家畜診療所長 小林 延竹

神奈川県畜産技術センター所長 竹本 佳正

平成26年度神奈川県家畜保健衛生業績発表会開催要領

1 目的

神奈川県家畜保健衛生業績発表会（以下「発表会」という。）は、家畜保健衛生所の職員が日常業務の中で得られた業績について、発表・討議を行い、本県の畜産の現況に即した家畜保健衛生事業の改善向上に資することを目的とする。

2 主催

環境農政局農政部畜産課

3 開催日時

平成27年1月9日（金曜日） 10時00分から16時30分

4 開催場所

海老名市文化会館 小ホール
海老名市上郷476-2

5 発表内容

一部：家畜保健衛生所等の運営及び家畜保健衛生の企画、推進に関する業務
二部：家畜保健衛生所における家畜の保健衛生に関する試験、調査成績

6 発表形式

発表は1題10分以内、質疑応答2分以内とし、図表はすべてコンピュータ及び液晶プロジェクター（1演題につき1台）を用いる。

7 審査及び助言者

審査員長：畜産課長

審査員：畜産技術センター所長

動物衛生研究所職員（同研究所長の推薦する者）

神奈川県農業共済組合職員（同組合理事長の推薦する者）

8 その他

(1) 本発表会は一般公開とし、広く畜産関係機関、関係教育機関、その他に対しその開催を周知するものとする。

(2) 本発表会は第56回関東甲信越ブロック家畜保健衛生業績発表会に発表する代表課題の選出を行う。

また、日本産業動物獣医学会関東地区学会、関東甲信越地区鶏病技術検討会及び神奈川県獣医師会学術症例発表会等に発表する課題を推薦する。ただし、該当する課題が無い場合は、別途、協議するものとする。

(3) 発表演題は、原則として、各所、一部・二部とも1題以上とする。

(4) 抄録及び全文原稿の提出はそれぞれの作成要領による。

(5) 抄録及び全文原稿等の提出期限

ア 発表演題及び発表者	平成26年11月28日（金曜日）
イ 県発表会抄録	平成26年12月5日（金曜日）
ウ 関東甲信越ブロック業績発表会抄録	平成27年1月16日（金曜日）
エ 国報告用(全国発表抄録集用)抄録	平成27年1月23日（金曜日）
オ 発表全文原稿	平成27年2月20日（金曜日）

演 題 名	所 属 演 者 名	ペー ジ
(第一部)		
1 当所における牛海綿状脳症対応の変遷	・・・ 湘南家保 宮下 泰人	・・・ 1
2 豚流行性下痢の発生を契機とした総合的防疫体制の構築	・・・ 県央家保 辻 寛子	・・・ 8
3 管内馬飼養施設にかかる防疫対応の現状と今後の課題	・・・ 県央家保 岩田 啓	・・・ 14
④ 家畜保健衛生所における検査の信頼性の確保にむけて	・・・ 湘南家保 田村 みず穂	・・・ 20
⑤ タブレット型端末を活用した獣医事指導業務のスマート化	・・・ 県央家保 田中 嘉州	・・・ 26
(第二部)		
6 全身に出血を認めた子牛の死亡例	・・・ 湘南家保 駒井 圭	・・・ 34
7 豚流行性下痢（PED）の病性鑑定事例	・・・ 県央家保 英 俊征	・・・ 40
8 県内で発生した豚流行性下痢（PED）の発生事例	・・・ 県央家保 中原 祐輔	・・・ 47
9 PRRS・PCV2 浸潤農場における衛生対策とその効果	・・・ 湘南家保 中橋 徹	・・・ 54
10 鳥インフルエンザ検査におけるリアルタイムPCRのデータ解析法の比較検討	・・・ 県央家保 高山 環	・・・ 60
⑪ ニホンミツバチのアカリンダニ症の発生事例	・・・ 県央家保 宮地 明子	・・・ 66

(◎は、第56回全国家畜保健衛生業績発表会選出演題)

(○は、第56回関東甲信越ブロック家畜保健衛生業績発表会選出演題)

当所における牛海綿状脳症対応の変遷

湘南家畜保健衛生所

宮下 泰人 秋本 遼
 関間 佐和子 太田 和彦
 稲垣 康子

はじめに

我が国の牛海綿状脳症（BSE）は、表1のとおり平成13年9月に千葉県で初めて確認され、平成21年1月までに11道県で36例が確認された。

この間、表2のとおりBSE対策が実施され、当所もこの13年にわたり、それぞれ対応した。

そして、平成21年1月を最後に確認されておらず、平成25年5月には国際獣疫事務局から「BSE

のリスクのない国」
 に認定された。今回、
 その13年間に当所が
 実施したBSE対策
 について報告する。

表1 国内のBSE確認状況

◆ 初発	H13. 9.21（千葉県）
◆ 最終確認	H21. 1.30（北海道）
◆ 確認状況	北海道：25例 神奈川県：2例 栃木県、群馬県、千葉県、 奈良県、広島県、和歌山県、 岡山県、長崎県、熊本県 ：各1例 合計 36 例

表2 BSEの国内対策

- ◆ 食の安全安心のための対策
 特定危険部位の除去
 24か月齢以上のと畜牛のBSE検査
- ◆ 感染を防ぐ対策（飼料規制）
 牛肉骨粉等の飼料としての給与禁止
- ◆ サーベイランス
 24か月齢以上の死亡牛の届出と
 BSE検査の実施
 *牛の個体識別システムの導入

BSE患畜の発生と発生農場の対策

本県は北海道に次ぐ2例の患畜と国内唯一の疑似患畜
 がと畜検査で確認されており、いずれも当所管内の農場
 の出荷牛で、発生農場においてそれぞれ防疫対応した。

発生概要は表3のとおりで、平成14年8月と平成16
 年2月にと畜検査によりBSE患畜が確認され、いずれ
 もホルスタイン種のめす牛だった。また、平成15年2

表3 本県で確認されたBSEの概要

- | |
|--|
| ◆ 患畜1例目（全国5例目）
確認年月日：H14. 8.23(と畜検査)
H7.12.5生(80か月齢)、和種、雌、県内産 |
| ◆ 患畜2例目（全国10例目）
確認年月日：H16. 2.22(と畜検査)
H8.3.17生(95か月齢)、和種、雌、県内産 |
| ◆ 疑似患畜
確認年月日：H15. 2. 8(と畜検査)
S58.1.1生(238か月齢)、黒毛和種、雌、他県産 |

月にと畜検査でスクリーニング検査陽性となった牛は、確認検査で患畜の要件をすべて満たしていなかったため、わが国で唯一、と畜検査において疑似患畜と判定し、処置した。

実際の防疫対応は、表4のとおりで、感染経路の特定のため当該農場で使用した給与飼料の情報や給与状況、飼養牛の異動履歴などの疫学調査を実施した。

また、この結果から疑似患畜を特定し、病性鑑定を実施するために処分した。

1例目においては、疫学調査にはのべ336名、疑似患畜の処分にのべ253名の畜産関係の県職員を動員した。

なお、本県2例目及びと畜検査で疑似患畜と判定された事例については、1例目と同様に疫学調査を実施したが、同居歴等に基づく疑似患畜の要件が変更となったため、同居牛で疑似患畜と判定された牛はなかった。

また、1例目の防疫対応は、マニュアル化し、BSE実務必携として取りまとめ、他県に配布するなど、後の対応にも活用されている。

表4 BSE防疫対応の概要

◆ 防疫対応
疫学調査（給与飼料、同居牛の異動履歴）
→ 感染経路の解明、疑似患畜の特定
疑似患畜処分
→ 飼料給与状況、同居歴により37頭特定
病性鑑定のための処分
◆ 従事人員
疫学調査 : のべ336名
疑似患畜処分 : のべ253名
◆ BSE実務必携の作成

当所のBSE対策の変遷

BSE対策は、発生農場の対策に止まらず、表2の1番目のように「食肉の安全を確保するためのと畜場における対策」、2番目のように「異常プリオンによる飼料汚染を防止し、BSEの感染拡大を防ぐための飼料規制」、3番目のように「サーベイランスとして、BSE特別措置法に基づく、24ヶ月齢以上の死亡牛の届出とBSE検査」の3つの対策が実施された。また、時を同じくして、BSE対策の的確な実施や食の信頼回復のために個体識別システムが導入されている。

これらのうち、当所で実施したのは、飼料規制に伴う実態調査と指導、死亡牛のサーベイランス、個体識別システムのための耳標の一斉装着と個体情報の整理、記録である。

飼料規制に伴う調査、指導は現在まで継続実施している。個体識別システムの構築は、市町、農協など関係機関の協力を得て、管内のすべての牛への耳標装着とともにデータの記録など必要な事務手続きを3ヶ月間という短期間で実施した。

サーベイランスについては、これに先立ち、検査対象牛の届出受付、受け入れの体制整備と死亡牛受け入れ、検査材料を採材する施設を整備した。

死亡牛のBSE検査体制の構築

死亡牛受け入れの体制整備は図1とおりで、24カ月齢以上の牛が死亡した際に、獣医師あるいは生産者から電話で届出を受け付けることとした。

届出内容は、生年月日と個体識別番号など検査対象月齢であることの確認と受け入れた死亡牛の照合を行った。併せて生産者から化製場に、BSE検査陰性となった死亡牛の処理の申し込みをするようにした。

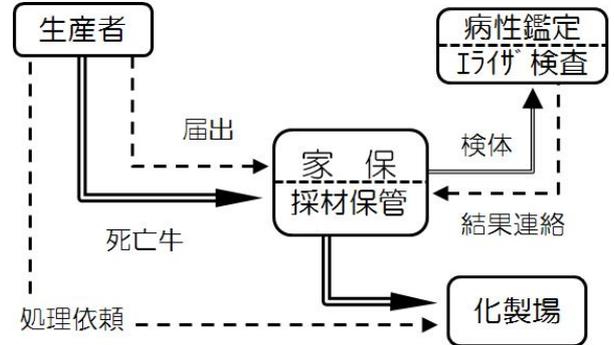


図1 死亡牛受入体制の概要

死亡牛の検査は、家保に搬入された死亡牛の検査材料を、病性鑑定施設においてスクリーニング検査を実施、死亡牛は結果がでるまで冷蔵施設で保管し、陰性の結果をもって、化製場に搬送した。

なお、搬送中、家保施設、化製場の衛生状況を担保するために、開業獣医師の協力の下、死亡牛の検案書を死亡牛と併せて搬送した。

採材保管施設の整備

サーベイランスには、搬送された死亡牛から検査材料を採材し、検査の結果が判明し、化製処理業者が搬出するまでの間、死亡牛を冷蔵、保管しておく施設が必要となった。そのために6頭の死亡牛を保管可能な施設を、当所と県中央家保の2箇所に設置することとなった。

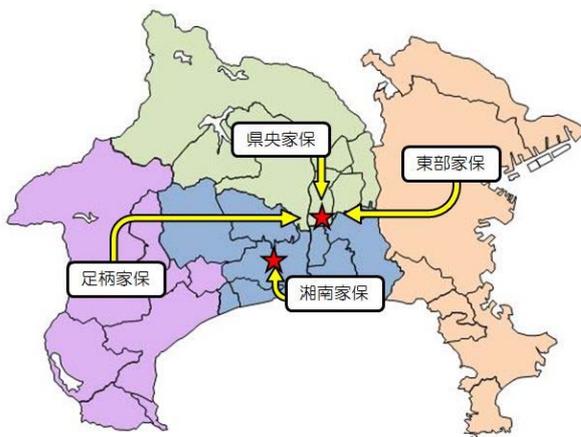


図2 死亡牛受入区域



図3 受入区域の変更

施設設置にあたっては、計画段階で地元の反応は芳しいものではなかった。そこで、図2のように地域ごとの死亡牛処理頭数のバランスをとることと併せ、当所施設へは当所管内の死亡牛のみを受け入れることとし、他の3家保の死亡牛は県央家保の施設で受け入れることとした。

受け入れるための冷蔵保管施設は、BSE検査のための検査材料の採材を行うスペースと保管のための冷蔵庫からなる施設を、限られた敷地内にコンパクトに設置した。

施設運用上の課題と対応

この施設は平成15年4月から稼働を開始し、12年にわたって運用してきたが、この間、様々な課題に遭遇し、その都度対処してきた。

主なものは、受入区域の変更、施設、機器の改善、改修など施設の維持管理、休日対応の変更で、詳細を次に紹介する。

1 受入区域の変更

本県の家保は平成22年4月に組織再編され、4箇所あったものが2箇所に統合された。そして、その2年後に、図3のように、一部受け入れ区域を変更し、県央家保の施設で受け入れていた足柄、西湘地域の死亡牛を当所で受け入れ、頭数見合いで当所管内の藤沢、茅ヶ崎、寒川の死亡牛を県央家保の施設で受け入れることとした。

この変更により、それぞれの地区から各採材保管施設への運搬にかかる時間が短縮されるとともに、死亡牛回収のルートが効率化され、業務を大幅に効率化することができた。



写真1 ホイストクレーン

2 維持管理

(1) ホイストクレーンの追加 (写真1)

当所の採材保管施設は、死亡牛の搬入、搬出は、ホイストクレーンを用いて車両へ積み下ろしているが、コンパクトな施設のために、搬送車輛の荷台部分しか施設内に導入することができないために、当初は荷台と直角方向（東西方向）に稼働するホイストクレーンにより作業していた。このため、荷台の前部、後部の牛は下ろしづらく、危険が伴うために、平成17年度に南北のレールを設置した。これに

より、死亡牛の搬入、搬出作業が安全に無理なくできるようになった。

(2) 保管用ボックスの変更

牛の保管用のボックスは、限られたスペースで取り回せるよう、キャスター付きの人力で運用するボックスを



写真2 保管ボックス



写真3 ローリフト

作成したが、死亡牛収容時の移動には相当な力が必要で、怪我をする事故も発生した。そこで、狭い場所でも取り回せる電動のローリフトを平成17年度に導入した。

導入に際しては、2本のフォークの幅を特注で広げ、ボックスの運搬時の安定性を確保した。

また、ローリフトの導入に伴い、保管用のボックスもこれに併せて更新することとし、L字鋼に亜鉛メッキで作成したカゴにステンレスのバットを組み合わせることで、安価でありながら軽量で強度と耐久性を確保した。形状も工夫し、短辺上部に切り欠き部分を設け、強度を確保しつつ、清掃時に容易に中に入れる構造とした。

(3) クーラーユニットの改修

クーラーユニットの冷却フィンが銅製で、平成18年度に死亡牛から発生した亜硫酸ガスで出来た硫酸が原因と思われる冷却フィンの腐食により、冷媒ガスが漏出、保管不能となる事故が発生した。これに対処するために、ユニット全体をステンレスで特注したクーラーに交換した。



写真4 クーラーユニット

3 休日の対応

事業開始当初は、円滑な死亡牛処理のために死亡牛の受け入れを年末年始を除き、すべての休日で実施していた。しかしながら、死亡牛の届出頭数の実績

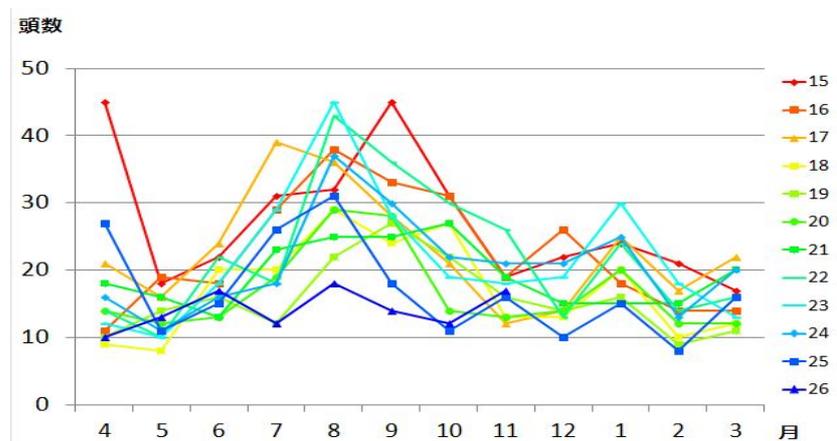


図5 死亡牛届出件数の実績 (年度別、月別)

を年度別、月別に検討したところ、図5に示すように季節性があることが確認された。このため、現在

は年末年始、ゴールデンウィークを除き、原則、平日だけの対応とし、7月から10月の死亡牛の多い季節のみ土曜日に開庁することとし、業務の円滑化と効率化を両立している。

4 継続実施している事項

本施設は、計画時に地元住民から反対運動が起きた経緯を踏まえ、特に衛生面、環境面には気を使っており、運搬車輛の消毒、施設、備品の徹底した清掃、消毒、景観保持のための植栽の維持管理は、事業開始当初から継続して実施している。

まとめ

以上をまとめると次のとおりである。

- 1 当所では、BSE患畜と疑似患畜発生農場について防疫対応するとともに、BSE実務必携を作成した。
- 2 24カ月齢以上の死亡牛について届出と死亡牛受入の体制を整備するとともに、BSE検査材料の採材し、検査の結果が出るまで保管する施設を設置し、12年にわたって運用してきた。
- 3 この間、施設、機器の追加、更新、改修など維持管理を随時実施するとともに、受け入れ区域の変更及び一部休日も対応し業務の安全確保、効率化により円滑な業務運営に努めた。

平成25年5月、初発以来12年にわたる地道なBSE対策により国際獣疫事務局から「無視できるBSEリスクの国」に認定された。そのような中、飼料規制以前に生まれた牛がまだ存在しており、食の安全、安心のためには、現在検討されている検査対象月齢の48カ月齢への

引き上げなど検査体制を見直しつつ、死亡牛検査は継続する必要があると考える。このためには、機器の定期点検や日常の整備に加え、老朽化した施設、機器の修繕、場合によっては更新するなど、業務に

表5 わが国のBSEを巡る情勢と今後の課題

H13.9	BSE国内初発生
.10	と畜場法改正 飼料の安全性確保及び品質の改善に関する法律改正
H14.6	BSE特別措置法制定
H15.6	牛の個体識別のための情報の管理及び伝達に関する特別措置法制定
H21.1	BSE国内最終発生
.5	OIE「管理されたBSEリスクの国」認定
H25.5	OIE「無視できるBSEリスクの国」認定

- ◆ 死亡牛検査の見直し、継続
- ◆ 施設、機器の維持管理
 - 定期点検、整備
 - 老朽化に伴う修繕、更新

支障が出ないような対応が必要である。「無視できるBSEリスクの国」という国際基準のステータスは、食の安全、安心の証です。今後も死亡牛のBSE検査という業務を通して、これに貢献しているという自覚を持ちつつ、業務に当たってゆく所存である。

参考文献

- 1) 荒井ら : 平成14年度神奈川県家畜保健衛生業績発表会,演題1番(2006)
- 2) 藤沢ら : 平成15年度神奈川県家畜保健衛生業績発表会,演題1番(2007)
- 3) 山本ら : 平成17年度神奈川県家畜保健衛生業績発表会,演題2番(2009)

豚流行性下痢の発生を契機とした総合的防疫体制の構築

県央家畜保健衛生所

辻 寛子 中原 祐輔
山本 禎 米持 修
篠崎 隆 和泉屋 公一
吉田 昌司

はじめに

豚流行性下痢（以下、PED）は、PEDウイルスが感染し、豚に嘔吐や下痢等を引き起こす疾病で家畜伝染病予防法の届出伝染病に指定されている。平成25年10月、沖縄県で7年ぶりに発生が認められて以降、全国へまん延し、平成26年12月21日までの間に39道都県、延べ852農場で発生が報告されている。また、今般流行したPEDは、哺乳豚に高率な死亡等を引き起こすことから、社会的に甚大な影響をもたらしている。

本病まん延の主な要因は、「発生農場間における豚や精液の流通」、「家畜運搬車両や飼料運搬車両等の移動」、「共通のと畜場、糞尿処理施設、堆肥化処理施設の利用による交差汚染」及び「農場関係者の出入りまたは野生動物による伝播」であったことが報告されている²⁾。

平成26年5月、管内の一養豚場でPEDが発生した。当該農場の所在地は本県においては比較的養豚密集地域であったが、周辺農場へのまん延はなく、一例で終息した。これは全国的な流行以前から、当所が推進した「養豚関係者が一丸となり防疫対策の強化による総合的防疫体制の構築によるもの」と考えるので、その概要を報告する。

全国的な流行以前からの総合的防疫体制の構築

県内発生以前から、本県へのPEDの侵入とまん延防止を図るためには、各々の生産者だけが防疫対策を講じるのではなく、全ての養豚関係者が一丸となり一層の防疫対策を強化することが重要と考えた。そこで当所は、平成25年12月から「生産者一家畜運搬者」と畜場等への情報発信の拡大、「と畜場における消毒等の強化」及び「発生地域における自衛防疫対策の強化」の3つに重点を置いた総

合的防疫体制の構築の取り組みを推進した（図1）。

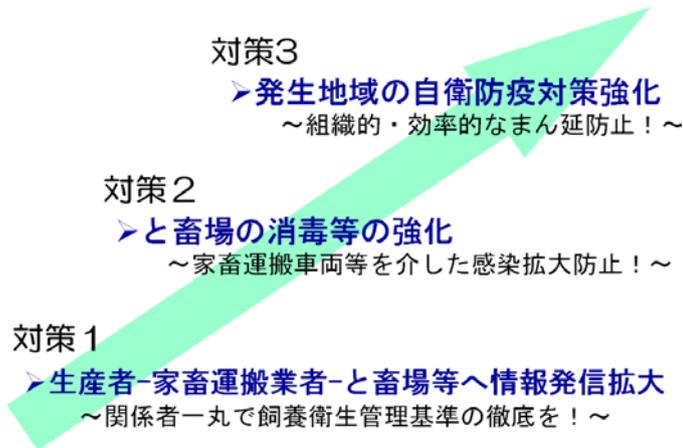


図1 総合的防疫体制の構築

1 情報発信の拡大

当所における平常時の情報発信は、広報紙を用いて監視伝染病の発生情報等を生産者、獣医師、市町村及び農協等へ郵便等で送付している。しかし、今般のPED流行以後は、県内への侵入防止対策に万全を期するため、広報紙による定期的な情報発信だけでなく、ファクシミリも利用し、と畜場、食肉衛生検査所、家畜運搬者及び飼料運搬者等多くの養豚関係者へ情報提供先を拡大して発信し、各々がそれぞれの役割を認識し、同時期に複数層で対策を実施するよう周知や注意喚起を行った（図2）。

