

## 付属書 11. 確定診断のための検査方法

(参考：「WHO、Laboratory techniques in Rabies. 4th e.」、 「CDC 狂犬病検査マニュアル (Laboratory Methods for Detecting Rabies)」、 「ハワイ州 Rabies Contingency Plan Incident Command System 2001」、 「英国 Memorandum on Rabies、 Prevention and Control」 および 「国立感染症研究所、病原体等安全管理規定」)

動物に狂犬病が疑われた場合には速やかに致死処分を行い、中枢神経組織に対する狂犬病検査を行う。動物の狂犬病検査成績は、咬傷を受けた人への暴露後ワクチン接種や他の狂犬病暴露動物に対する対策等を適切かつ迅速に行うための最も重要な情報源でありその確定診断は慎重に行わなければならない。

実験室内で行われる狂犬病検査では、(1) 脳組織の塗抹標本を用いた直接蛍光抗体法によるウイルス抗原検索、(2) 脳組織乳剤を用いた RT-PCR 法によるウイルス特異遺伝子の検出、(3) 感染脳組織乳剤を乳のみマウス脳内およびマウス神経芽腫細胞に接種して行うウイルス分離法が一般に行われる。

感染が疑われた動物の脳は、「付属書 10. 確定診断の為の (B) 脳の取出し方」(P. 69) にしたがって摘出を行い、アンモン角、脳幹、小脳 (必要であれば唾液腺) を採材し各部位について検査材料を作製してそれぞれ検査を行なう。脳の摘出は周囲と区画された専用の部屋で行い、検査材料を取り扱う者はあらかじめ狂犬病ワクチンの接種を行うなどの予防的措置を必要とする。脳摘出後の操作は安全キャビネット (クラス II) 内で行うことが望ましい。検査材料の採材作業に際しては、組織等の飛散に十分注意を払い感染組織 (中枢神経系組織、体液、特に唾液) と皮膚及び粘膜との直接的な接触を避ける。作業中は防護手袋、マスク等の保護器具を必ず使用する。脳摘出後の頭部は 2 重に重ねた専用の袋に密閉してウイルスの不活化処置を行い廃棄する。解剖等に使用した道具、部屋等は作業終了後に十分なウイルスの不活化処理を行う。

検査の最終判定は、複数の検査官で行い「検査結果の確定」に基づいて速やかに関係者等に報告を行う。狂犬病が強く疑われたが陰性の場合や、検査成績が不明瞭で疑問のある場合には必ず追検査や異なる検査による診断の確定を行う。なお、国立感染症研究所病原体等安全管理規定では、狂犬病ウイルス野外株の取り扱いを BSL3 レベルとしている。

### 補足)

#### 検査手順に関する注意

- 検査材料を受理した検査室は、「受理した検査材料」と「添付されているデータシート」の内容が同一であることを確認して追加すべき必要事項を記入して直ちに検査を実施する。

#### 担当者に求められる必要事項

- 狂犬病ワクチンの接種
- 病原微生物取り扱いに関する十分な経験と理解
- 検査器具等の正しい使用法

## ウイルス暴露を防ぐための環境

- 外部と十分に隔離された部屋（国立感染症研究所で規定している BSL2 と同等の環境）
- バイオセーフティーキャビネット（クラスⅡ）の使用（バイオセーフティーキャビネット内にはベンチコートを敷いて感染性溶液の飛散等を防ぎ、ウイルスを不活化できる溶液を満たした容器を常にベンチ内に置いて使用済み器具等のウイルス不活化を適時行う）
- オートクレーブ（汚染器具のウイルス不活化）の設置
- ウイルスは、石けん液、エーテル、クロロホルム、アセトン、45～70%エチルアルコール、5-7%ヨウド剤、第4級アンモニウム塩に感受性が有り不活化される。
- 専用着衣（手袋（2重に使用）、着衣、マスク、ゴーグル、履き物等）の使用

以下に一般的な狂犬病ウイルスの検査方法を記述する

1. 直接蛍光抗体法
2. RT-PCR 法
3. ウイルスの分離方法
  - a) 乳のみマウスを利用したマウス接種法
  - b) 培養細胞を利用したウイルス分離法

## 1. 直接蛍光抗体法

直接蛍光抗体法は脳の海馬、延髄、小脳を含む3ヶ所以上について行う。唾液腺の染色は咬傷時のウイルス排泄を知る1つの手掛かりとなる。ヒトでは主に項部皮膚生検、唾液、脳脊髄液、気管吸引材料、角膜の塗抹標本等を使用して生前診断が行われる。特にウシ、ウマなどの大型の動物ではウイルスの抗原分布に偏りが見られるため検査部位を増やす必要がある。コウモリやマウスなどの小動物では脳全体に対して複数の塗抹標本を作製する。

<必要な試薬、器具、機材（記載されている同等品を使用）>

- \* 検査用標識抗体（Rabies FITC KIT/ CENTOCOR FITC anti-rabies monoclonal globulin、Fujirebio diagnostics,inc.（PBS(-)で50倍に希釈して使用）もしくはBBL anti-rabies globulin/ Fluorescein label.、Becton Dickinson Microbiology Systems（PBS(-)で100倍に希釈して使用）；希釈抗体溶液中には1%エバンスブルー溶液を20μl/ml加える）
- \* リン酸緩衝液（PBS(-)）
- \* 蒸留水
- \* 封入材（50%グリセリン-PBS(-)、pH8.5）
- \* ハサミ
- \* ピンセット

- \* 舌圧子もしくはペーパータオル
- \* 無蛍光スライドガラス（8穴、テフロンコーティング：HTC Super cured autoclavable）
- \* 塗抹標本固定用染色バット
- \* アセトン
- \* ベンチコート（検査材料等の飛沫吸収用に作業領域全域に敷く）
- \* 湿潤箱（蛍光抗体反応用）
- \* 孵卵器（37℃）
- \* 落射型蛍光顕微鏡（FITC 検出用のフィルターを使用）

<検査手順（操作は安全キャビネット（クラスⅡ）内で行う）>

- (1) 摘出した脳から海馬、延髄、小脳の組織をそれぞれ1cm角大に切り出す。
- (2) 切り出した組織を舌圧子もしくはペーパータオル上に置き、組織に付着している血液（非特異反応の原因となりやすい）をできるだけ取り除く。スライドガラスの上面を組織片に向けて塗抹標本の作製を行う。厚い塗抹標本は脳組織の自家蛍光や非特異反応などにより蛍光顕微鏡での観察が困難となりやすいため、厚い標本を作成した場合は標本面を下にしてペーパータオル上でスライドを強く圧迫して組織を進展させるとよい。スライド標本は追検査用を含めて各組織について4枚から6枚作製する。
- (3) 作製した塗抹標本をキャビネット内で十分に風乾させる。
- (4) 染色瓶等に十分量の冷アセトンを満たしてこれにスライドを完全に浸す（30分以上の固定でウイルスは不活化される。1昼夜の固定でも抗原性には変化が見られない）。固定後はキャビネット内等で十分な風乾を行う。
- (5) 十分に風乾したスライドに十分量の標識抗体を反応させる。反応は室温20分で十分である。
- (6) 標識抗体反応後