情報発信は、平成25年11月から平成26年12月までに、広報紙を6回発行、ファクシミリを25回送信、さらに、生産者や農協等による勉強会の機会を捉えた情報発信を延べ25回実施し、計56回行った。情報の内容は、全国や近隣県における発生状況を当所で取りまとめたものに加え、本病の特徴、防疫対策のポイント（早期発見・早期通報、飼養衛生管理基準の徹底、適切な消毒方法及びワクチン接種等）及び養豚関係者が一丸となり一斉に取り組む重要性を周知した。このことにより、生産者や関係機関とより一層の密なコミュニケーションが図られ、養豚関係者全体で実施する防疫対策の重要性に対して理解が得られ、車両等の消毒が徹底された。

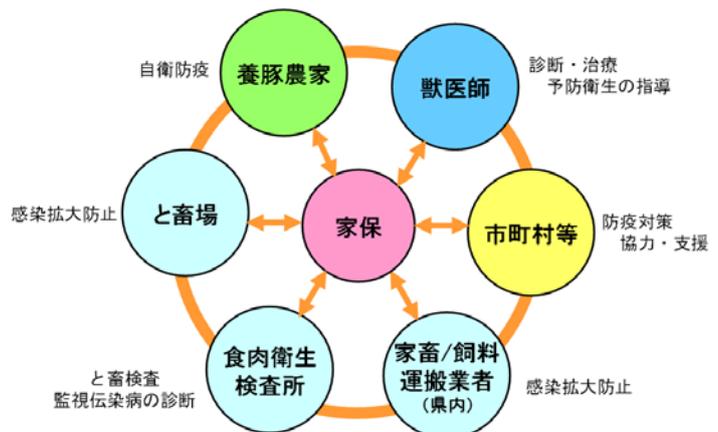


図2 情報発信の拡大

2 と畜場における消毒等の強化

県内におけると畜場は、年間約54万頭の豚を処理する(株)神奈川食肉センター(以下、KMC)と、年間約13万頭の豚を処理する横浜市中心卸売市場食肉市場(以下、横浜市と畜場)の2箇所がある。各と畜場の産地別搬入割合は、KMCでは約52%が関東地域(神奈川県を除く)、約27%が東北地域等¹⁾、横浜市と畜場では約60%が関東地域(神奈川県を除く)等³⁾から搬入されており、県外の生産地から多くの豚が搬入されている(図3、4)。これらの地域では、今般のPEDの発生が認められていることから、県内養豚場へと畜場及び家畜運搬車両等を介したウイルス伝播が危惧された。

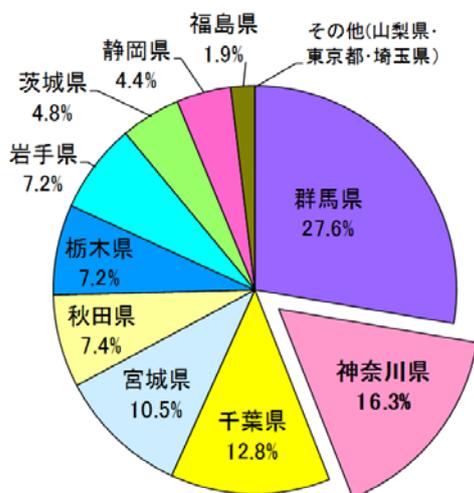


図3 KMCにおける産地別搬入状況

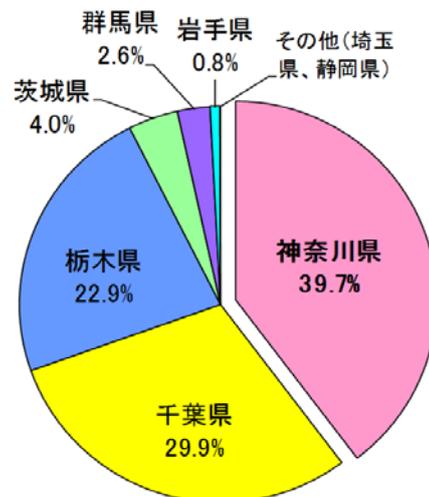


図4 横浜市と畜場における産地別搬入状況

そこで当所は、と畜場における消毒等を強化するため、と畜場を利用する家畜運搬者や利用者向けにPED対策の要点をまとめたリーフレットを作成した(図5)。また、各と畜場の施設管理者に対し、家畜運搬者等へのリーフレットの配布や場内掲示を依頼するとともに、併せて、家畜運搬車両の交差汚染防止、車両・手指・靴底の消毒徹底等の防疫対策の継続的な実施について協力を要請した。さらに、車両等の消毒実施状況について、関東流行前の平成26年1月、関東流行時の平成26年4～5月、今季流行前の平成26年11月の各3回、計6回場内に立ち入りし、確認を行った。

県内と畜場へ出荷を行う運搬業者の皆様へ
神奈川県 家畜保健衛生所からのお願い!

**豚流行性下痢(PED)
感染拡大を防止するために!**

- 1 豚を出荷した後は、家畜運搬車の洗浄、消毒を必ず行ってから、帰路についてください。
洗浄場所が込み合っても、必ず洗浄、消毒をしてください。
- 2 出荷後に畜産関係者が集まる会議等に出席する場合は、長靴の履き替え・消毒及び、作業着の更衣を必ず行ってください。
- 3 作業が終了し事業所等に戻った際は、長靴の履き替え、作業着の更衣を必ず行い、使い終わった長靴、作業着も必ず洗浄(洗濯)、消毒してください。
- 4 さらに、運転席等の足元マットなどについても洗浄、消毒を必ず行ってください。
- 5 家畜運搬車は複数の養豚農場に立ち入らないようにしてください。

**PED対策は養豚農場のみならず、全ての養豚関係者が一丸となった対策の徹底が重要です!
皆様の御協力をお願いします!**

問い合わせ先

○神奈川県 環境農政局 農政部 畜産課 安全管理グループ
電話 045-210-4518 ファクス 045-210-8850

○神奈川県 県中央畜産保健衛生所
電話 046-238-9111 ファクス 046-238-9124

○神奈川県 湘南畜産保健衛生所
電話 0463-58-0152 ファクス 0463-58-5679

図5 と畜場利用者に向けたリーフレット

(1) KMCにおける消毒等強化

KMCでは、家畜運搬者は場内に設けられた消毒設備を用いて、単に車両の洗浄や消毒等を実施していた。しかし、今般のPED流行以後は、施設管理者の指示により、家畜運搬車両は搬入出入口から車両洗浄場へ向かう際の進行方向を一方向に定め、家畜積載車両と消毒済み車両が交差しないよう工夫された。また、搬入出入口の車両消毒ゲートは、消毒噴霧時間の延長と水圧の上昇、車両洗浄場では、動力噴霧器の増設と消毒専用場所が確保され、洗浄・消毒が徹底された。さらに、精肉業者専用の出入口においても、消毒槽を用いて消毒の徹底が励行された（図6）。

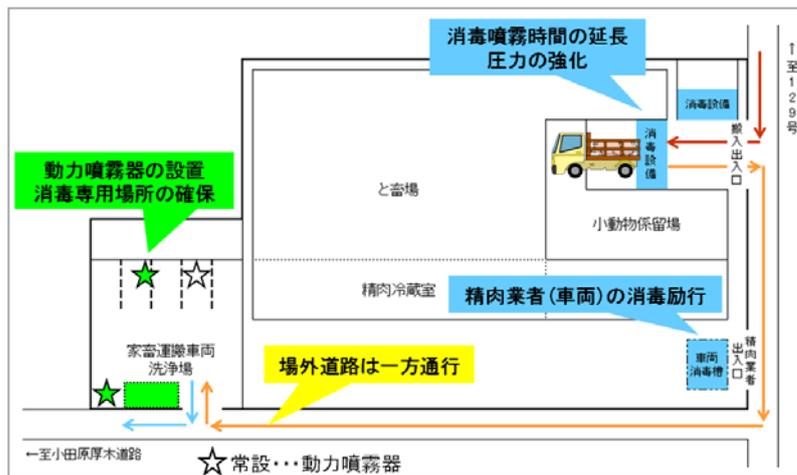


図6 KMCにおける消毒等強化の状況

(2) 横浜市と畜場における消毒等強化

横浜市と畜場では、家畜運搬者は場内の消毒設備等を用いて、単に車両の洗浄や消毒等を実施していた。しかし、今般のPED流行後は、施設管理者の指示により、と畜場出入口に消毒マットの設置、車両洗浄場に移動式動力噴霧器や肩掛け噴霧器等の増設、車両消毒用ゲートの出口側に消毒スイッチが増設された。車両消毒用ゲートでは、自ら消毒噴霧時間の延長が可能になったことから、ロング車両でも余裕をもって消毒できるようになった。さらに、係留施設では、市衛生部局の協力により、発生農場と未発生農場で搬入時間や搬入レーンの区分使用がなされ、交差汚染防止対策が実施された（図7）。

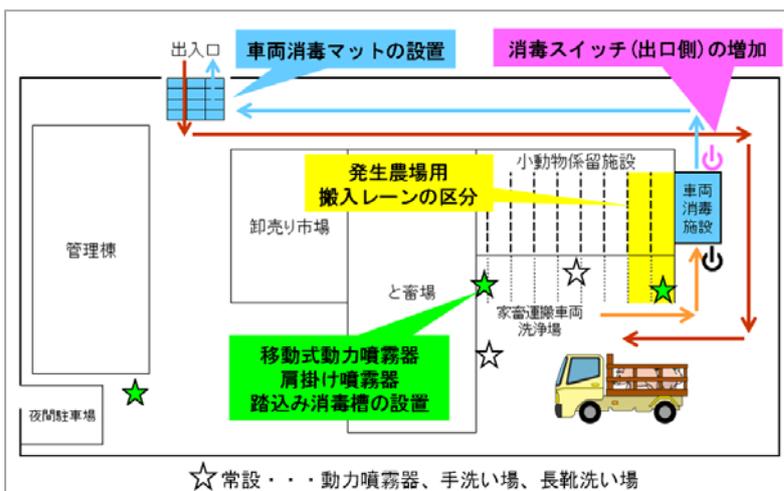


図7 横浜市と畜場における消毒等強化の状況

3 発生地域における自衛防疫対策の強化

発生地域には、共同の堆肥化処理施設（以下、共同堆肥舎）を利用する養豚場が6戸あり、この地域の生産者団体は、日頃より当所職員を講師とした衛生勉強会や疾病の発生情報等を共有し、自衛防疫対策に取り組んでいる。

地域内の農場でPEDが発生した際は、生産者から家保へ早期に通報がなされたと同時に、周辺農場にも情報を共有した。発生直後から生産者、堆肥生産組合員、市・農協、家畜運搬者及び当所により、地域の養豚関係者全員が一体となり周辺農場や周辺地域へのまん延防止と発生農場の早期沈静化を目指すため、防疫対策の協議を行った（図8）。協議内容は、①共同堆肥舎に動力噴霧器を設置し、車両等の消毒を徹底すること、②各農場入口に石灰帯等による消毒ゾーンを設置し、畜舎内の消毒を徹底すること。③共通のトラックや人は往来を制限すること、④発生農場の生糞は、十分な安全性が確認されるまで、移動を自粛し、農場内で十分な堆肥化を実施することの4つの取り決めを行い、地域一体となった自衛防疫対策の強化を図った。

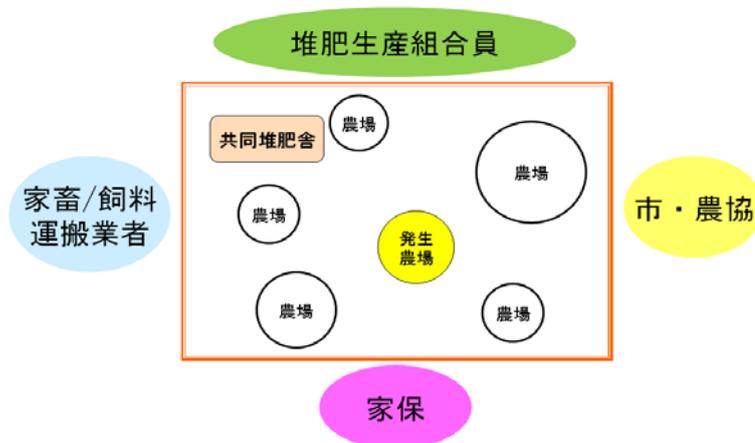


図8 発生地域における自衛防疫対策の協議

まとめ

当所では、PEDが全国的に流行する以前より、生産者、家畜運搬者及びと畜場等の養豚関係者が一丸となり、複数層で防疫対策を徹底し、本県へのウイルス侵入防止に努めてきた。しかし、関東地域での流行ピーク時に、管内において発生が認められた。発生地域では、発生農場における防疫対策だけでなく、周辺農場や共同堆肥舎を含め地域一体となった自衛防疫対策の強化を図ったことにより、感染の拡大は認められず、一例で終息した。

全国では新たな発生や再発が相次いで報告されているが、本県における発生は一例に留まった。これは、各々の養豚関係者が防疫対策の重要性を認識し、かつ、一丸となった防疫対策を継続して実施してきたことが、新たな発生を防いでいるためと考えられる（図9）。

最後に、養豚業界は日頃より様々な疾病対策に追われている。今回構築された総合的な防疫体制は、PED対策に限らず、口蹄疫などの重要疾病から慢性疾病対策にも幅広く有用であることから、引き

続き関係者一体となって、さらに強化・推進を図っていききたい。

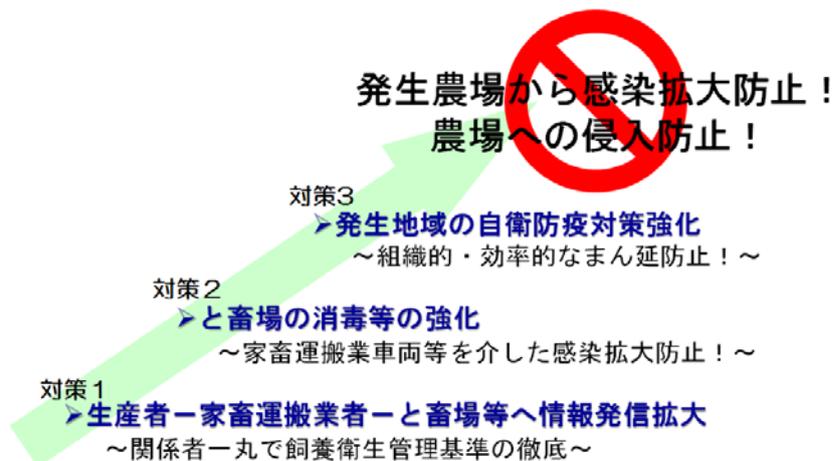


図9 総合的な防疫体制の構築

参考文献

- 1) 神奈川県食肉衛生検査所：平成25年度事業概要
- 2) 農林水産省：豚流行性下痢（PED）の疫学調査に係る中間取りまとめ、平成26年10月24日
- 3) 横浜市食肉衛生検査所：平成25年度事業年報

管内馬飼養施設にかかる防疫対応の現状と今後の課題

県央家畜保健衛生所

岩田 啓 竹前 愛子
津田 彩子 仲澤 浩江
篠崎 隆 和泉谷 公一
吉田 昌司

はじめに

平成 26 年 2 月、馬防疫検討会で国内の馬伝染性貧血(以下、E I A)清浄度が評価され、今後の監視体制のあり方について検討した結果、個体レベルから群単位でのサーベイランス体制に移行しても、E I A の感染拡大リスクは低いとの報告がなされた。このことから本県では、平成 27 年度以降の E I A 検査を変更することとなった。その概要及び管内馬の防疫対応の変更、さらに変更に伴う課題と対応について報告する。

現行の馬防疫対応

1 管内の馬飼養状況

県央家保は、県北東部を管轄しており、その中で馬飼養施設は北部相模原市から南部三浦市まで 61 戸 1,310 頭(平成 26 年 2 月 1 日現在)を飼養している。その内訳は乗馬クラブ(43%)、大学馬術部(7%)、競馬場(2%)と馬の移動が頻繁に行われる飼養施設が約半数を、個人の愛玩目的飼養施設が 2 割を占めている。その他に幼稚園・高校・大学などの学校や動物園、ふれあい施設が飼養している(図 1)。

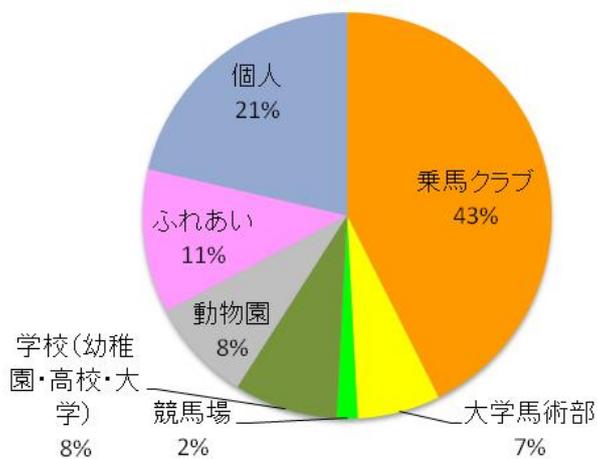


図 1 当所管内における馬の飼養目的別戸数割合

2 現状の馬防疫対応

(1) E I A検査体制

家畜伝染病予防法(以下、法)第5条第1項、法施行規則第9条のほか、軽種馬防疫協議会からの通知である「競馬場及び調教場の入きゅう条件について」「交流競走出走馬に係る防疫措置について」、さらに県告示を根拠とし、競走馬・乗用馬が多い本県の対応として、E I Aの精密検査を年1回実施している。ただし、他の馬飼養施設の馬と交流がなく、不特定の人と触れ合うことのない愛玩馬等については5年に1回の精密検査を実施しており、毎年の臨床検査を実施している。精密検査は毎年、約1,200から1,300頭を実施している。

(2) 着地検査体制

家畜防疫対策要綱の別記7に基づき、輸入検疫を終了した日から3ヶ月間仕向先の飼養施設で実施している。導入時及び終了時を含め月に1回程度、個体確認を含めた臨床観察を3回実施している。さらに県告示中の「その他家畜保健衛生所長が必要と認めた馬」として、法第5条検査で予定した以外のE I A検査(以下、臨時検査)を着地検査期間中の2回目に合わせ1度実施している。平成20年度から毎年約20頭前後、累計で125頭(平成26年12月現在)の輸入馬が仕向けられており仕出国としてはドイツ及びベルギーからの輸入馬が全体の7割以上を占めている。

(3) 馬飼養施設への立入検査体制

法第51条第1項を根拠にE I A精密検査と合わせ、年1回、飼養衛生管理基準の遵守状況を確認している。また、精密検査を5年に1回実施している愛玩飼養等についても同様に年1回の立入検査を実施している。平成25年度の飼養衛生管理の遵守状況は、「衛生管理区域に立ち入る車両の消毒(65.0%)」、「厩舎に立ち入る者の消毒(69.6%)」、「感染ルート等の早期特定のための記録作成及び保存(73.2%)」について遵守されている割合が低い傾向にあるが、これは乗馬クラブ及び愛玩飼養等の衛生意識がやや低いのが影響しているものと思われる。

E I Aの清浄度評価に係る国等の対応

1 E I A清浄度評価について

平成25年1月及び11月に馬防疫検討会・馬伝染性貧血清浄度評価専門会議が2回開催され、本病の特性ならびにわが国の馬の飼養実態及び検査結果に基づいて、わが国の馬群における疫学状況を評価するとともに、今後の監視体制のあり方について検討した結果、平成26年2月、国内のE I A清浄度が評価された。¹⁾馬防疫検討会とは馬関係疾病の防疫・診断・試験研究等について、意見交

換、調整等を図り、今後の馬防疫対応のより一層の充実と推進を図る目的で設立されたもので、農林水産省、動物衛生研究所、中央競馬会等が構成メンバーとなっている。

(1) 評価概要

①E I Aの主要な感染経路は、人為的な媒介がない場合、アブ等の吸血昆虫による機械的伝播によるものであり、感染馬の同居馬が大量の病原体に暴露される状況は生じにくい。一方、感染馬の同居馬のみならず、昆虫が到達できる周辺の馬群にも伝播のリスクがあるが、馬群同士の距離が離れている場合（200 ヤード以上）、伝播リスクは非常に低い。②法に基づく検査が全国的・一律的に実施されるとともに自衛検査が継続されてきた競走馬や乗用馬などの軽種馬及びばんえい競走用馬の馬群は、E I A 感染馬が存在する可能性は非常に低い。したがって、これらの群では、これまでのような個体レベルのサーベイランス体制から、群単位でのサーベイランス体制に移行しても、E I A の感染拡大リスクは低いことから法第5条の定める検査「5年に1回」の検査体制でも、この馬群におけるE I Aの監視は十分可能である③ばんえい競走用以外の農用、肥育用、愛玩用馬の馬群は、E I A 感染馬が存在する可能性は低いと考えられる。しかしながら、検査実施状況が明らかでなく、軽種馬群と比較すると清浄性を裏付けるデータが十分とは言えないことから、未検査の個体は可能な限り検査することが望ましい。万が一検査が実施されていない馬群に感染馬が存在あるいは導入された場合には、その摘発が困難であることから、馬の移動の際に検査により陰性を確認すべきである。④在来馬群は、一部の馬群において検査が実施されていない個体も存在し、衛生管理や臨床観察なども不十分な点があり、平成23年にE I Aが摘発された御崎馬のように、馬群の中でE I A が維持されている可能性は否定できない。ただし、在来馬は、飼養施設が少数で、飼養地が限定され、他の馬群とは隔離された状態で飼養されていることから、これらの馬群の中の未検査の個体が在来馬以外の他の馬群に移動しない限りは、他の馬群におけるE I A の清浄性に影響するものではないと考えられる。しかし、国内のE I A のリスク低減の観点から、可能な限り全頭検査し清浄性の確認に努めることが望ましい。⑤日本への輸入馬については、輸出国との間で取り決められた本病に関する輸入衛生条件の充足が求められるとともに、一定期間の繋留による輸入検疫が実施されている。直近20年間の輸入検疫における摘発は1頭のみであり、輸入馬を原因とする国内での発生も報告されていないが、本病の発生が認められる国からの輸入も多いことから、わが国の馬群に感染馬が持ち込まれないよう引き続き本病侵入防止に万全を尽くす必要がある。

(2) 軽種馬防疫協議会及び国の対応

軽種馬防疫協議会は、平成26年7月1日付けで「競馬場及び調教場の入きゅう条件について」

を廃止し、「競馬場等の入厩条件及び衛生管理に関する指針」を新たに制定した。この中で、入厩条件からE I Aに関する条件はなくなり、衛生管理に関する指針の中でE I Aについて法に基づく定期的な検査を実施する旨が示された。また、現行の「交流競走出走馬に係る防疫措置について」も変更され、前述の指針を遵守されることが求められている。このことから、同日付で国は「馬伝染性貧血に係る競馬場等の入厩条件の変更について」の通知を発出した。なお、新たな指針を制定した軽種馬防疫協議会とは軽種馬の自衛防疫について、国を含む関係団体が一元的に協議等の推進を図り、馬の伝染性疾病の予防及び蔓延の防止を目的として設立されたものである。

平成 27 年度以降の馬防疫対応

1 E I A検査体制について

国の通知を受けて本県での平成 27 年度からのE I A精密検査を変更する予定である。競馬場を除く乗馬クラブ等の馬飼養施設については、法第 5 条第 1 項の他、県告示に基づき、サーベイランスが目的のことから地域分散及びE I A精密検査頭数が同等程度になるように管内地域を 5 分割し 5 年ごとに悉皆検査を実施することとした（図 2）。平成 26 年度の飼養状況を元に推計すると各年 12 戸 150 頭前後になる予定である。競馬場については、年齢を 3, 8, 13 歳に指定して毎年実施する予定である。平成 26 年度検査分を年齢指定で集計すると、3 歳馬がほとんどであり、過去 5 年間から年齢指定し検査した場合の頭数を集計し考慮すると最小で 168 頭、最大で 210 頭であったことから、平成 27 年度以降は 200 頭前後になる見込みである。

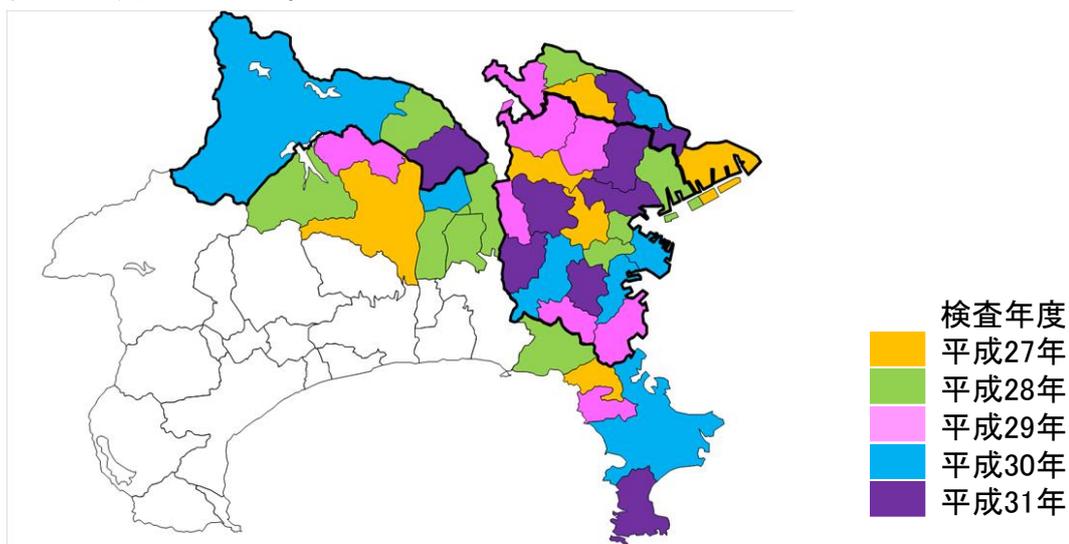


図 2 平成 27 年度以降の E I A 検査地域区分

2 着地検査体制について

O I E ホームページ²⁾のデータによると、本県に仕向きの多い国であるドイツでは 2014 年 12 月にベルギーでは 2013 年 12 月に E I A の発生が続いていることから、着地検査時の臨時検査は現行と変わらず、期間中に 1 度実施することを予定している。

3 馬飼養施設への立入検査体制

乗馬クラブ等は、馬の移動が頻繁であり不特定多数の人の立ち入りが多いことや馬関係者は限られているため各施設の移動が多く、飼養衛生管理が重要である。また、2020 年東京オリンピックに向けて E I A 以外の馬の伝染性疾病に対する衛生意識の向上が必要なことから飼養規模・飼養形態に関わらず、毎年、実施する予定である。

今後の課題及び対応

平成 27 年度から E I A 検査体制が変更になるに伴い、以下の課題及び対応が考えられる。

1 乗馬クラブ等の馬の移動が頻繁にある飼養施設で、E I A 検査年に対象地域に不在時、検査未実施となる馬が存在する可能性

乗馬クラブ等馬の移動が頻繁にある飼養施設では、E I A 検査対象地域にあった場合でも、検査前に退厩し検査対象外地域 や県外に入厩したりする。また、検査対象実施年度以外に戻ることや新たに馬の導入をするなど馬の移動が頻繁で未検査で 5 年以上を経過してしまう馬が存在し確認が困難となることが考えられる。対応として、毎年の馬飼養施設の立入検査時に馬の健康手帳等を確認し名簿を作成する必要がある。また、立入検査時以外の時期の馬の移動を把握するためにも、移動の多い乗馬クラブ等と事前に打ち合わせて入厩や退厩時に連絡をしてもらうように事前調整することも考えられる。馬の移動に伴い、検査依頼に対応するため、臨時検査をその都度受けることは、検査試薬の準備等からも難しいことが考えられるため、月に 1 度の検査体制を設定することで未検査の馬等に対応できると考えられる。

2 2020 年の東京オリンピックに向けて馬の輸入増加が見込まれること、さらに輸入馬の臨時検査対応

オリンピック競技は輸入馬についての参加規定がなく、大会に参加するため、強い馬を輸入しよう

とすることが考えられる。輸入の時期については、動物検疫所に馬が到着してから仕向予定通知が送られてくることから、直前までどの時期に何頭、どの飼養施設に輸入されるかがわからないのが現状である。輸入頭数が増加すると臨時検査の回数も増えることから、業務量及び必要試薬の増加も予想される。対応としては、今までどおり着地検査期間中に伝貧検査を1度実施することを考えれば、月1度の検査実施日を設定する検査体制にすれば対応できるものと考えられる。また、着地検査は臨床検査のみとする方法も考えられる。ただし、この場合は中央畜産会及び仕向先と調整は必要だが、健康手帳の入手は輸入業者自身で行ってもらうこと、移動については輸入検疫証明書で対応できるかについて仕向先を通して馬術協会等と調整する必要がある。

まとめ

国内でのE I A清浄度評価に伴い、本県での平成27年度以降のE I A検査が変更になる。ただし、飼養衛生管理基準の巡回は、飼養規模・飼養目的に関わらず、毎年実施する予定である。着地検査を含めた臨時検査については、月1度実施日を設定する検査体制で対応できると考えられる。着地検査について、臨床検査のみとする場合は仕向先、馬関係団体等との調整が必要となる。平成27年度以降、課題はあるが関係各所と調整し、円滑に馬防疫対応が進められるようにする。

引用文献

- 1) 馬防疫検討会事務局：馬防疫検討会馬伝染性貧血清浄度評価専門会議報告書（平成26年2月4日）
- 2) O I Eホームページ（平成27年2月現在）

家畜保健衛生所における検査の信頼性確保にむけて

湘南家畜保健衛生所

田村 みず穂	矢島 真紀子
駒井 圭	中橋 徹
浅川 祐二	松尾 綾子
太田 和彦	稲垣 靖子

はじめに

家保の検査の中には、鳥インフルエンザやヨーネ病等の、社会的・経済的影響の大きい検査が含まれている。食の安全・安心を得るためには生産から消費に至る食品供給の各段階で必要な管理を行うことが国際的な共通認識となっている。このため、家保の検査においても検査結果を担保することが求められており、検査を見える形にすることが必要である。今回、検査の信頼性確保のために多くの検査機関で導入されている、Good Laboratory Practice（以下、GLP）の手法を参考としたシステムづくりを試みた。

GLPの概要

GLPとは、化学物質等の安全性試験に対する業務管理基準のことで、試験検査とその結果の信頼性を確保するためのシステムとして、様々な分野で導入されている。米国で薬害事故の多発をきっかけにFDA（米国食品医薬品局）が取組を始め、昭和56年にOECD（経済協力開発機構）が基準を制定し、これを機に各国で各種のGLPが制定された。

我が国では、まず、医薬品や化学物質等の安全性試験で導入されたが、食品衛生法施行令の一部改正により、平成9年から都道府県等の食品衛生検査施設で、食品等の製品及び収去検査に導入されている。今回、具体的な手法は食品衛生検査施設におけるG

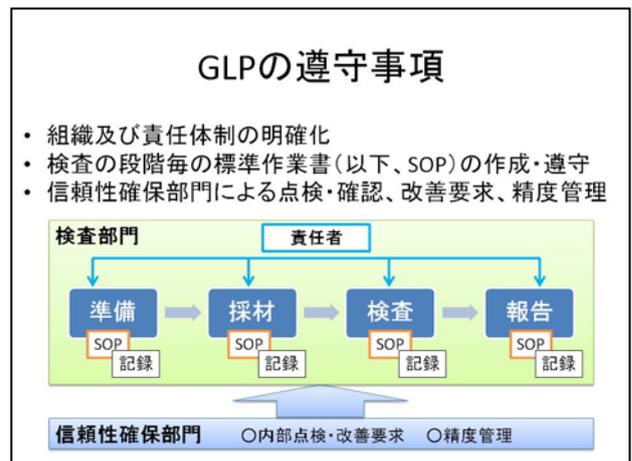


図1 GLP体制

LPを参考とした。

GLPでは、主に次の事項が遵守されている（図1）。組織及び責任体制を明確にすること、検査の段階毎の標準作業書（以下、SOP）を作成して、常にそれに従うこと、信頼性確保部門がこれらの点検・確認を行い、必要に応じて改善要求をすること、また、検査担当者の技能水準を確保し、検査の精度を適正に保つための精度管理を行うことである。つまり、GLPとは検査の各段階をSOPによりマニュアル化し必要事項の記録を残すこと、それらを責任者が管理するとともに、その実施状況を独立した信頼性確保部門が監査をすることで、検査の信頼性を保証するものである。

当所での取組

今回当所では、検査の信頼性確保を目的として、GLPに準拠したシステムづくりを進めた（図2）。具体的には、所で統一の基準を定めること、検査手順をSOPによりマニュアル化しそれを遵守すること、段階ごとに必要な事項を記録し保管すること等で、検査業務の管理を行った。



図2 取組の進め方

1 システムづくりの開始

平成25年6月の所内会議をキックオフとし、取組について所員で認識を共有するとともに、プロジェクトチームを発足した。同月、農林水産省動物検疫所管理指導課で家畜衛生分野における信頼性確保体制について説明を受けた。平成26年1月に食品におけるGLPの実務の具体的内容について知るため、神奈川県食肉衛生検査所で視察・研修を行った。その後は、同年2月の公衆衛生実務者研修、8月の技術検討会でGLPに係る研修に参加し、GLPに対する理解を深めた。

2 検査に係る業務管理要領の策定

平成26年3月に、「湘南家畜保健衛生所における監視伝染病の検査室内の検査に係る業務管理要領（以下、要領）」を策定した（図3）。

(1) 組織と役割

図3のスライドII-①のとおり、当所の組織の中で検査の信頼性確保のための責任者を規定した。所長は運営管理者とし、検査に係る業務の統括を、企画指導課長は企画責任者とし、文書管理や

研修・教育訓練といった検査等の企画業務を、防疫課長は検査責任者とし、SOPの作成やそれに基づく実施状況の確認といった検査等の管理業務を行うこととした。

(2) SOPの作成・管理

SOPとは、検査の準備から報告に至るまで、各段階の詳細な作業手順を示した文書を指す。要領では、機械器具保守管理SOP、試薬等管理SOP、検体等取扱いSOP、検査実施SOPを定めた。それぞれのSOPは図3のスライドII-②のとおり、検査の準備、検体処理、検査、報告の各段階において図示した箇所を使用することを想定した。

(3) 検査結果の取り扱い

図3のスライドII-③のとおり、結果の処理については、血清学的検査の結果を複数人で判定すること、検査責任者が記録の確認を行い、運営管理者へ報告すること等を定めた。データの作成については、容易に消すことのできない方法で記録すること、修正時は前の記述が判別できるようにすることを定めた。検体データの保存は、文書で保管・管理することとした。

(4) 研修・教育訓練

図3のスライドII-④のとおり企画責任者が検査の業務管理に必要な研修・教育訓練を企画・実施することとした。

<h3>II 要領の策定</h3> <p>「湘南家畜保健衛生所における監視伝染病の検査室内の検査に係る業務管理要領」(H26.3策定)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1 目的 2 用語の定義 3 組織 4 運営管理者 5 企画責任者 6 検査責任者 7 検査室の管理 8 機械器具の管理 9 試薬等の管理 10 検査材料の取り扱いの管理 11 検査の操作等の管理 12 検査結果の処理 13 データの作成 14 検体データ等の保存 15 研修・教育訓練 16 検査業務管理会議 <p>①組織と役割</p> <p>②SOPの作成・管理</p> <p>③検査結果の取扱い</p> <p>④研修・教育訓練</p>	<h3>II-① 組織と役割</h3> <p>(要領目次3-7)</p>																														
<h3>II-② SOPの作成・管理</h3> <p>(要領目次8-11)</p> <p>SOPとは 検査の準備から報告に至るまで、 各段階の詳細な作業手順を示した文書</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>要領目次</th> <th>SOPの種類</th> <th>準備</th> <th>検体処理</th> <th>検査</th> <th>報告</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>8</td> <td>機械器具保守管理SOP</td> <td>☑</td> <td></td> <td>☑</td> <td></td> </tr> <tr> <td>9</td> <td>試薬等管理SOP</td> <td>☑</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>検体等取扱いSOP</td> <td></td> <td>☑</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>11</td> <td>検査実施SOP</td> <td></td> <td></td> <td>☑</td> <td>☑</td> </tr> </tbody> </table>	要領目次	SOPの種類	準備	検体処理	検査	報告	8	機械器具保守管理SOP	☑		☑		9	試薬等管理SOP	☑				10	検体等取扱いSOP		☑			11	検査実施SOP			☑	☑	<h3>II-③ 検査結果の取扱い</h3> <p>(要領目次12-14)</p> <p>結果の処理 → データの作成 → 検体データの保存</p> <ul style="list-style-type: none"> ・複数人で判定 ・検査責任者の確認 ・運営管理者への報告 ・消せない方法で記録 ・修正時は見え消し ・文書で保管・管理 <h3>II-④ 研修・教育訓練</h3> <p>(要領目次15)</p> <p>企画責任者が 検査の業務管理に必要な研修・教育訓練を企画・実施</p>
要領目次	SOPの種類	準備	検体処理	検査	報告																										
8	機械器具保守管理SOP	☑		☑																											
9	試薬等管理SOP	☑																													
10	検体等取扱いSOP		☑																												
11	検査実施SOP			☑	☑																										

3 SOPの整備

図3 検査に係る業務管理要領

平成26年4月からELISA検査に係る

SOPを順次整備した(図4)。

SOPは、検査責任者が作成し運営管理者が承認した後、管理番号をつけて施行した。

本文で方法を定めると同時に、種類ごとの記録様式を定め、記録状況は検査責任者が確認することとした。このとき、無理なく続けられるよう、既存の作業書や様式を活かすよう

ところがけた。また、写しは使用者に周知されい つでも利用できるよう、使用場所に保管した。



図4 ELISA検査に係るSOPの整備

4 運用

平成26年11月から当所で実施しているELISA検査のうち、ヨーネ病の予備的抗体検出法(以下、スクリーニング法)による検査で運用を開始した。以下はその一例である(図5)。

(1) 準備段階

冷蔵庫の管理は、図5のスライドIV-①のとおり、冷蔵庫保守管理SOPに従って実施した。管理担当者が1日1回以上、日常点検基準に基づき点検し、日常点検票に記録した。検査責任者による確認は、月1回実施した。

(2) 検査

図5のスライドIV-②のとおり、ヨーネ病スクリーニング法実施SOPに従い、検査担当者がスクリーニングキットの操作項目が記載された検査実施記録票を基に、操作のチェックや時刻、試薬の調整割合や量を記録した。同時に検査時に使用するインキュベータやELISA機械器具の日常点検も実施した。

(3) 報告

検査結果を報告する時は、図5のスライドIV-③のとおり、ヨーネ病スクリーニング法実施SOPに従い検査担当者が検査終了後にデータ等を添えた記録票を検査責任者に提出し、検査責任者が適正に検査が行われているか内容を確認した。

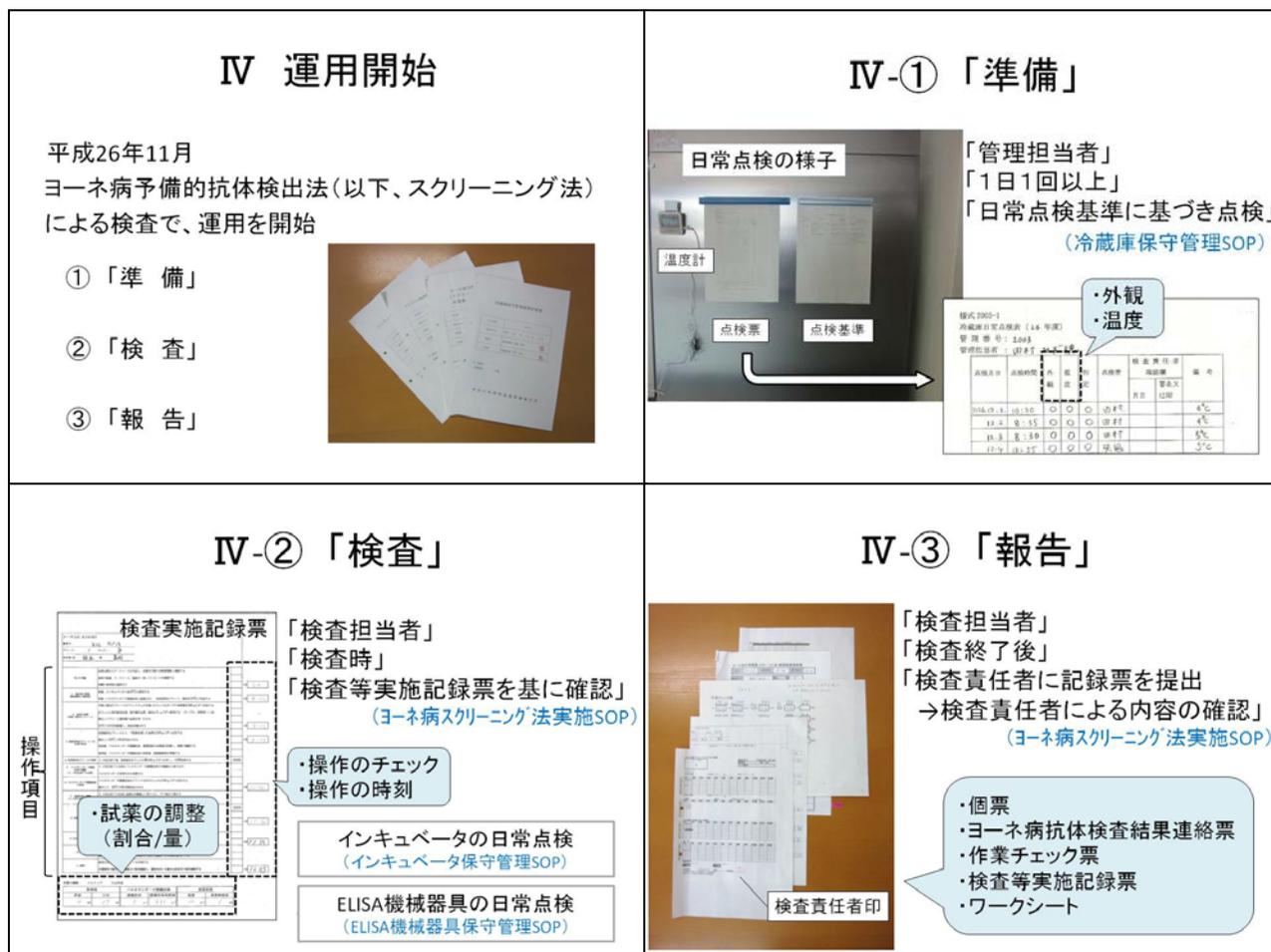


図5 ヨーネ病スクリーニング法での運用例

まとめ

平成25年4月に家保の検査の信頼性を確保するため、GLPに準拠したシステムづくりを開始した。平成26年3月に要領を策定し、所で統一の基準を定め、同年4月にELISA検査におけるSOPの整備を開始し、検査手順をマニュアル化した。11月にヨーネ病スクリーニング法による検査での運用を始め、SOPに基づく管理を行った。

取組で次のような成果が得られた（図6）。ま

ず、GLPに準拠したシステムづくりについて所員の同意を得たことで、所内で意識を共有化ができ

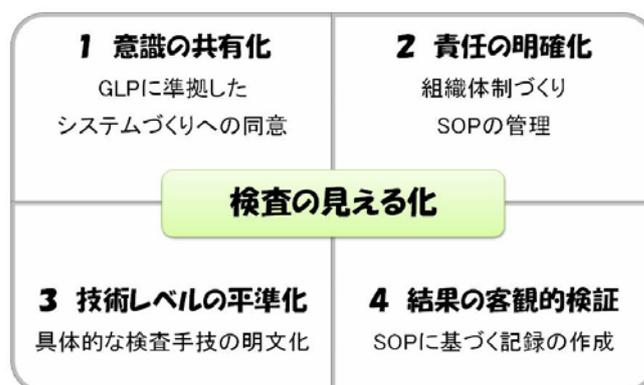


図6 取組の成果

た。次に、組織体制を決め、責任者がSOPを管理することで、責任を明確化することができた。さらに、検査実施SOPにより具体的な検査手技を示したことで、技術レベルの平準化が図られた。また、SOPに基づく様式に記録を残したことで、結果を客観的に検証することが可能になった。全体として、検査を個々が把握する状況から、組織が管理する体制へと移行させ、検査を見える化できた。

今後の課題と対応

今年度は、家保で実施している検査のうちヨーネ病のスクリーニング検査から運用を開始している。今後は、検査の難しさや社会に与える影響を考慮して、優先度の高い検査からGLPに準拠した管理を導入していく予定である。さらに現在は検査を点検・確認する信頼性確保部門を要領に設定していないが、家保が可能な方法で、SOPに基づき検査が適正に実施されているか内部点検を実施する等の要領の見直しを検討している。信頼性確保は時間がかかる取り組みで、GLP自体は10年で1人前と言われている。当所は現在、スタートを切ったところであり、システムのPDCAサイクルを回しながら検査の信頼性を維持・向上させたいと考えている。

謝辞

稿を終えるにあたり、本取組を進める上で、ご助言・ご指導いただいた農林水産省動物検疫所及び神奈川県食肉衛生検査所の職員の皆様に深謝します。

参考文献

- 1) 神奈川県衛生研究所：衛研NEWS、No.120（2007）
- 2) 平成20年7月9日付食安監発第0709004号 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知
- 3) 動物検疫所：動検時報Vol.40-2 p6-7,42-2 p8-9,45-2 p7-8（2007、2009、2012）

タブレット型端末を活用した獣医事指導業務のスマート化

県央家畜保健衛生所

田中 嘉州 荒井 眞弓
横澤 ころろ 阿部 美樹
和泉屋 公一 吉田 昌司

はじめに

家畜保健衛生所（以下、家保）では、獣医療法第8条等に基づき、飼育動物診療施設（以下、診療施設）に立入し、構造設備等を確認している。従来は立入の際、開設者から届出された書類を複写（以下、重要情報）し、これを持ち出して立入を実施していた。今般、平成26年6月12日に本県の「電子化全開宣言行動計画」に基づく「スマート県庁大作戦」の一環として、タブレット型端末（以下、タブレット）が配備されたことを受け、立入業務にタブレットを活用し、複写枚数の削減、重要情報を紛失する等の恐れをなくすことができた。また、平成19年度に作成した、診療施設の届出事務や問い合わせ業務に対応したデータベース「獣 easy 君」²⁾については、届出要件以外の施設情報も記録できるようにした。さらに「獣 easy 君」を平成23年度より県下統一のシステムとして活用することになったことから、担当者の意見を反映して改良し、立入時の指導記録等の機能追加も検討しているので、その概要を報告する。

業務の概要および実績

神奈川県内の診療施設数は、近年微増で推移しており、総数は東京都に次いで全国で2番目に多く、このうち当所管内の診療施設数は県全体の約8割を占めている¹⁾（図1）。

獣医事指導業務は、開設届等の受理業務、診療施設への立入業務および県民等からの問い合わせ業務の三つからなっている。受理業務については、開設届、廃止届、変更届、休止届および再開届を受理し、開設届済証明書等の発行を行っているが、平成23年度からの実績は、年間300～400件で推移している¹⁾（図2）。立入業務では、主に診療施設およびエックス線診療室に対する法的な基準の確認や、エックス線診療に係る台帳等の記録状況等を確認している。平成23年度からの実績は、年間

100～200 件と若干増減が激しいが、一定期間内に巡回できるように計画的に実施している²⁾ (図3)。また、問い合わせ業務では、主に開設者等からの開設および変更に関する相談、医薬品および動物用医薬品販売業者等からの取引診療施設の開設届内容の確認電話が多く寄せられており、平成23年度からの実績は、年間200～400件となっている²⁾ (図4)。

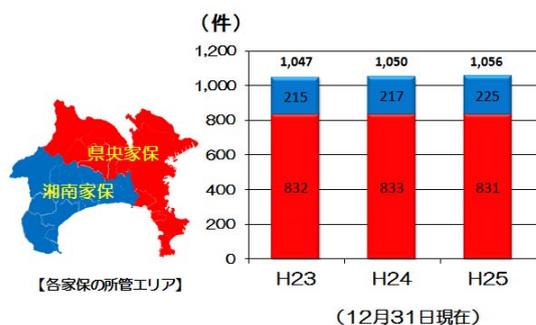


図1 県内の飼育動物診療施設数



図2 開設届等の受理発行業務の実績

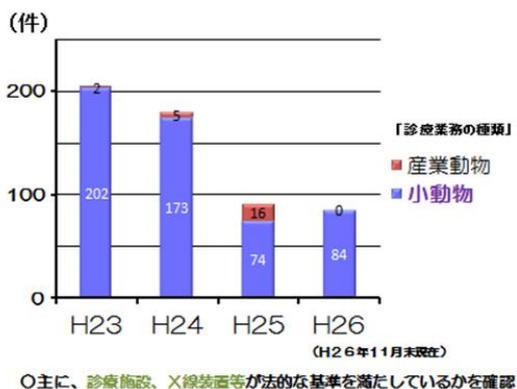


図3 診療施設への立入業務の実績

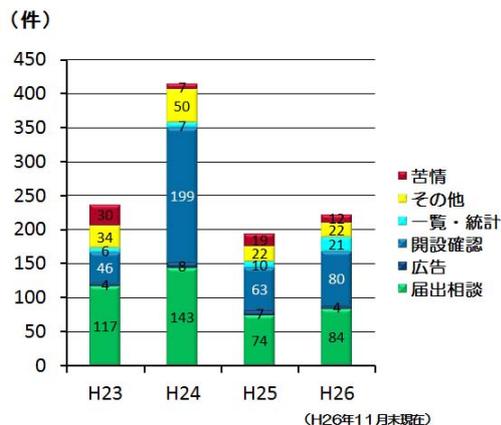


図4 問い合わせ業務等の実績

獣医事指導業務のスマート化

1 従来の重要情報の取扱い

従来、当家保では重要情報を複写したものを持ち出し、診療施設の立入に携帯していた。重要情報を持ち出す職員は細心の注意を払うことは当然であるが、紛失するリスクはゼロではないため、対策として①必要な頁の複写、②持ち出し簿の作成、③携帯カバンの管理徹底、④帰庁後の書類枚

数の確認、⑤シュレッダーによる破棄と手順をルール化し、重要情報の管理に時間とコストを掛けていた（図5）。

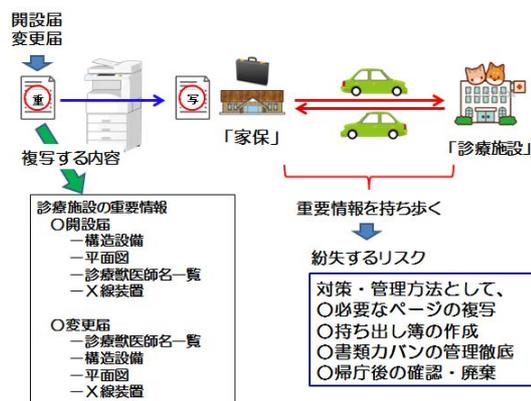


図5 重要情報の取扱い（従来）

2 スマート県庁大作戦

神奈川県では平成26年3月に電子化全開宣言行動計画を策定し、この行動計画を推進するため、県の業務を効率化し職員の生産性を高める「スマート県庁大作戦」の実施を6月11日に記者発表した。これにより、県の専用サーバにアクセス可能なタブレットが当家保にも数台配備され、これを獣医事指導業務に活用した。

3 タブレット導入後の重要情報の取扱い

タブレットの導入により重要情報の取扱いも大きく変わった。従来の複写に替わり、重要情報をタブレット内のアプリケーション（以下、アプリ）で撮影し、画像に加工した。画像に加工した重要情報はタブレット内に残さず、タブレット専用のサーバに事前にアップロードした。こうすることで、当日は重要情報の入っていないタブレットを持って移動することが可能となった。重要情報は、立入検査直前にサーバからダウンロードし、立入検査終了後、タブレット内から消去した。タブレットと専用サーバの活用により、重要情報の管理がスマートになり、紛失する危険性は限りなくゼロになった（図6）。

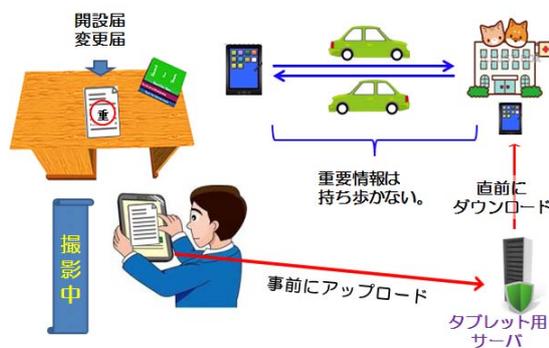


図6 重要情報の取扱い（タブレット導入後）

4 タブレットの活用事例

獣医事指導業務におけるタブレットの活用事例をまとめると、①重要情報の電子画像化（図7・8）、②法令アプリの利用、③インターネットの活用、④カーナビとしての活用（写真1）である。一つ目の重要情報の電子画像化については、タブレットでは任意の場所を拡大することができるので、特に診療施設の図面において複写よりも利便性が高い。また、複写機で拡大コピーを取るのには設定等で苦慮することもあるが、タブレットで一部分撮影することは簡単である。二つ目の法令アプリの利用では、法令を閲覧できるアプリが標準で搭載されているので「獣医畜産六法」を携帯したり、法令の抜粋集を作成したり必要がなくなった。三つ目のインターネットの活用では、当家保のホームページから届出様式のダウンロードの方法を提示したり、農林水産省のホームページに掲載されている獣医師免許証の再交付等の案内を紹介したりすることができるようになった。この他に、以前は立入の際、診療施設への道順を調べて庁用自動車の助手席に座った職員が道案内をしていたが、タブレット内のカーナビ機能がある地図アプリを活用することで、事前に道順を調べる必要もなくなり、移動中も安心して運転ができるようになった。

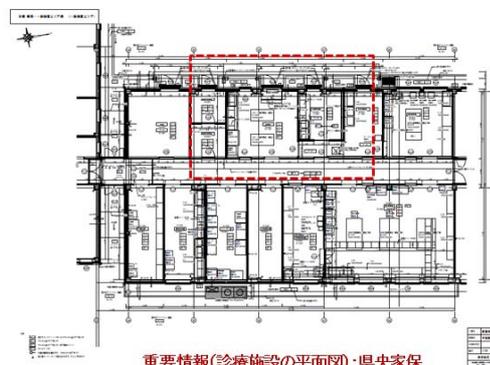


図7 施設平面図

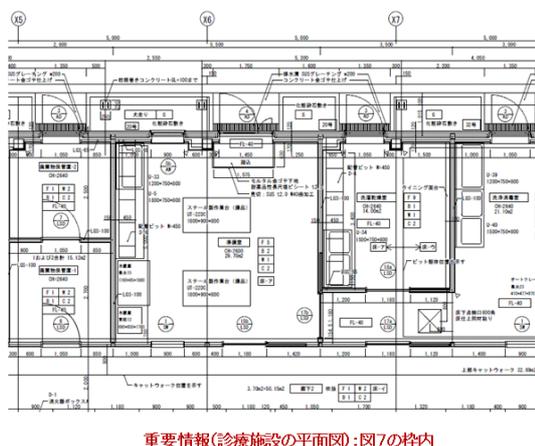


図8 施設平面図の一部拡大



写真1 カーナビとしての利用

5 タブレットのセキュリティ

タブレットのセキュリティは次のようになっている。電源スイッチは、端末ロックとも呼ばれ、これを押して電源がオンとなったときは、パスワードの入力を要求される。このとき、適切なパスワードを入力するとタブレット内の標準的なアプリを使用できるようになる。立入の際、タブレット専用サーバから重要情報をダウンロードするには、上記以外に職員のユーザー名、パスワードおよびタブレット専用IDの入力を専用アプリで行い、認証された場合のみデータの送受信が可能となる。

なお、タブレットを紛失した場合は県庁所管課でタブレット内のデータの全消去、県のネットワークに接続できないように設定の変更、通信電波の停止が直ぐに行えるようになっている。

6 複写枚数の削減

タブレットを活用することにより、立入業務に係る重要情報の複写の必要がなくなったことにより、紙をどれだけ削減できたか検証した。過去の複写枚数については記録が残っていなかったため、一診療施設当たり平均7枚の重要情報を複写したものとして算出した(図9)。

平成23年度と平成24年度は立入実績も多かったため1,000枚以上、また平成25年度でも

600枚以上複写をしていたと推計された。平成26年度は6月12日のタブレット配備までに7診療施設を立入していたため49枚と算出、配備以降の複写枚数はゼロとなった。削減できた金額は、用紙代が1枚当たり約0.5572円、複写代が1枚当たり約0.7245円で契約しているため、平成23年度の複写枚数で約1,830円、平成25年度の複写枚数で807円と算出した。

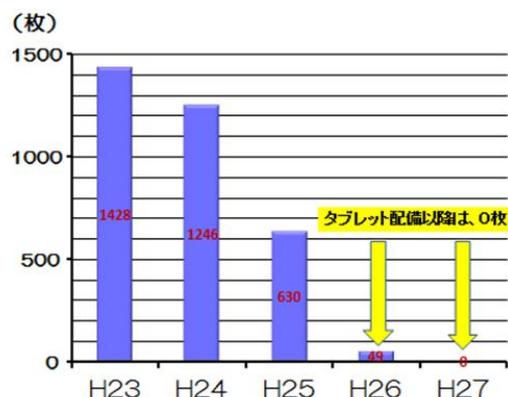


図9 複写中止による削減効果

獣医事指導業務の改善

1 「獣easy君」の概要

「獣easy君」は、マイクロソフト社のアクセスおよびワードを使用した開設届等の獣医事受理業務用のデータベースシステムであり、平成19年度に横浜市、川崎市および三浦半島地域を所管して

いた東部家保の獣医事受理業務の効率化を目的に作成され、平成21年度の組織再編により広域化された県央家保の獣医事受理業務においても活用されてきた。平成23年度からは、湘南家保の獣医事受理業務においても活用され、現在は県下統一のシステムとなっている。

2 獣医事担当者からの意見

「獣easy君」が県下統一のシステムとして稼働していることから、両家保の獣医事担当者から意見を聴取したところ、次のような要望・意見が寄せられた。データの追加希望として、①診療施設毎の定休日、営業時間、駐車場の有無等の情報、②立入業務を行ったときの指導記録、③エックス線装置の機種名および型式等の三項目が寄せられた。機能の追加希望として、④診療施設の抽出および集計機能、⑤第4号様式どおりに診療施設の一覧を印刷できる機能、⑥データベースの自動バックアップ機能、⑦収受簿との連動機能の四項目が寄せられた。また、その他の要望として、⑧使用していない項目の削除、⑨使用できなくなったリンクの修正、⑩マニュアルの改訂の三項目が寄せられた。

3 「獣easy君」の改良

上記の要望の一部について改良を行った。一つ目に、診療施設毎に定休日、駐車場の有無と駐車台数および営業時間等を入力できる欄を追加した(図10)。これらの情報は、立入業務を効率的に実施するために必要なものだが、計画上6年毎に巡回しているた

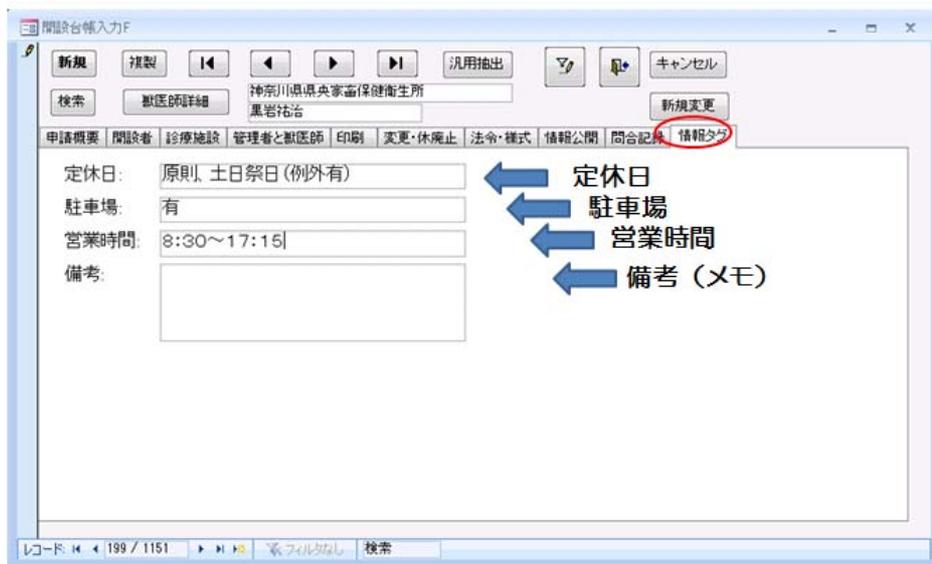


図10 獣easy君の改良1

め、次の担当者に引き継ぐことが難しかったものであった。今年度から入力している情報を活用し、今後は効率的に立入業務が実施できるものと期待される。

二つ目に、集計機能と抽出機能を追加した。これは、「汎用抽出」というフリーソフトを「獣easy君」のアドインとして登録することで実現した。これにより条件にあった診療施設の抽出および数値の集計が簡単にできるようになった（図11）。

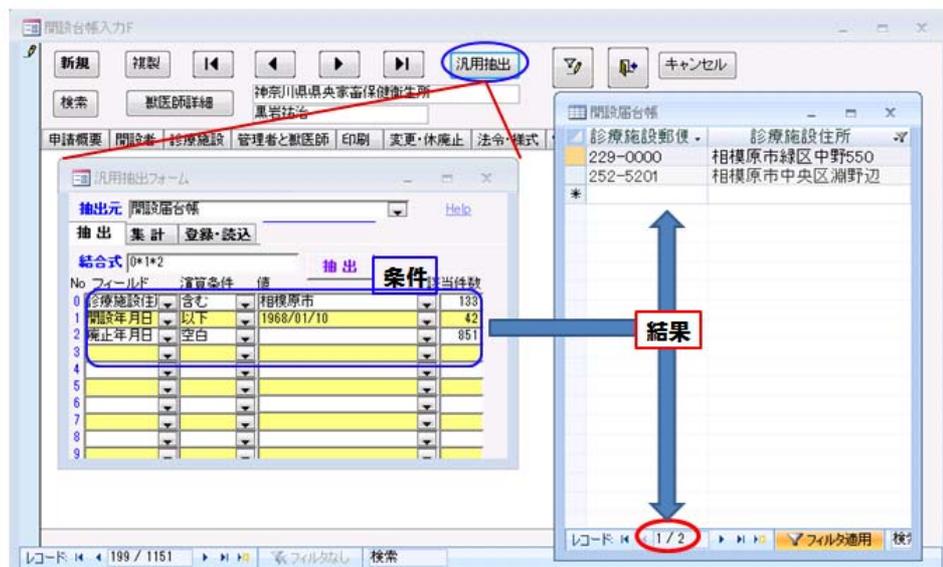


図11 獣easy君の改良2

まとめ

タブレットを立入業務に活用することで重要情報の管理がスマートになった。重要情報の複写を中止したことで、紙の削減が図られた。複写に係る経費は用紙代および複写経費を合わせても、一千～二千円程度の経費削減効果しかなかったが、持ち帰った重要情報をシュレッダーで廃棄処理する時間の削減、および重要情報を紛失する危険性が限りなくゼロになった効果は金額では計れないものと考えた。また、カーナビとしての活用により診療施設の経路を下調べする時間を削減し、安全運転に専念できる環境となった。立入業務の現場においては、法令、資料およびホームページの提示ができるようになったことから、獣医事指導業務において、タブレットの活用は有効であった。この他、現在の開設届（様式第1号）の中に診療施設への案内図を記載または添付させているが、タブレットの配備によりこの項目は不要になると考えられた。

一方、獣easy君については、診療施設の情報記録できる欄を追加し、データの集計および抽出機能を追加し改良を行ったことで、獣医事指導業務の改善を行うことができた。その他の要望については、獣医事事務要領の改訂が必要な内容を含むため、県庁畜産課と協議しながら改良を行っていく予定である。

今後も、獣医事指導業務の改善とスマート化をタブレットおよび「獣easy君」を活用して、継続的

に実施していきたいと考える。

参考文献

- 1) 阿部 美樹ほか：平成25年度神奈川県家畜保健衛生業績発表会、34～37(2015)
- 2) 田中 嘉州ほか：平成19年度神奈川県家畜保健衛生業績発表会、39～46(2008)

全身に出血を認めた子牛の死亡例

湘南家畜保健衛生所

駒井 圭 森村 裕之
矢島 真紀子 秋本 遼
井上 史 太田 和彦
稲垣 靖子

はじめに

2014年6月、管内酪農家において、19日齢のホルスタイン種子牛が発熱、貧血、血便の症状を呈して死亡した。同日、16日齢の交雑種(F1)子牛が同様の症状を呈し2日後に死亡した。このF1子牛について病性鑑定を実施したので概要を報告する。

発生農場

発生農場は搾乳牛65頭、育成牛30頭、子牛15頭の計110頭を飼養する酪農経営。成牛舎、育成牛舎、乾乳舎、放牧場があり、子牛は成牛舎で飼育されている。近年、後継牛は全て自家産で、預託歴、導入歴はない。ワクチンは共進会出品牛のみ6種混合ワクチン(弱毒牛伝染性鼻気管炎ウイルス・弱毒牛パラインフルエンザ3型ウイルス・弱毒牛RSウイルス・弱毒牛アデノウイルス7型・不活化牛ウイルス性下痢-粘膜病1型及び2型ウイルス)を接種している。飼料は乾草、配合飼料ともに全て購入し、水は井戸水を使用している。

発生の概要

1 発生経過

発生経過を表1に示す。2014年6月2日、14日齢のホルスタイン種子牛(症例①)が発熱、貧血、血便の症状を呈し、次第に衰弱して7日に死亡した。同日、1頭挟んで係留されていた、16日齢のF1子牛(症例②)が同様の症状を呈し、獣医師により補液、抗生物質(アンピシリン、エンロフロキサシン)等の治療を受けたものの9日に死亡した(図1)。

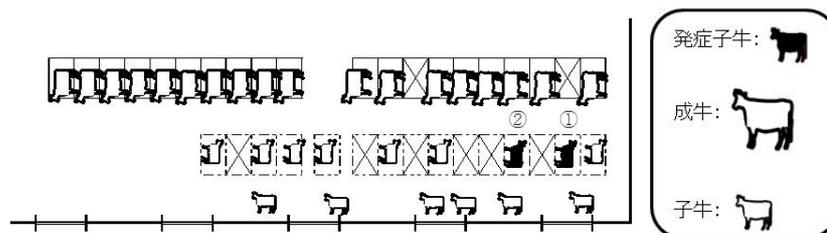


図1 成牛舎配置図

2 検診

農家からの連絡を受け、6月9日検診を実施した。
F1子牛(症例②)は起立不能で横臥し、頻脈、体温は40.5℃、結膜は暗赤色を呈していた。血液検査結果は、赤血球 $4.6 \times 10^6 / \mu\text{l}$ 、白血球 $1.5 \times 10^3 / \mu\text{l}$ 、Ht 値 15.0%で、いずれも重度に低下していた。糞便検査結果は、虫卵陰性、ロタウイルス陰性、アデノウイルス陰性だった。なお、症例①と②の間に係留されていた1頭には異常を認めず、検診日には移動していた。

表1 発生経過

2014	症例① (ホルスタイン・雄)	症例② (F1・雌)
5/19	正常分娩(初産)	
5/24		正常分娩(初産)
6/2	発症(14日齢) 発熱、貧血、血便、衰弱	
6/7	死亡	発症(16日齢) 発熱、貧血、衰弱
6/8		治療(補液・抗生物質等)
6/9		血便、死亡
6/10		病性鑑定

剖検所見

検診日の夜、当該子牛が死亡したため、翌6月10日に病性鑑定を実施した。外貌上奇形等は認められなかった。鼻腔粘膜、歯茎に出血が認められた。剖検では、全身の皮下、胸腔内壁に出血が認められた(写真1)。肺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、胃、腸管に出血が認められ、血様の心嚢水が貯留していた(写真2)。横隔膜、大網、膀胱、胸腺、リンパ節等に出血が認められた。肺は右前葉に線維素が析出し、左右前葉は肝変化していた(写真3)。肝臓、腎臓は退色していた。大腿骨骨髓は黄色化し、均一な組織構造が失われていた(写真4)。



写真1 (左)背部皮下の出血、(右)胸腔内壁の出血



写真2 消化管・腸間膜リンパ節の出血

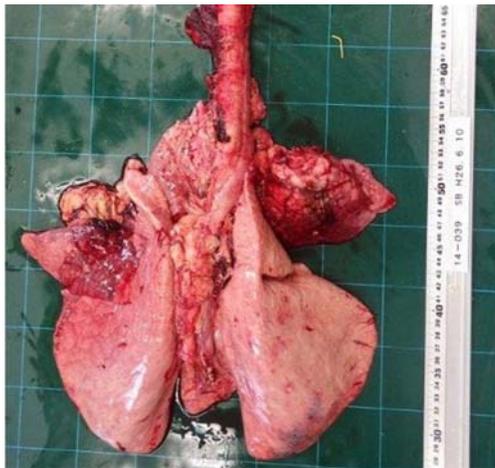


写真3 肺の出血、繊維素析出、肝変化



写真4 大腿骨骨髓(ホルマリン固定後)

検査方法

1 病理組織学的検査

大脳、小脳、脊髄、肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、胃、腸管、大網、膀胱、子宮、浅頸リンパ節、下顎リンパ節、肺門リンパ節、内腸骨下リンパ節、腸間膜リンパ節、胸腺、横隔膜、大腿骨等を10%緩衝ホルマリン液で固定、パラフィン包埋後薄切し、定法に従いHE染色を実施した。

2 ウイルス学的検査

(1) ウイルス分離

MDBK-SY細胞を用いて、脳、肺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、について、5%CO₂、37℃、7日間、4代継代培養し、ウイルス分離を実施した。肺について、牛ウイルス性下痢ウイルス(BVDV)の蛍光抗体法(FA法)を実施した。PCR法を用いて、肺の培養上清についてペスチウイルス遺伝子検索、RFLP(制限酵素Bgl11、Pst1)を実施した。

(2) 遺伝子検査

PCR法を用いて、肺、腎臓、脾臓について牛アデノウイルス遺伝子検索、脳、肺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓についてペスチウイルス遺伝子検索を実施した。

(3) 中和抗体検査

症例②、症例①②の母牛、及び同居牛の血清を用いて、BVDV1・2型の中和抗体検査を実施した。

3 細菌学的検査

肺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、腸間膜リンパ節、体液、十二指腸内容物、回腸内容物についてβ-NAD加羊血液寒天培地を用いて微好気培養、DHL寒天培地を用いて好気培養、卵黄加CW寒天培地を用いて嫌気培養を37℃にて、48時間実施した。分離された大腸菌について、スライド凝集反応を用い血清型別検査、PCR法を用いて大腸菌毒素検査、病原性関連遺伝子解析を実施した。

病性鑑定

1 病理組織学的検査

各臓器の漿膜下並びに被膜下組織、筋組織、結合組織、及び消化管粘膜下織等に出血が認められた(写真5)。肺の左右前葉に線維素性化膿性気管支肺炎が認められた。大腿骨骨髄では、造血細胞が著しく減数し、脂肪細胞に置換されており、骨髄低形成が認められた(写真6)。リンパ組織では、リンパ濾胞構造が消失し、リンパ球は重度から軽度に減数していた。髄質領域を主体としてマクロファージが浸潤していた(写真7)。

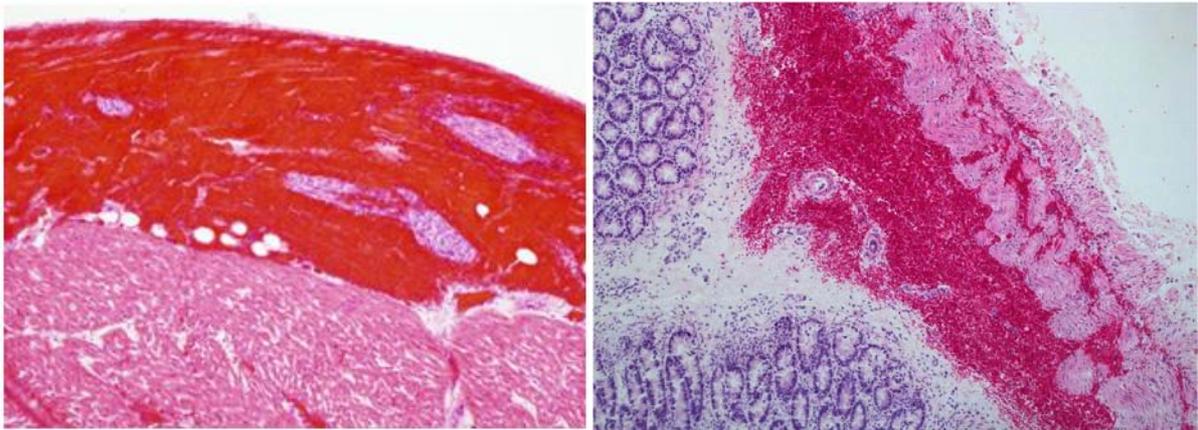


写真5 (左)心外膜下の出血(HE染色、100倍)

(右)十二指腸の粘膜下織・筋層の出血(HE染色、100倍)

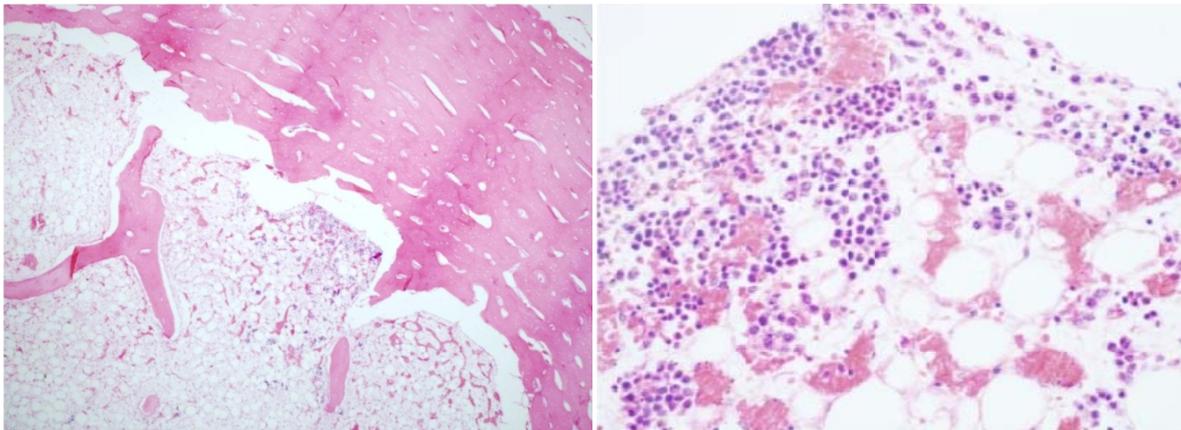


写真6 (左)大腿骨骨髄(HE染色、40倍)

(右)大腿骨骨髄(HE染色、400倍)

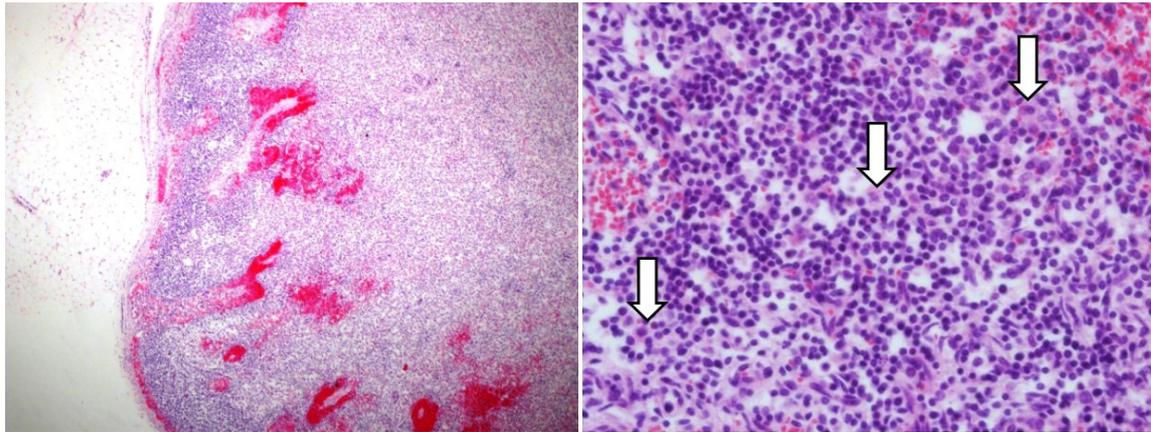


写真7 (左)内腸骨下リンパ節(HE染色、40)

(右)内腸骨下リンパ節(HE染色、400倍、矢印：マクロファージ)

2 ウイルス学的検査

(1) ウイルス分離

肺の4代目培養でCPEを確認し、FA法によりBVDVと同定した。4代目培養上清からペスチウイルス特異遺伝子が検出された。RFLPを実施したところBVDV1型であった。

(2) 遺伝子検査

牛アデノウイルス遺伝子検索、ペスチウイルス遺伝子検索は陰性であった。

(3) 中和抗体検査

血清のBVDV1型・2型の中和抗体価は、症例②、発症前後のそれぞれの母牛、及び同居牛も2倍未満だった(表2)。

表2 BVDV1型・2型の中和抗体価

	2013 7/2	2014 6/9	2014 11/10
症例②		<2	
症例①の母牛	<2		<2
症例②の母牛	<2		<2
同居牛	<2		<2

3 細菌学的検査

肺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、腸間膜リンパ節、体液、十二指腸内容物、回腸内容物から大腸菌が分離された。分離された大腸菌は主なO群血清型と一致せず、毒素検査陰性(ST1, ST2, LT, VT)、病原性遺伝子解析陰性(LT, ST, VT, stx1, stx2, eae, invE, aggR, cdt, conf 2, F17, intA)であった。

考察

本症例は、若齢子牛が起立不能、発熱、貧血を呈し死亡したもので、病性鑑定の結果、全身各臓器の出血と大腿骨骨髓の低形成が認められた。全身の出血に骨髓の低形成が関与していると考えられる。

ウイルス学的検査では、BVDV1型が肺から分離されたが、症例②、発症前後のそれぞれの母牛、及び同居牛のBVDV1型・2型の中和抗体価がいずれも2倍未満だったことから、農場内でのウイルスの蔓延は認められず、本症例への関与の可能性は低いと考えられた。

細菌学的検査では、大腸菌が各臓器から分離されているが、主なO群血清型とは一致せず、毒素検査陰性、病原性関連遺伝子解析陰性であったことから、病原性大腸菌の可能性は低く、組織所見等からも本症例への関与は不明であった。また、発症牛2頭に共通の父系、母系はおらず、遺伝性疾患の可能性は低いと考えられる。

当農場では、飼料は市場に広く流通しているものを用い、井戸水は全ての飼養牛に給与している。また、殺鼠剤は使用しておらず、中毒の可能性も低い。これらのことより、本症例の原因は特定に至らなかった。

若齢の子牛が発熱と出血傾向を呈して死亡する症例は、2007年頃から欧州を中心に報告されている。これらの名称は定まっておらず、BCS (Bleeding Calf Syndrome) やBNP (Bovine Neonatal Pancytopeni) 等と呼ばれ、農場での発生頭数はいずれも1～数頭で、原因は特定されていない⁽⁵⁾⁽⁶⁾。国内でも、2007年に北海道で1例⁽³⁾、2012年に大分県で類似の報告があったが⁽²⁾、原因は不明である。本症例、国内、欧州の症例の症状の比較を表3に示した。本症例は発熱、全身の出血、骨髓低形成、リンパ組織におけるリンパ球の減数といった点で、これらの報告と類似していた。

欧州では原因の一つに特定のメーカーのBVDワクチンの副作用の可能性が報告されているが⁽¹⁾⁽⁴⁾、このワクチンは国内では販売されていない。また、症例①②の母牛ともBVDワクチンは未接種であった。

なお、その後、当該農場では続発や類似の症状を示す牛は認められておらず、原因は不明のままだが、本症例が今後の原因究明の一助となれば幸いである。

表3 類似症例との比較

	神奈川 (2014)	北海道 (2007)	大分 (2012)	欧州 (2007～)
体温(°C)	40.5	40.2	37.2	40.0～41.0
全身の出血	○	○	○	○
骨髓低形成	○	○	×	○
リンパ組織における リンパ球減数	○	—	—	○
血小板(/μ)	NT	13,000	98,000	重篤な減少

—:報告なし

謝辞

病性鑑定にご協力を頂いた、独立法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所の諸先生方に深謝いたします。

引用文献

- 1) Farmers Guardian ホームページ(2011)
- 2) 西田清実ら：平成24年度大分県家畜保健衛生並びに畜産関係業績発表会集録、演題8番(2012)
- 3) 島田飛鳥ら：Journal of Veterinary Medical Science 69(12), 1317-1319(2007)
- 4) 田島誉士：家畜診療、62巻1号、5-10(2015)
- 5) 農林水産省ホームページ(2010)
- 6) 米国農務省(USDA)ホームページ(2009)

豚流行性下痢（PED）の病性鑑定事例

県央家畜保健衛生所

英 俊征 高山 環
山本 英子 荒井 真弓
和泉屋 公一 吉田 昌司

緒 言

豚流行性下痢（Porcine Epidemic Diarrhea、以下、PED）は、水様性下痢を主徴とする届出伝染病である。伝播力が強く、すべての月齢で感染するが、特に若齢豚では症状が重篤化し哺乳豚では高率に死亡する。病原体であるPEDウイルスはコロナウイルス科（*Coronaviridae*）、アルファコロナウイルス属（*Alphacoronavirus*）に属し、エンベロープの表面に放射状に突き出たスパイクをもち、ゲノムはプラス一本鎖RNAである。同じコロナウイルスで類似する症状を示す伝染性胃腸炎（以下、TGE）ウイルスとは血清学的に交差しない^{2),5)}。

近年では、アジア、北米、中米を中心に世界的流行がみられ、我が国では2013年10月に7年ぶりに発生し、その後、流行が続き、2015年2月15日現在で39都道府県、935件、約136万頭もの発症がみられている⁴⁾。本県においても、2014年5月、一貫経営農場1件での発生があり、病性鑑定の概要について報告する。

発生農場の概要と経過

発生農場は、発生時において繁殖豚58頭、肥育豚317頭、離乳豚113頭、哺乳豚105頭を飼養する一貫経営農場で、直近では2013年11月、2014年3月に県内より繁殖雌豚3頭ずつを導入していた。給与飼料は配合飼料とエコフィード（パン）であった。

5月1日、繁殖豚7頭、肥育豚6頭が嘔吐、下痢、食欲低下を示し、翌5月2日には急速な拡大が認められ、繁殖豚23頭（39.7%）、肥育豚229頭（72.2%）、離乳豚43頭（38.1%）、哺乳豚27頭（25.7%）が水様性下痢を呈した。このような状況から、TGEやPEDのような伝播力の強いウイルス性下痢を疑い病性鑑定を実施した。

材料および方法

1 供試材料

発症豚（繁殖豚、肥育豚）の糞便 10 検体と発症中の哺乳豚（0～1 日齢）2 頭を供試した。

2 方法

(1) ウイルス学的検査

ア 分離培養

糞便 10 検体及び哺乳豚の腸内容物について Vero 細胞を用いトリプシン添加 MEM で 5%CO₂、37°C の条件下で 7 日間培養を 4 代継代した。また、哺乳豚の主要臓器 10%乳剤について CPK 細胞を用い 10%FBS 加 MEM で 5%CO₂、37°C の条件下で 7 日間培養を 5 代継代した。

また、併せて扁桃についてはカバースリップによる豚コレラウイルス蛍光抗体法を実施した。

イ RT-PCR

ウイルス遺伝子を検索するため RT-PCR を実施した。

糞便、哺乳豚の腸内容物からスピンカラム法により totalRNA を抽出、精製後、次の 2 つのプライマーを用いて実施した。

1) PEDV P1、P2 ³⁾

ターゲット：PEDウイルスのスパイク蛋白(S)遺伝子

増幅バンド：651bp

2) TGEV 21209、2374R ⁶⁾

ターゲット：TGEウイルスのスパイク蛋白(S)遺伝子

増幅バンド：840bp

増幅は One-Step RT-PCR で行った。逆転写酵素に M-MuLV Reverse Transcriptase、PCR 酵素に Taq DNA polymerase を用い、逆転写 42°C で 20 分、初期変性 95°C で 5 分；変性 94°C で 30 秒、アニーリング 55°C で 1 分、エクステンション 72°C で 1 分を 35 サイクル；最終エクステンション 72°C で 5 分のサーマルサイクリング条件で行った。

(2) 細菌学的検査

哺乳豚の主要臓器について、β-NAD 加めん羊血液寒天培地を用いた 37°C、48 時間の好気、微

好気培養および DHL 寒天培地を用いた 37℃、48 時間の好気培養を行った。

(3) 病理組織学的検査

哺乳豚の主要臓器、空腸、回腸、大腸、脳、脊髄および扁桃を 10%中性緩衝ホルマリン固定し、パラフィン包埋、薄切後、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色にて観察した。

また、空腸、回腸について一次抗体に抗 PED ウイルス家兔血清を用いた免疫組織化学的染色（IHC）を実施した。方法はストレプトアビジン・ビオチン（SAB）法により抗原賦活化に Actinase E、発色基質に DAB、対比染色にヘマトキシリンを用いた。

結 果

1 糞便性状および剖検所見

供試した糞便は水様性から泥状を示し、一部には固形状のものもみられた。

哺乳豚は衰弱し、肛門周辺が下痢で汚れていた（図 1a、1b）。剖検では小腸の菲薄化や未消化凝固乳による胃の膨満がみられた（図 2a、2b）。



図 1a 病性鑑定豚 1



図 1b 病性鑑定豚 2



図 2a 小腸壁の菲薄化



図 2b 未消化凝乳による胃の膨満

2 病原検索成績

ウイルス学的検査ではウイルスは分離されず、併せて実施した豚コレラ蛍光抗体法も陰性であった。

RT-PCR では糞便 10 検体中 8 検体と腸内容物 2 検体から 651bp の PED ウイルス特異遺伝子が検出された (図 3)。TGE ウイルス特異遺伝子は検出されなかった。

細菌学的検査では有意菌は分離されなかった。

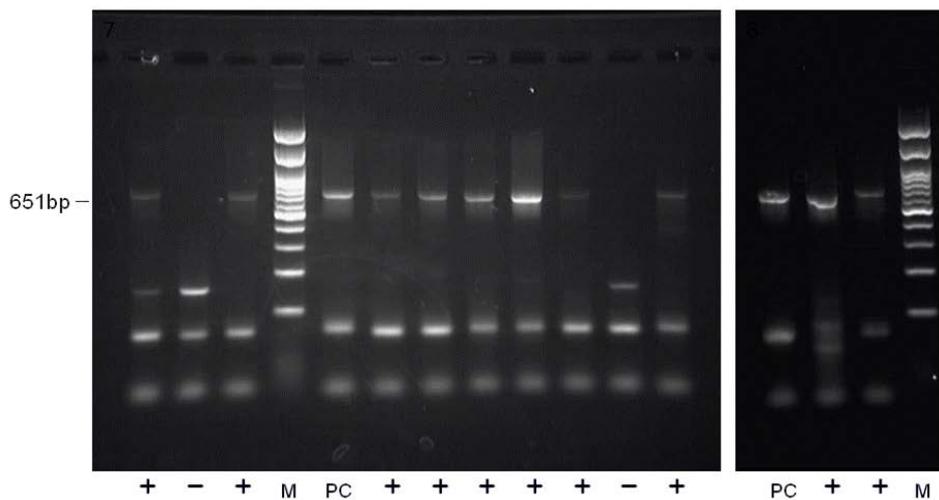


図 3 PED ウイルス RT-PCR アガロース電気泳動像 (左. 糞便、右. 腸内容)

3 病理組織学的検査成績

HE 染色では、2 頭ともに空腸および回腸で腸絨毛の萎縮や粘膜上皮細胞の扁平化、一部では空胞形成が認められた（図 4a、4b）。その他の臓器に著変は認められなかった。

抗 PED ウイルス家兔血清を用いた免疫組織化学的染色（IHC）では、2 頭ともに空腸および回腸の粘膜上皮細胞内に PED ウイルス抗原が認められた（図 5）。

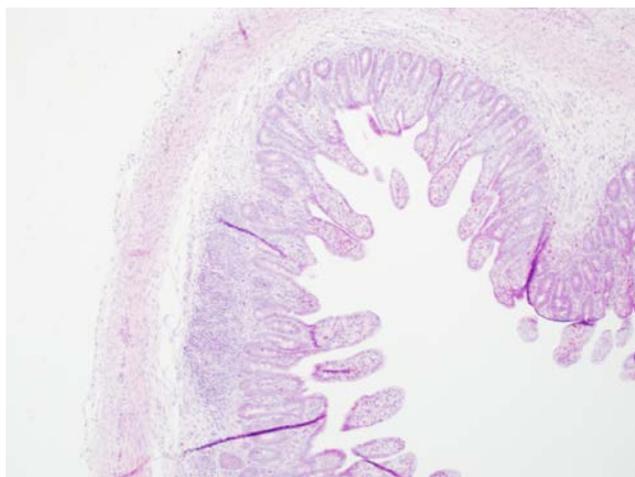


図 4a 絨毛の萎縮、粘膜上皮細胞の扁平化

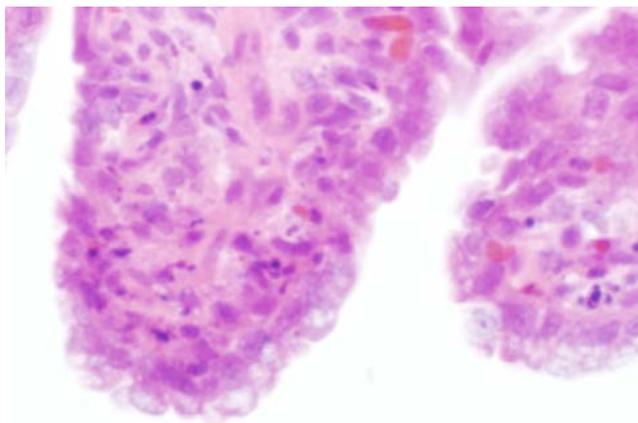


図 4b 粘膜上皮細胞の空胞形成

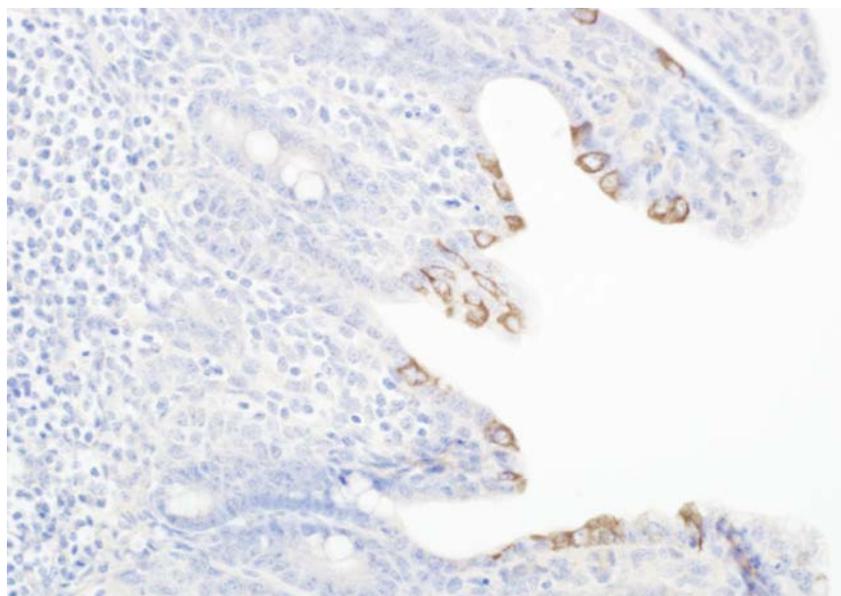


図 5 免疫組織化学的染色 (IHC)

4 診断

臨床症状および各検査成績により本症例を PED と診断した。

考 察

本症例は下痢、嘔吐を主徴とし、伝播力が強く、TGEやPEDなどのウイルス性の急性伝染病を疑った。PEDウイルスに感染した豚の臨床所見は、その重症度によって様々であり、他の原因の下痢と区別することができない。臨床症状は、豚の年齢、以前の感染状況、免疫状態、二次感染等によって異なる。急性感染により死亡した豚の死後所見はTGEと類似しており、主に小腸に局限した腸の菲薄化、胃内の未消化ミルクの存在、水様性の腸内容物といった所見がみられる⁵⁾。このようにPEDはTGEと臨床的に区別できないため、確認検査による類症鑑別が重要となる。確認検査はウイルス分離、RT-PCR、免疫組織化学的染色（IHC）、血清学的検査により行うが、PEDやTGEウイルスは分離が困難なため、通常、RT-PCRによるウイルス遺伝子の検出と免疫組織化学的染色（IHC）によるウイルス抗原の確認により確定診断を行うこととなる^{1), 2), 5)}。今回についてもこの両検査によりPEDと診断し、臨床症状、病変およびウイルス増殖部位はPEDの特徴を示すもので、最近の国内外でみられているものと差はなかった。PEDウイルスはすべての月齢で感染するとされているが^{2), 5)}、特に今回のように0～1日齢と出生直後にもかかわらず、粘膜上皮細胞内にPEDウイルス抗原が確認されたことは、本ウイルスの感染が暴露後に非常に早く成立し、ウイルスが粘膜上皮細胞内で急速に増殖することを示しており、発症豚であれば今回のように出生直後であっても問題なく検査に供することが可能と思われた。

PEDウイルスの直接伝播は、ウイルスに汚染された糞便の摂取を介して起こる。また、間接伝播は、人、機材又はその他の種類の糞便で汚染された物品（汚染飼料を含む。）を介して、また同様に、汚染された可能性のある車両（飼料トラックや作業車両）を介して起こる⁵⁾。今回、発症直後の豚群に中和抗体は認められないことから、人や車両、物品を介してPEDウイルスが農場に侵入し、免疫のない豚群へ感染が拡大したものと推察された。

PEDが発生した際は下痢に対する対症療法及び二次感染の防止以外に対応方法はなく、ほとんどの肥育豚は、二次感染が起きない限り7～10日以内に回復するとされている⁵⁾。今回の事例は約3週間で沈静化し、他の農場への拡大もなく、以後新たな発生はみられてない。本病への対策は健康な豚の導入、農場内での豚、物および人の移動制限、車両及び設備の消毒、死亡豚や糞尿の適切な処理等の厳密なウイルスの侵入と拡散防止対策が最も有効であると考ええる。

引用文献

- 1) 病性鑑定指針. 平成 20 年 6 月 2 日付 20 消安第 880 号農林水産省消費・安全局長通知, 242-243
- 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 HP. 豚流行性下痢 (PED) .
<http://www.naro.affrc.go.jp/niah/disease/ped/index.html>
- 3) Kim, SY (2001) . j.Vet.Diagn. Invest.13 (6)
- 4) 農林水産省 HP. 豚流行性下痢について. <http://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/ped/ped.html>
- 5) OIE Technical Factsheet. Infection with porcine epidemic diarrhoea virus (2014)
- 6) Vaughn, E.M. et al (1994) . j.Clin.Microbiol.32 (7)

県内で発生した豚流行性下痢（PED）の発生事例

県中央家畜保健衛生所

中原 祐輔 辻 寛子
山本 禎 米持 修
篠崎 隆 和泉屋 公一
吉田 昌司

はじめに

豚流行性下痢（以下、PED）は、食欲不振と水様性下痢を主徴とする豚の急性伝染病で、家畜伝染病予防法により届出伝染病に指定されている。すべての日齢の豚が罹患するが、特に若齢豚で症状が重篤化しやすく、特に哺乳豚での死亡率が高い疾病である。

平成22年以降、中国及び米国でPEDが流行する中、平成25年10月、我が国でも7年ぶりにPEDの発生が確認された。その後、全国的に発生が拡大する中、本県においても平成26年5月1日に管内の1養豚農場で発生を確認したが、複合的なまん延防止対策を講じたことにより、発生が拡大することなく、1例で終息することができたので、その概要について報告する。

農場概要

発生農場は一貫経営で、繁殖豚58頭を含む総飼養頭数 593 頭を畜主 1 名で管理していた。発生農場の見取り図とピッグフローを図 1 に示した。畜舎は、離乳豚舎、分娩及びストール豚舎、肥育豚舎の計 3 棟からなり、豚糞は地域の共同堆肥舎で処理し、肉豚は県内と畜場へ出荷していた。豚の移動に関する聞き取り調査では、平成26年4月25日に15頭を出荷し、平成26年3月21日に県内養豚場から3頭の繁殖雌豚を導入していた。その他の疫学情報として、飼

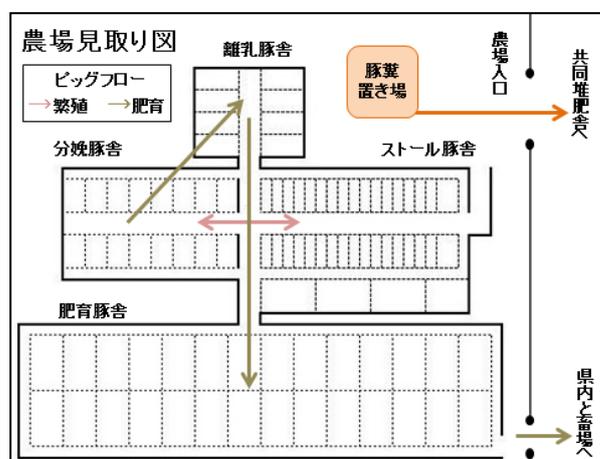


図 1 発生農場の見取り図とピッグフロー

料は配合飼料及びエコフィード（パン）を給与し、畜舎汚水処理は公共下水道を利用、精液の購入はなかった。なお、発生時にはPEDワクチンは使用していなかった。

発生概要

平成26年5月1日に畜主から家畜保健衛生所（以下、家保）へPEDを疑う旨の連絡があり、農場の立入検査を行ったところ、繁殖豚7頭と肥育豚6頭の計13頭に元気消失、食欲低下、嘔吐、軟便及び水様性下痢を認めた（図2）。臨床症状からPEDが疑われたため、病性鑑定材料として、発症豚から血液12検体及び直腸便10検体を採材した。

翌5月2日に、再度立入検査を行った結果、繁殖豚23頭、肥育豚229頭、哺乳豚29頭、離乳豚43頭で元気消失、食欲低下、軟便及び水様性下痢が認められた（図3）。全てのステージに症状が拡大したため、更に哺乳豚2頭を病性鑑定材料とした。

農場で確認された主な臨床症状は水様性下痢であったが、元気消失や食欲減退により農場全体が静かであったことも印象的であった。

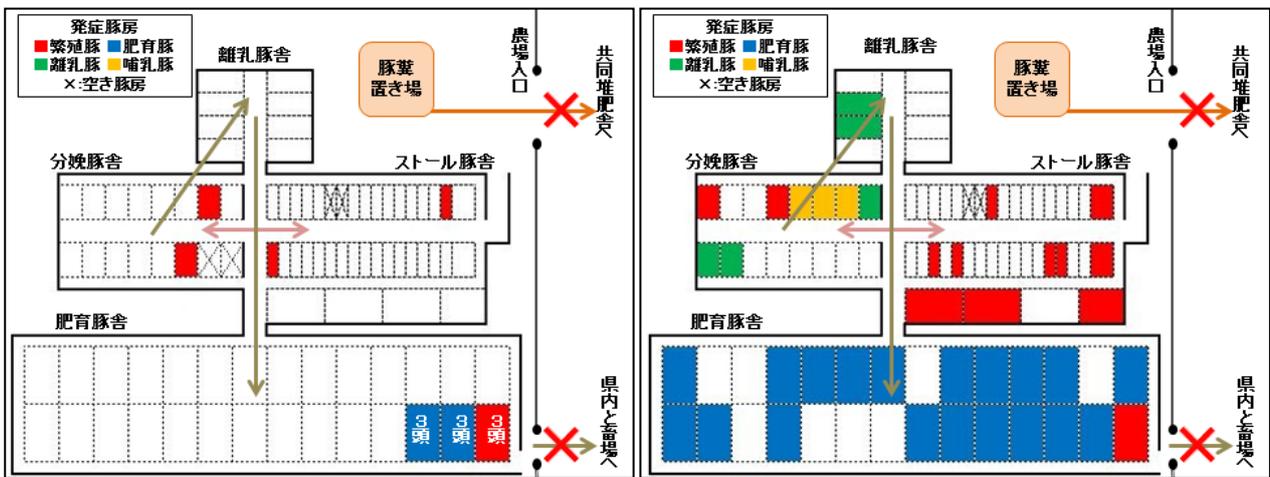


図2 5月1日の発生状況

図3 5月2日の発生状況

病性鑑定結果

病性鑑定結果を表1に示した。

5月1日の発症豚から採材した血液12検体は中和試験を実施し、全例中和抗体陰性であったが、直腸便10検体のRT-PCR検査は8検体が陽性であった。

5月2日の哺乳豚2頭は、いずれも中和抗体陰性であったが、腸内容物のRT-PCR検査は陽性であった。さらに病理組織学的検査では、HE染色で小腸絨毛の萎縮、小腸粘膜上皮細胞の扁平化及び空胞変性を認め、IHC染色が陽性であったことからPEDと診断した。

表1 病性鑑定結果

採材日	材料	方法	結果	
5月1日	血液 12検体	ウイルス学的検査	中和試験	抗体全例陰性
	直腸便 10検体		RT-PCR検査	陽性:8検体
5月2日	哺乳豚 2頭 (生体)		中和試験	抗体全例陰性
			RT-PCR検査 (腸内容物)	陽性:2検体
		病理組織学的検査	HE染色	小腸絨毛の萎縮、 小腸粘膜上皮細胞の 扁平化空胞変性
IHC染色	陽性:2検体			

発生農場におけるまん延防止対策

発生農場におけるまん延防止対策を講じるため、PED防疫対策の指導上のポイント²⁾に基づき行った家保の指導と畜主自らが実施した対策は次のとおりであった。

1 発生農場に対する家保の指導

- (1) 健康観察の徹底、洗浄・消毒の徹底、不要な農場立入者の制限等の飼養衛生管理基準を遵守すること。
- (2) 種豚の導入及び肉豚の出荷は、当面の間自粛すること。

農場の意向により、5月9日に肉豚の出荷を再開した。出荷にあたり、家保職員は当日及び前日の2回、出荷豚の臨床検査を行い、併せて畜主と家畜運搬業者に対し、車両消毒の徹底、作業服や長靴の交換及び作業後の手指消毒の徹底を指導した。

- (3) 地域共同堆肥舎への豚糞の搬出を自粛すること。

糞便中には多量のウイルスが存在しており、その移動により感染を広げる恐れがあることから、ウイルスの不活化を目的に、60度以上の温度上昇と3週間の留置期間を条件¹⁾³⁾として、堆肥用温度計等を用いた温度管理の下、堆肥化を行った。堆肥化した豚糞は6月9日から搬出を再開した。

2 畜主が自ら実施した対策

- (1) 10日齢以降の哺乳豚について一斉離乳を行い、ほ乳期用配合飼料を給与した。
- (2) 発症哺乳豚に対しては経口補液を実施した。
- (3) 5月中旬頃にワクチンが届いたことにより、妊娠母豚へのワクチン接種を実施した。

3 発生農場立入検査に伴う家保の対策

- (1) 農場の立入検査を行う際には、家保職員、車両、持ち込む防疫資材を限定した。
- (2) 帰庁した職員はシャワーを浴びて作業着を交換し、使用後の車両や防疫資材は徹底的な洗浄・消毒を行った。

発生期間中の発症頭数及び死亡頭数の推移

発生期間中の発症頭数及び死亡頭数の推移を図4に示した。5月1日の13頭から増加した発症頭数は5月6日の322頭をピークに徐々に減少し、5月23日はPEDを疑う症状は認められなくなった。

その後も、臨床症状が認められなかったことから、当該農場における発生は5月23日に沈静化したものと判断した。

発生期間中の死亡頭数は10日齢未満の哺乳豚のみで合計31頭であった。

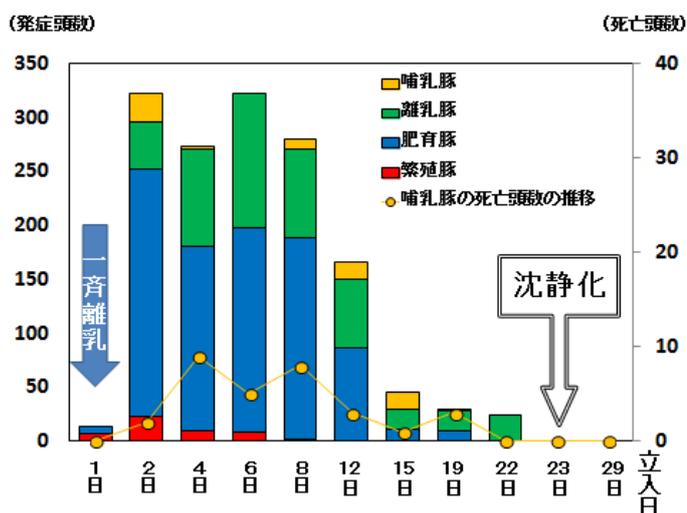


図4 発生期間中の発症頭数及び死亡頭数の推移

抗体及びウイルスの消長に関する調査

農場の沈静化を確認後、PEDの抗体及びウイルスの消長を確認し、再感染の有無をモニタリングするため、抗体及びウイルスの消長に関する調査を次のとおり実施した。

1 調査期間

平成26年5月から8月の各月及び11月

2 調査対象

繁殖母豚、種雄豚、哺乳豚、離乳豚、肥育前期豚、肥育後期豚の6ステージ

3 検査材料と方法

(1) 抗体検査：血液 延べ 118 検体：中和試験

(2) ウイルス検査：直腸便 延べ90検体：RT - PCR検査

抗体検査成績

抗体検査の成績について抗体陽性率を図5に、各ステージにおける平均抗体価の推移を図6に示した。中和抗体は、5月の発生時の14検体では全例陰性であった。6月には全てのステージで中和抗体が陽転し、陽性率は100%であった。各ステージの平均抗体価も調査期間中で最大となり、繁殖母豚で24.3倍、種雄豚で13.9倍、哺乳豚で111.4倍、離乳豚で24.3倍、肥育前期豚で48.5倍、肥育後期豚で13.9倍を示した。

その後、抗体陽性率及び平均抗体価は徐々に低下し、11月には、抗体陽性率は32.1%、各ステージの平均抗体価も繁殖雌豚で5.9倍、哺乳豚で1.7倍まで低下し、種雄豚、離乳豚、肥育前期豚、肥育後期豚では抗体が認められなかった。

調査実施月	5月 発生時	6月 1回目	7月 2回目	8月 3回目	11月 4回目
繁殖母豚	0/6	6/6	5/5	6/6	6/6
種雄豚	0/1	5/5	5/5	4/4	0/2
哺乳豚	0/2	5/5	4/5	4/4	3/5
離乳豚	NT	5/5	4/5	0/5	0/5
肥育前期豚	NT	5/5	3/5	3/5	0/5
肥育後期豚	0/5	5/5	4/5	5/5	0/5
陽性率(%)	0	100	83.3	75.9	32.1

陽性数/検査数 (中和抗体価2倍以上を陽性)

図5 抗体陽性率

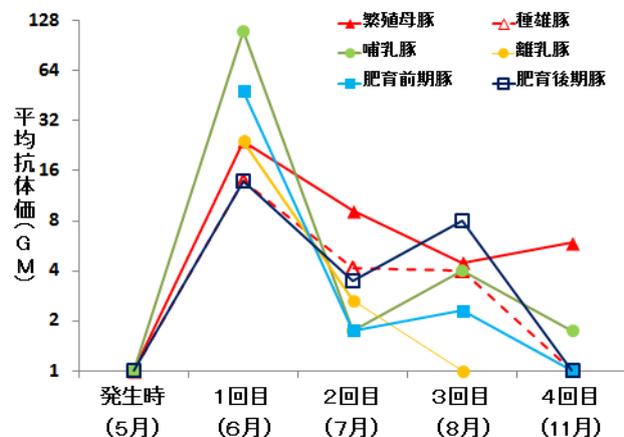


図6 中和抗体価の推移

ウイルス検査成績

ウイルス検査の成績を図7に示した。5月の発生時に繁殖豚、肥育豚、哺乳豚から採材した直腸便計12検体の内10検体がRT-PCR検査で陽性であった。その後、6月、7月、8月と3回の検査を実施し、延べ90検体が全例陰性であった。なお、発生時の陽性率は83.3%であった。

調査実施月	5月発生時	6月1回目	7月2回目	8月3回目
繁殖母豚	5/6	0/6	0/5	0/6
種雄豚	1/1	0/5	0/5	0/4
哺乳豚	2/2	0/5	0/5	0/4
離乳豚	NT	0/5	0/5	0/5
肥育前期豚	NT	0/5	0/5	0/5
肥育後期豚	2/3	0/5	0/5	0/5
陽性率(%)	83.3	0	0	0

陽性数/検査数

図7 ウイルス検査成績

まとめ及び考察

平成26年5月、本県初となるPEDの発生を確認した。1日で急速な感染拡大を見せたが、家保の指導の下、畜主が実施した頻回の洗浄・消毒、豚糞の堆肥化、一斉離乳、豚の移動の自粛等の対策により、23日間で沈静化に至った。

5月の発生時の中和抗体は全例陰性であったが、6月には全例陽性となり、各ステージにおける抗体価も調査期間を通じて最大となった。しかし、7月以降、抗体陽性率とともに抗体価も低下傾向を示し、11月には繁殖母豚と哺乳豚のみが抗体陽性であった。5月中旬以降の妊娠母豚にはワクチンを接種していたことから、11月時点の繁殖母豚及び哺乳豚の抗体は主にワクチン抗体によるものと考察した。また、PEDV遺伝子は発生時にのみ検出され、6月以降は全例未検出となった。

調査成績及び農場でPEDを疑う症状が認められないことを踏まえ、農場における再感染はなく、清浄性を維持していると考えられた。

以上のことから、本事例は、畜主からの早期通報と複合的なまん延防止対策の実施により、短期間にPEDの沈静化を達成し、他農場へ感染を拡大することなく、県内1例で終息出来たものと推察する。

最後に、平成27年1月時点において、他県でのPEDの発生は続いており、本県における発生リスクは依然として高い状態にある。今回の事例で得られた知見は生産者及び関係機関と広く共有し、今後の防疫対応に活かしていきたい。

引用文献

- 1) 川村英輔：続マニュアルマネジメント DAIRYMAN臨時増刊号（2011年）
- 2) 農林水産省消費・安全局動物衛生課：豚流行性下痢防疫担当者全国会議資料（2014年）
- 3) 農林水産省消費・安全局動物衛生課：口蹄疫ウイルスに汚染された家畜排せつ物等の処理に関する防疫作業マニュアル（2012年）

PRRS・PCV2 浸潤農場における衛生対策とその効果

湘南家畜保健衛生所

中橋 徹 柴田 淑子
小菅 知之 太田 和彦
稲垣 靖子

はじめに

豚サーコウイルス関連疾病(以下PCVAD)は他の病原体との混合感染により病態が悪化し、中でも豚繁殖・呼吸障害症候群(以下PRRS)との混合感染は大きな生産性阻害要因となり、養豚経営に影響する。対策方法は豚のオールインオールアウトやワクチン接種など様々であるが、個々の農場の実情に合わせた手段を選択する必要がある。今回、当所管内においてPRRSおよびPCV2が浸潤している一農場において総合的衛生対策を実施し、効果が得られたので、その概要を報告する。

農場の概要

対策を実施した農場は繁殖母豚を148頭飼養する一貫経営農場で、出荷は農協を経由して週に2回、従事者は農場主、後継者、従業員の3名となっている。豚舎は全部で7豚舎、これに加え、既製の小型子豚舎が9基ある(図1)。分娩舎は45豚房あり、一部は離乳豚房として使用している。また、管理獣医師の指導を定期的に受けており、流行性脳炎、萎縮性鼻炎(AR)、豚丹毒、豚パルボウイルス病、PCV2、豚胸膜肺炎(APP)、豚マイコプラズマ病のワクチンを接種している。

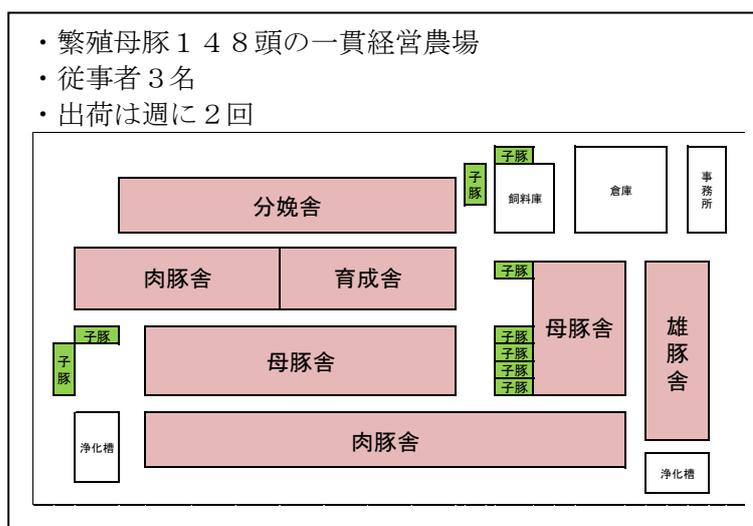


図1 農場の概要

対策前の状況

平成25年夏から冬にかけて離乳後事故率が増加した(図2)。8月(事故率24.8%)に第1回検診を実施し、その後PCV2ワクチンの変更や消毒の徹底により、事故率は若干減少したが、同年12月(事故率32.2%)に再び事故が多発したため第2回検診を実施した。

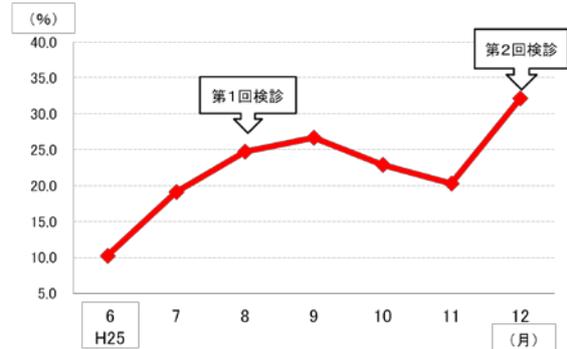


図2 離乳後事故率の推移 (H25. 6~H25. 12)

1 第1回検診

平成25年8月、農場主から子豚の死亡が多発しているとの連絡を受け、検診を行った。分娩舎の離乳房において発育不良、活力低下、呼吸器症状を呈する離乳豚が散見された(写真1)。臨床症状のある生体2頭(46、63日齢)について病性鑑定を実施した。



写真1 分娩舎の離乳房(第1回検診時)

病性鑑定結果(表1)は、細菌学的検査において、肝、脾、腎、肺、脳から有意な細菌は分離されず、空腸内容物から*Escherichia coli* が分離されたが、毒素検査は陰性だった。また、ウイルス学的検査において、肝、脾、腎、肺、扁桃、肺門リンパ節、脳からCPEを起こすウイルスは分離されなかったが、PCR法により扁桃、肺門リンパ節、肺からPCV2特異遺伝子が検出された。病理学的検査において扁桃および各リンパ節においてリンパ球の減少及び細胞質内に封入体を認めた。免疫組織化学的染色において、扁桃、肺門リンパ節、肺の病変部にPCV2陽性抗原を認めた(写真2)。これらの事からPCVADと診断した。

表1 第1回検診 病性鑑定結果

検査材料：生体2頭

●細菌学的検査

- ・肝、脾、腎、肺、脳からの細菌分離 (-)
- ・空腸内容物から *Escherichia coli* 分離。

毒素検査 (-)

●ウイルス学的検査

- ・肝、脾、腎、肺、扁桃、肺門リンパ節、脳からのウイルス分離 (-)

PCR法	扁桃	肺門リンパ節	肺
PCV2	+	+	+
PRRS	-	-	-

2 第2回検診

第1回検診後、PCV2ワクチンの変更や消毒の徹底による対策を講じたが、顕著な効果が得られず、同年12月に事故が急増したため第2回検診を実施した。分娩舎において8月と同様に活力低下、呼吸器症状を呈する子豚が散見された。臨床症状のある生体3頭(23、30、40日齢)について病性鑑定を実施した。

病性鑑定結果は、細菌学的検査において、肝、脾、腎、肺、脳、空腸内容物から有意な細菌は分離されなかった。また、ウイルス学的検査において、肝、脾、腎、肺、扁桃、肺門リンパ節、脳からCPEを起こすウイルスは分離されなかった。PCR法により肺、扁桃からPCV2特異遺伝子が検出された。免疫組織化学的染色において、肺門リンパ節にPCV2陽性抗原を認め、第1回検診時と同様にPCV2が関与していると考えられた。さらに、稟告などからPCV2だけでなく、PRRSの関与も疑い、母豚群のELISA検査を実施した。

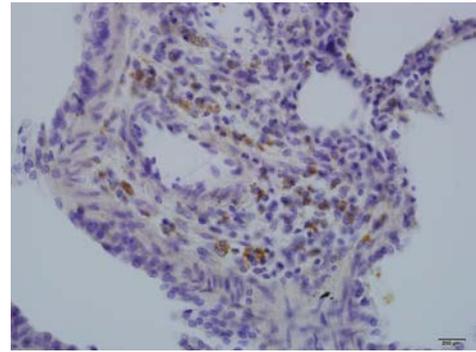


写真2 右後葉肺におけるマクロファージ系細胞細胞質内のPCV2陽性抗原

3 母豚群におけるPRRSのELISA検査

平成25年7月と12月の母豚群におけるPRRSのELISA検査を実施した(図3)。検診前の7月の検査では抗体陰性豚は認められなかったが、12月は抗体陽性豚(S/P比 ≥ 0.4)と抗体陰性豚(S/P比 < 0.4)が混在状態にあった。また、12月は7月と比較してS/P比の高い豚が認められた。このように12月時点で、母豚群のPRRSの免疫状態にバラツキがあることが分かった。

総合的対策の実施

本農場における問題点を洗い出し、それらに対する対策を検討し、実施した(表2)。

1 母豚群へのワクチン接種

検査結果からPCV2対策だけでなく、まずはPRRSを主眼とした対策を行う必要性が示された。PRRS対策で最も重要な柱は繁殖母豚群の免疫安

表2 対策の概要

- | |
|--|
| <p>① 母豚群へのワクチン接種</p> <ul style="list-style-type: none">・平成25年12月から3ヶ月毎に実施 |
| <p>② ピッグフローの見直し</p> <ul style="list-style-type: none">・離乳豚の移動先を一本化・離乳と移動の早期化 |
| <p>③ 飼養管理の改善</p> <ul style="list-style-type: none">・離乳期から育成期の密飼い解消・畜舎や畜体の清掃・消毒の徹底 |

定化である²⁾³⁾。そこで、母豚群におけるPRRSの免疫安定化のためにワクチンを接種する事とした。

2 ピッグフローの見直し

また、ワクチン対策だけでなく総合的な衛生対策も実施することとなった。本農場は分娩舎からの豚の移動日齢が遅いことに起因し、離乳房や子豚舎が密飼状態にあったことから、ピッグフローを見直した。



写真3 畜舎消毒の徹底

3 飼養管理の改善

飼養管理の改善はPCVADやPRRSだけでなく、多くの疾病に有効である¹⁾。畜舎の清掃や消毒が不十分で豚舎環境の悪化を招いていると考えられたため、こまめな清掃を実施した。また、清掃と同時に畜舎や畜体の消毒を徹底し、農場内のウイルス量の低減対策も実施した(写真3)。

対策後の農場の状況

1 母豚群のPRRS抗体保有状況

PRRS抗体検査結果を農場主および管理獣医師に連絡し、管理獣医師の指導のもと、まず、母豚群へのPRRSワクチンの一斉接種を行った。

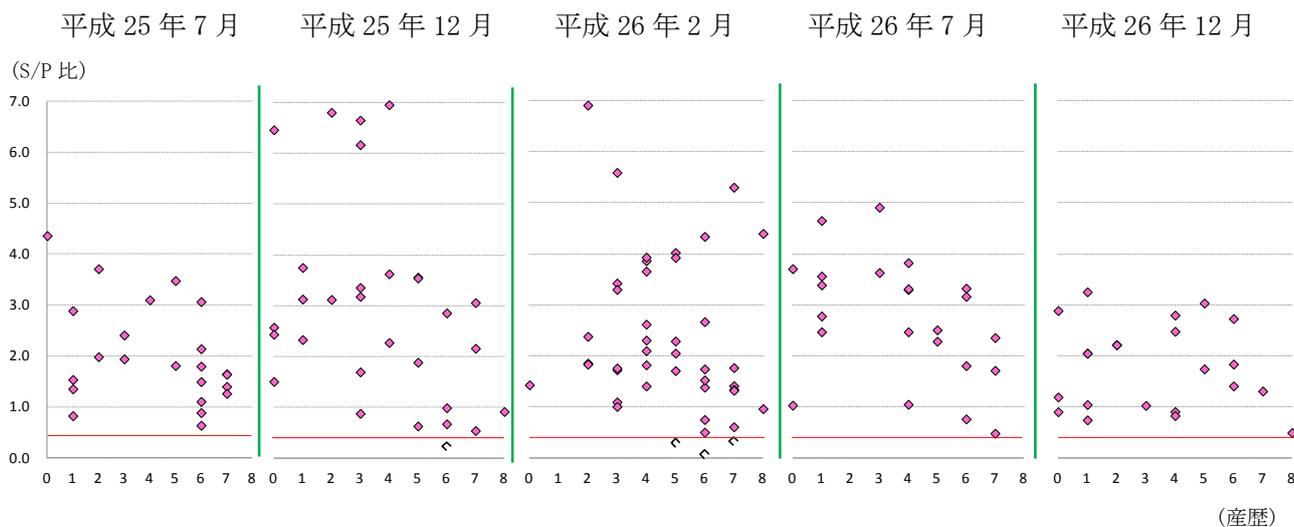


図3 母豚群におけるPRRSのELISA検査結果

平成25年12月から開始し、以降、3ヶ月毎に1回ずつ一斉接種を行った。PRRSワクチンの一斉接種を開始した平成25年12月以降、平成26年2月、7月、12月に母豚群のPRRSのELISA検査を実施した。検査のたびにS/P比のバラツキが減少し、S/Pの高い豚や抗体陰性豚がいなくなっており、母豚群のPRRSに対する免疫の安定化が認められた。

2 対策②：ピッグフローの見直し

本農場は分娩舎の一部の豚房を離乳房として使用しており、従来は60日齢まで離乳房で過ごした後、子豚舎に移動し、子豚舎に入りきらない豚は肉豚舎に移動していたが、平成26年2月以降は、45日齢まで離乳房で過ごした後、子豚舎に移動するよう変更した(図4)。移動日齢が早まったことで肉豚舎に直接行く豚はいなくなり、離乳豚の移動先が一本化された。

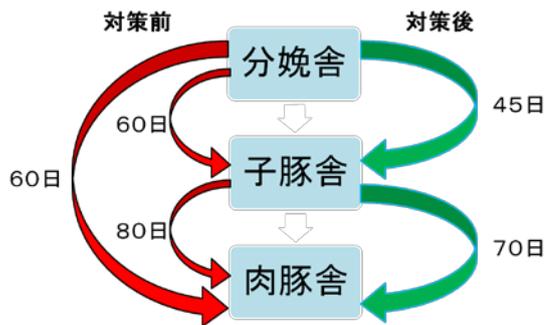


図4 ピッグフローの見直し

また、分娩舎において、従来は離乳を40日齢とし、60日齢まで離乳房で過ごしていたが、平成26年2月以降、離乳を28日齢とし、離乳房での滞在は45日齢までに変更した。早期の移動により空房数が増え、1離乳房の頭数を20頭から15頭に変更でき、離乳の早期化により母豚の回転率も改善された(写真4)。



写真4 離乳豚の発育改善

3 対策③：飼養管理の改善

ピッグフローの見直しにより、移動日齢が若くなったため、子豚舎の飼養環境が改善された(写真5)。また、分娩舎において、通路と豚房に段差がないという構造上の問題から、糞が通路にたまる傾向があったが、ピッグフローの見直しにより作業が効率化され、こまめな清掃が可能となり、豚舎環境の改善が図られた。他にも、農場入口に部外者の出入りを制限するためのチェーンの設置や車両消毒用動力噴霧器の設置、農場専用の長靴置き場と踏み込み消毒槽の設置など、病原体の侵入防止の徹底も実施した。



写真5 密飼いの解消(子豚舎)

まとめ

1回目の検診を実施した平成25年8月に事故率は24.8%まで上昇した。その後、PCV2ワクチンを変更したが、事故率が20%を超える状態が継続し、2回目の検診を実施した12月は32.2%まで上昇した。その後、12月に母豚群へPRRSワクチンを一斉接種し、平成26年1月以降、飼養管理の改善やピッグフローの見直しを実施したことにより、3月の事故率は12.3%まで減少した。以降、事故率は10%前後で推移している(図5)。総合的に衛生対策を実施した結果、離乳後事故率は事故多発前に戻り、平成26年10月には平均出荷日齢が220日から200日に短縮した。今後は、これらの対策を継続し、農場の実情に合わせた対策を加え、更なる生産性の向上に結びつけたい。

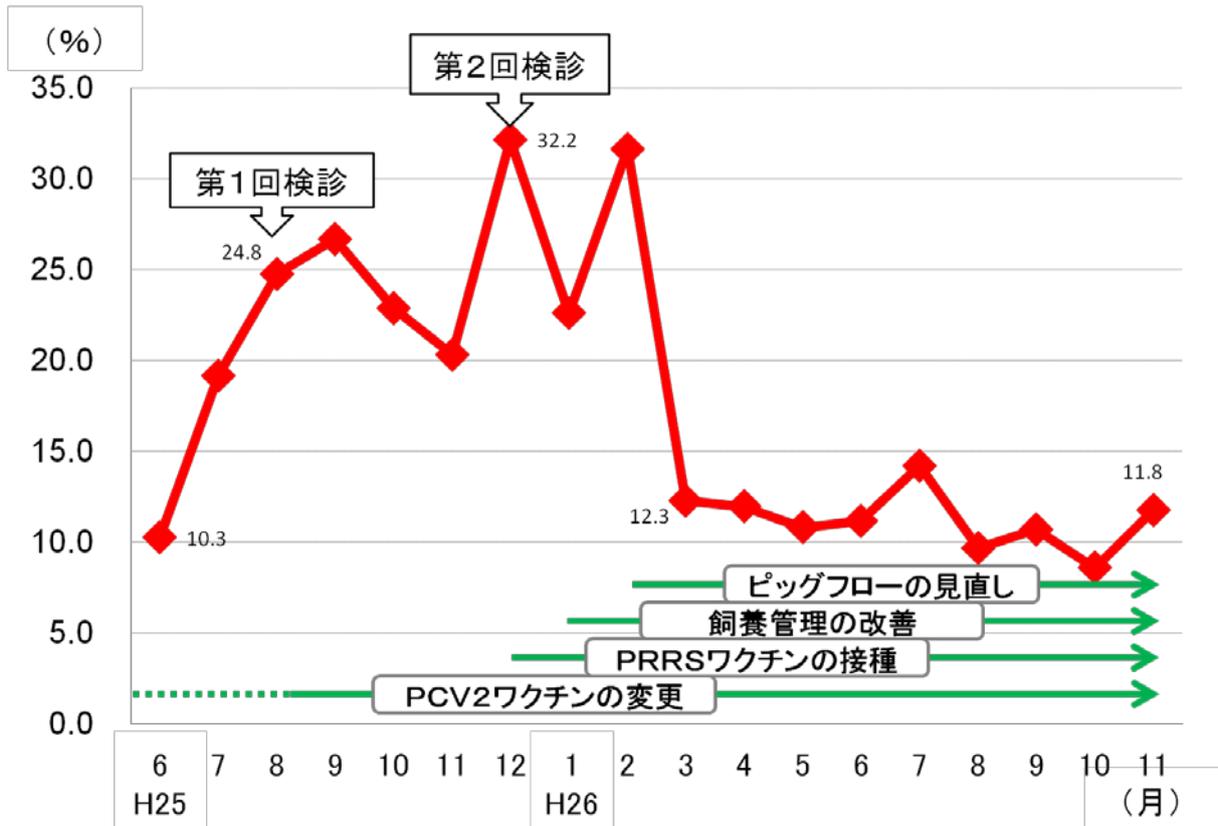


図5 離乳後事故率の推移 (H25.6~H26.11)

引用文献

- 1)大井宗孝ら：月刊養豚界、1月号(2009)
- 2)大竹聡ら：PRRSコントロール事例集、pp 9~23(2007)
- 3)日清丸紅飼料株式会社ホームページ(2007)

鳥インフルエンザ検査におけるリアルタイム PCR のデータ解析法の比較検討

県央家畜保健衛生所

高山 環 英 俊征

後藤 裕克 和泉屋 公一

吉田 昌司

はじめに

リアルタイム PCR（以下、r-PCR）では、DNA の増幅による蛍光シグナルから得られたデータをもとに、ある決められたアルゴリズムを用いて、一定のシグナル強度に達した時のサイクル数（Ct 値や Cp 値と呼ぶ）を算出することにより解析を行う。r-PCR の解析に用いるアルゴリズムは大きく 2 種類に分類され、一つ目は従来より多くのシステムで採用されている Crossing Point 法（以下、CP 法）であり¹⁾、増幅曲線の指数関数的増幅域で Threshold Line（閾値）設定を行い、Threshold Line と増幅曲線との交点を Ct（Threshold Cycle）値とする。二つ目は、2nd Derivative Maximum 法（以下、SDM 法）であり、増幅曲線の最大変曲点を二次導関数により算出し、そのサイクル数を Cp（Cross point）値とし⁶⁾、現在、後者に対応しているシステムは一部に限られる⁹⁾。

今回、本県では家畜保健衛生所検査機器等整備事業において高病原性鳥インフルエンザ（HPAI）検査体制の充実強化を目的に新たな r-PCR 装置の追加導入を行い、従来より保有している CP 法のみに対応したシステムに加え、CP 法及び SDM 法に対応できる新システムとの 2 台体制になった。これをうけ、鳥インフルエンザ（以下、AI）検査において、新システムによる SDM 法の有用性を確認するため、従来システムと新システムの CP 法及び SDM 法について比較検討を行ったので報告する。

材料と方法

1 r-PCR 装置

従来システム（旧 Applied Biosystems 製 Applied Biosystems7500 リアルタイム PCR システム、以下 ABI7500）及び新システム（Roche Diagnostics 製 LightCycler480 リアルタイム PCR システム、以下 LC480）の 2 台を使用した。

2 被検材料

逆転写反応は AI ウイルス陽性 RNA (H3、H5、H7eu、H7am) を鋳型とし、酵素に M-MuLV Reverse Transcriptase、プライマーに Random 6 mers を使用し相補鎖 DNA(以下、cDNA)を合成した。反応条件は 37°C で 15 分、85°C で 5 秒の酵素失活処理を行い⁵⁾、合成した各 cDNA を 10⁰~10⁻⁶倍まで 10 倍段階希釈したものを被検材料とした。

3 r-PCR 反応

高病原性鳥インフルエンザ及び低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^{4),5)}に則り、NP、H5、H7eu、H7am を標的遺伝子とした 4 種類のプライマー、プローブセットを使用した(表 1)。Premix Ex Taq 10 μl に 20pmol/μl のフォワードプライマー及びリバースプライマー 2 μl、10pmol/μl の Taq Man Probe 2 μl、ABI7500 は Rox Dye II の 5 倍希釈液 2 μl と滅菌蒸留水 1 μl で 19 μl に、LC480 は滅菌蒸留水 3 μl で 19 μl にした後、各検体 1 μl を加えて全量 20 μl の反応液とし、それぞれを 96 ウェルプレートの各ウェルに 1 検体あたり 2 ウェルに添加した。反応条件は初期変性 95°C で 30 秒後、変性 95°C で 10 秒、アニーリング 50°C で 20 秒、伸長 60°C で 32 秒を 35 サイクルに設定した⁵⁾。r-PCR 反応は 2 つのシステムで全て同様の条件で行った。

表 1 NP、H5、H7eu、H7am 遺伝子を検出するプライマー、プローブ

		No.	Sequences
NP	Forward primer	#551F	5'-AGRTAYTGGGCYATAAGRAC-3'
	Reverse primer	#806R	5'-GCATTGTCCTCCGAAGAAATAAG-3'
	Probe primer	#553P	FAM-ATCGGGYTCGTYGCCTTTTCGTCY-BHQ
H5	Forward primer	#491F	5'-CCARTRGGKCKATAAAAYTC-3'
	Reverse primer	#820R	5'-GTCTGCAGC RTAYC CACTYC-3'
	Probe primer	#547P	FAM-ACCATKCCYTGCCAYCCYCCYTCT-BHQ
H7eu	Forward primer	#815F	5'-ATMAATAGCAGRGCARTRGG-3'
	Reverse primer	#496R	5'-GATCWATTGCHGAYTGRGTG-3'
	Probe primer	#817P	FAM-CCYTCYCCYTGTGCRITTYTG-BHQ
H7am	Forward primer	#816F	5'-ATCAACYCYAGRACWGTKGG-3'
	Reverse primer	#496R	5'-GATCWATTGCHGAYTGRGTG-3'
	Probe primer	#817P	FAM-CCYTCYCCYTGTGCRITTYTG-BHQ

4 解析

解析方法は各システムの使用方法^{1),6)}に則り行った。従来システムでは解析を CP 法により行い、Base Line、Threshold Line を Manual で設定(以下、CP1)した。新システムでは CP 法による方法を Noise Line、Threshold Line を Manual で設定(以下、CP2)し、SDM 法による方法を Auto で

設定（以下、SDM）した。CP1、CP2でManual設定した各解析パラメーター値を表2に示した。

表2 CP1、CP2の解析パラメーター値

解析 パラメーター 標的遺伝子	CP1		CP2	
	Base Line	Threshold Line	Noise Line (Cycle Range)	Threshold Line
NP	0.1	3-15	3-35	5.9493
H5	0.1	3-15	12-35	6.0073
H7eu	0.1	3-15	3-35	3.5139
H7am	0.1	3-15	3-35	3.0609

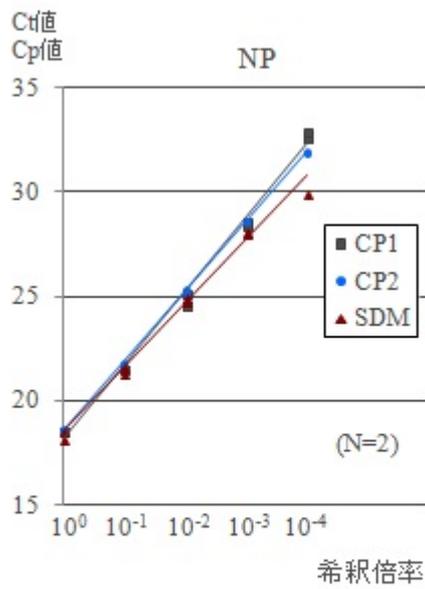
結果

各標的遺伝子について、各解析法（CP1、CP2、SDM）における希釈倍率毎の Ct 値及び Cp 値を表3に示した。また、Ct 値及び Cp 値と希釈倍率との関係を図1に示した。各標的遺伝子における増幅効率（e）及び相関係数（R²）は各解析法共に良好な結果であった。また、得られた Ct 値及び Cp 値については解析法間に明らかな差は認められなかった。

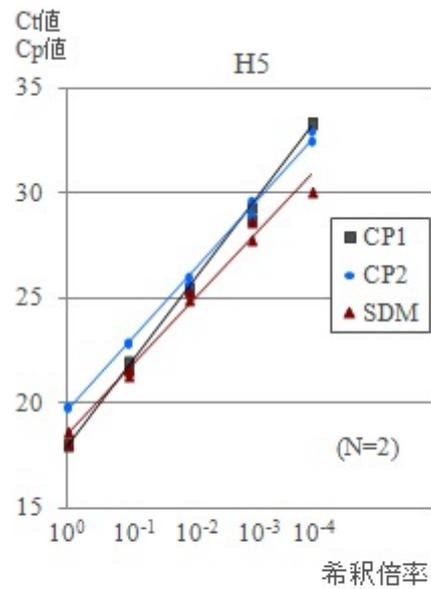
表3 各解析法における、希釈倍率毎の Ct 値・Cp 値

標的遺伝子	解析法	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
NP	CP1	Ct値	18.53	21.50	24.87	28.53	32.76	
		Cp値	18.67	21.81	25.30	28.64	31.95	
	SDM	Cp値	18.43	21.55	24.92	28.13	30.00	
H5	CP1	Ct値	18.03	21.79	25.45	29.07	33.36	
		Cp値	19.82	22.87	25.78	29.27	32.66	
	SDM	Cp値	18.34	21.46	25.10	28.15	30.00	
H7eu	CP1	Ct値	17.75	21.15	24.66	27.97	31.82	34.81
		Cp値	18.05	21.43	24.65	27.64	31.27	
	SDM	Cp値	17.85	21.06	24.30	27.44	30.00	
H7am	CP1	Ct値	16.56	19.84	23.12	26.36	30.57	34.03
		Cp値	17.13	20.20	23.76	26.86	30.20	31.60
	SDM	Cp値	16.81	19.67	23.19	26.43	30.00	30.00

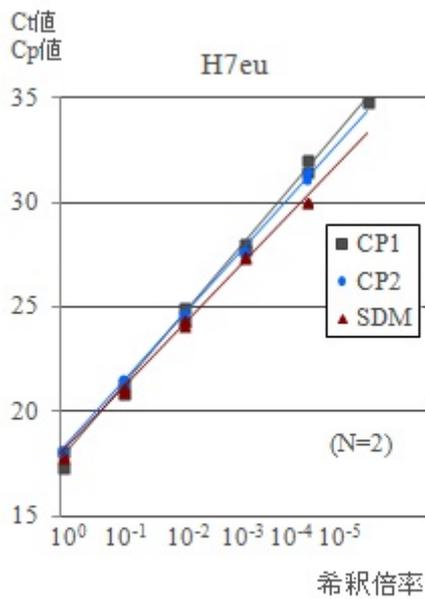
(N=2)



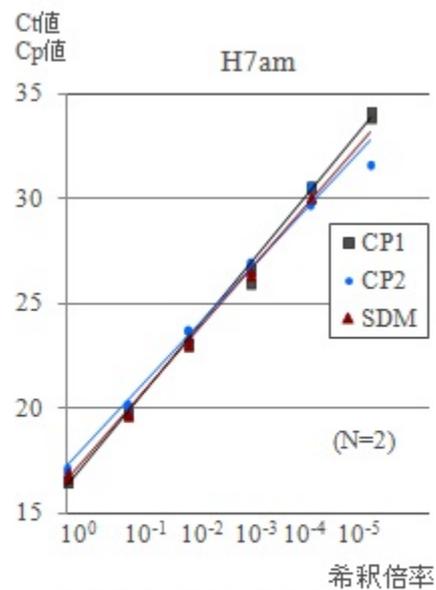
CP1 $e=0.913, R^2=0.995$
 CP2 $e=0.993, R^2=1.000$
 SDM $e=1.128, R^2=0.992$



CP1 $e=0.834, R^2=0.998$
 CP2 $e=1.050, R^2=0.997$
 SDM $e=1.104, R^2=0.986$



CP1 $e=0.945, R^2=0.997$
 CP2 $e=1.025, R^2=0.999$
 SDM $e=1.120, R^2=0.999$



CP1 $e=0.928, R^2=0.999$
 CP2 $e=1.102, R^2=0.990$
 SDM $e=1.003, R^2=0.998$

図1 各標的遺伝子 (NP、H5、H7eu、H7am) における Ct 値、Cp 値の比較

考 察

今回、AI 検査において、新たに導入した r-PCR システムでの SDM 法の有用性を確認するため、三つの解析法の比較検討を行った。その結果、新システムにおいて CP 法・SDM 法共に全ての標的遺伝子は正しく検出された。Shan Lu らは複数の遺伝子検出に対し本報と同様の比較検討を行ったところ、一部の遺伝子では解析法により異なった発現量を示したと報告している⁸⁾が、本報においては三つの方法で得られた Ct 値及び Cp 値に明らかな差は認められず、今回使用したプライマー及びプローブによる AI 検査では解析法間での遺伝子発現量に差はなかった。以上により新システムは AI 検査に用いることが可能であること、また解析法は CP 法及び SDM 法共に有効であることが示唆された。

CP 法は増幅曲線の指数関数的増幅域において、通常同時に増幅した複数の増幅曲線に対し共通する一本の Threshold Line を設定する。解析パラメーターの設定は Auto 設定も可能であるが^{1),6)}、ノイズ蛍光や非特異的蛍光等の影響を受け検査系によってはうまく設定されないことも多く、その際、解析者の判断により Manual で各解析パラメーターの設定を行う必要がある。そのため解析者が異なったり、解析時が異なることで再現性が低くなることもあるといった問題がある。

一方、SDM 法は各増幅曲線に対して二次導関数により解析され、各解析パラメーターや結果の算出はシステムの自動計算により行われるため、同一の検出データで得られる Cp 値は解析者、解析時によって異なることはなく常に一定である⁶⁾。SDM 法は比較的新しい方法ではあるが、解析者のバイアスが排除され Cp 値が変動しないといった点からより客観性・再現性に優れた方法と言える^{6),9)}。

従来からウイルス疾病の実験室内診断はウイルス分離及び血清学的診断による方法で行うのが基本であるが、結果判明までに長時間を要する上、ウイルスによっては分離や抗体検査自体が困難なものがある^{3),7)}。そのため研究分野での利用を前提とした技術である遺伝子検査が、迅速診断法の一部として発展してきており³⁾、家畜衛生分野においても遺伝子検査上の性質を鑑みた上で補助的診断の位置づけで利用されてきた^{2),7)}。しかし近年では家畜伝染病予防法に基づく検査法として診断に利用される傾向にあり²⁾、特に HPAI に係る診断では、迅速・的確な初動防疫を目的に r-PCR 検査の結果を疑似患者決定時の重要な判定材料とするなど⁵⁾、その位置づけが変化しつつある。

このような中 r-PCR による疾病診断には客観性・再現性に優れた公正性の高い解析法を用いることが必要であり、r-PCR の解析法に SDM 法を用いることは家畜伝染病の検査及び診断に有用で、今後の更なる活用が期待される。

引用文献

- 1) Applied Biosystems 7300/7500/7500Fast Real-Time PCR System, Relative Quantification Getting Started Guide,
http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms_042676.pdf
- 2) 病性鑑定指針 平成 20 年 6 月 2 日付消安第 880 号農林水産省消費安全局通知, 13-18
- 3) David O. White, Frank J. Fenner : 医学ウイルス学 (第四版) , 173-174, 近代出版 (1996)
- 4) Kenji Tsukamoto, et al : J. Clin. Microbiol, Vol. 48, No. 11, 4275-4278 (2010)
- 5) 高病原性鳥インフルエンザ及び低病原性鳥インフルエンザに関する特定防疫指針, 平成 23 年 10 月 1 付農林水産省大臣公表
- 6) Light Cycler480 Instrument Operator' s Manual Software version1
<http://www.cbm.g.umd.edu/files/cbm/corelab/LightCyclerManual.pdf>
- 7) Sashi B. Mohanty, Sukanta K. Dutta : 獣医ウイルス学 (初版) 、83-91、文永堂 (1982)
- 8) Shan Lu, et al : Mol Cell Probes、1-6、2010
- 9) タカラバイオ リアルタイム PCR 実験ガイド
<http://www.takara-bio.co.jp/goods/catalog/pdf/prt1-3.pdf>

ニホンミツバチのアカリンダニ症の発生事例

県央家畜保健衛生所

宮地 明子 米持 修
杳澤 一美 篠崎 隆
和泉屋 公一 吉田 昌司

はじめに

アカリンダニ症は、アカリンダニ (*Acarapis woodi*) が蜜蜂の気管内に寄生することで、巣箱内外に飛翔力のない蜂の増加や衰弱を招く感染症で、家畜伝染病予防法（以下、家伝法）で届出伝染病に指定されている¹⁾。平成 22 年に国内初の発生が長野県で確認され²⁾、その後、各地で発生が確認されている³⁾。今回、管内で飼養されているニホンミツバチにおいて県内初の発生を含む 4 症例の発生を確認したので、その概要を報告する。

県内の養蜂の概要

本県の蜜蜂飼養者は、図 1 のとおり、年々増加傾向にあり、特に群数 10 群未満の小規模飼養者が 4 年間で約 100 戸増え、急増している。小規模飼養者が増加する背景としては、市街地において、庭先、ベランダ及びビルの屋上等で飼育する都市養蜂が注目されていることや、在来種であるニホンミツバチの飼育に人気が集まっていることが考えられる。平成 26 年度の管内の飼養戸数割合は、図 2 のとおり 63%が採蜜用セイヨウミツバチ、10%が採蜜用ニホンミツバチ、残りが授粉用セイヨウミツバチとなっている。本県では、従来からニホンミツバチを含む蜜蜂飼養者を対象に家伝法に基づく腐蛆病検査を実施するとともに、衛生指導を行っている。

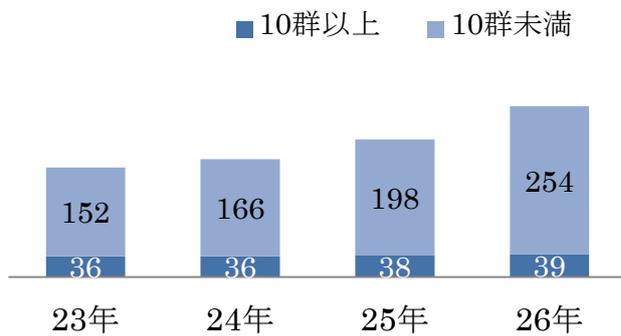


図1 県内の蜜蜂飼養戸数（年度別/規模別）

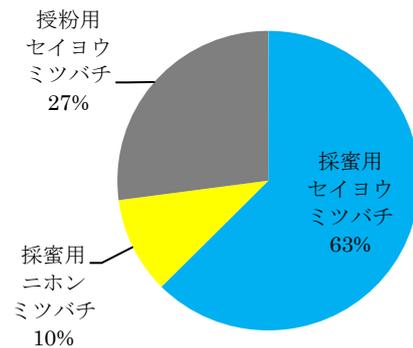


図2 管内の蜜蜂飼育戸数割合（平成26年度）

発生の概要

平成25年8月に飼養者が横浜市内でニホンミツバチ1群を捕獲し、同市内の果樹園に重箱式巣箱を設置し、飼養していたところ、平成26年1月24日、「巣箱周囲に約100匹の成蜂が徘徊又は死亡している」と連絡があり、検診を実施した。検診では、発生状況を確認し、その後、徘徊する成蜂を採材し、蜜蜂の解剖と顕微鏡検査により病性鑑定を行った。

蜂場の概要

当該蜂場は、横浜市内の梨の生産が盛んな地域に位置し、飼養者は梨畑内の重箱式巣箱でニホンミツバチを一群飼養している（写真1、2）。検診時には、巣箱から半径2メートルの範囲内で、ニホンミツバチが多数徘徊する様子が確認でき、指を近づけても飛び上がることはなく、飛翔力がないことが分かった（写真3、4）。



写真1 蜂場のある梨畑



写真2 設置された重箱式巣箱



写真3 巣箱周囲に徘徊する蜂



写真4 飛翔力のない蜂

材料と方法

検体は、巣箱前で徘徊する成蜂 30 匹を採材し、検査室に搬入後、 -20°C で凍結し、無作為に抽出した 20 検体を解凍し、材料とした。術式は O I E のアカリダニ症診断マニュアル⁴⁾（以下、診断マニュアル）に準じて解剖後、摘出した気管を鏡検し、アカリダニの寄生の有無について調べた。

蜜蜂の解剖の術式

アカリダニは蜜蜂の胸部の気管や気門近くに寄生していることが多く、寄生部位を観察することが重要となる。まず、蜜蜂の背を下にして、腹部を大きめのピンセットで固定し、その後、前脚と頭部とまとめて引き抜き、胸部を切断する（写真 5）。次に首を覆うカラーを外し、胸部の切断面に左右一対の気管と気門近くを露出させる。健康な蜜蜂の気管は白色又は半透明なのに対し、アカリダニに感染した場合、褐色から黒色に変色する様子がここで分かる（写真 6）。解剖した蜜蜂の



写真5 頭部と前脚の切断



写真6 切断面に黒色化した気管が見える

気管を摘出し、顕微鏡 100 倍の倍率で気管内を鏡検する。

成 績

検体の胸部の気管を鏡検したところ、気管は薄い褐色に変色し、気管内に虫体と虫卵が確認された（写真 7）。虫体と虫卵は共に約 150 μm の大きさであり、虫体は 4 対の足を持つダニで、鏡検時には生きていて動いている様子が観察できた。20 検体中 15 検体で虫体・虫卵及び気管の変色を確認し、寄生率は 75%であった。1 検体当たり最大虫体は 12 匹、虫卵は 5 個検出された。ダニの寄生部位、虫体・虫卵の大きさ及び形態が診断マニュアルのアカリンダニと一致した。次に、気管の色調を比較した。健康な気管は白色又は半透明であるのに対し、検体の気管は部分的な変色や、気管全面が変色している様子が分かった。色は、薄い褐色から黒色まで様々であった。黒い変色はメラニン色素の沈着によるものであることから、感染の進行により変色に違いが見られたのではないかと推察した（写真 8）。疾病の発生時期、症状及び鏡検所見の結果から本症例をアカリンダニ症と診断した。



写真 7 蜜蜂の気管の顕微鏡像（右の虫体と虫卵は拡大像）

・部分的な変色



・全面が変色



写真8 気管の黒色化

4 症例の発生の概要

1 例目に続き 3 例の発生を確認した。同年、2 月 3 日に 2 件及び 2 月 20 日に 1 件、ニホンミツバチ飼養者から巣箱周囲に成蜂が徘徊、死亡していると連絡があり、検診を実施したところ、採材した成蜂の気管に高率にアカリダニが寄生していることを確認し、アカリダニ症と診断した。続発する 3 例と併せ、1 月から 2 月にかけて合計 4 例の発生が認められた。アカリダニ症は冬期から早春に好発するとされており、今回の 4 症例も冬期に集中してみられる結果となった（表 1）。

表 1 4 症例の発生の概要

	症例1	症例2	症例3	症例4
時期	平成26年1月24日	平成26年2月3日	平成26年2月3日	平成26年2月20日
飼養環境	横浜市内 果樹園	横浜市内 自宅敷地	横浜市内 自宅敷地	横須賀市内 自宅敷地
蜜蜂の種類	ニホンミツバチ	ニホンミツバチ	ニホンミツバチ	ニホンミツバチ
症状	巣箱周囲に成蜂 が徘徊、死亡	巣箱周囲に成蜂 が徘徊、死亡	巣箱周囲に成蜂 が徘徊、死亡	巣箱周囲に成蜂 が徘徊、死亡
巣箱	重箱式巣箱	重箱式巣箱	重箱式巣箱	重箱式巣箱
発生群数 ／飼養群数	1/1	1/3	1/6	1/1
寄生率	75%(15/20)	90%(18/20)	95%(19/20)	83%(25/30)
気管の変色	薄い褐色から黒色	薄い褐色から黒色	薄い褐色から黒色	薄い褐色から黒色
診断	アカリダニ症	アカリダニ症	アカリダニ症	アカリダニ症

4 症例の発生地分布

地図に発生地をプロットし、蜜蜂の飛翔範囲と言われている 2km の円を描くと、いずれの発生も、県東部に集中していることが判明した。症例 1 から 3 は同一市内であり、また近接した地域において発生したことが分かり、この地域で蜜蜂同士の接触により感染した可能性が考えられた。

聞き取りによる発生状況の確認

このほかに、届出はなかったものの、同時期に同様の被害が見られたかどうか、管内のニホンミツバチを飼養する 15 戸に聞き取りを行った。検診を実施し、アカリダニ症と診断された蜂場を赤で、聞き取りにより、同時期に成蜂の徘徊や死亡といった同様の症状がみられた蜂場を黄色で、症状はなく、健康であった蜂場を水色で表した（図 3）。発生が集中した市内で他に 2 戸、また、県南東部の症例 4 の地域でも、他に 2 戸で同様の症状が見られた。また、県北部においても同様の症状が見られ、管内にアカリダニ症がまん延している可能性が考えられた。

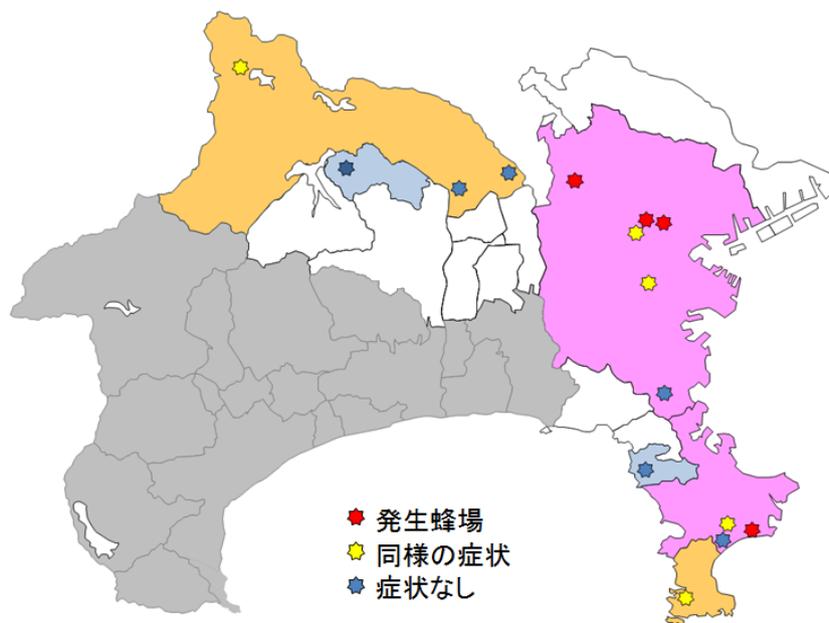


図 3 管内のニホンミツバチ飼養者への聞き取りの結果

蜜蜂飼養者に対する周知

このような結果を受けて、蜜蜂飼養者へ本病の発生を周知した。家保だより（広報紙）を作成し、管内の蜜蜂飼養者に対し県内で本病が発生したことを注意喚起した。また、横須賀三浦地域県政総合センター主催の養蜂講習会で、地域の蜜蜂飼養者に対して、本病の発生状況や他の蜜蜂の感染症について講義し、衛生指導を行った。

また、検査法の技術習得に苦労したため、検査手引書を作成し、初めて検査する場合でも容易に検査できるようにした。

ま と め

平成 26 年 1 月から 2 月にかけて、ニホンミツバチの成蜂が徘徊、死亡する 4 症例が発生した。蜜蜂を解剖し、気管を鏡検したところ、アカリダニの虫体・虫卵の寄生と気管の変色を確認し、アカリダニ症と診断した。

ニホンミツバチ飼養者の聞き取りから、管内に本病が広くまん延した可能性があり、家保だよりや養蜂講習会で注意喚起を行った。今後も、蜜蜂の感染症に関する情報収集と技術研鑽に努め、衛生指導に役立てていきたい。

謝辞：本症例を診断するにあたり御指導いただいた、独立行政法人 農業生物資源研究所 昆虫相互作用研究ユニット前田太郎先生に深謝いたします。

引 用 文 献

- 1) 農林水産省：病性鑑定指針、アカリダニ症、388
- 2) 農林水産省：家畜衛生週報、No. 3158(2011)
- 3) 農林水産省：家畜衛生週報、No. 3218(2011)、No. 3248(2012)、No. 3298(2013)
- 4) OIE: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals、Acarapisosis of honey bees、chapter 2.2.1(2014)

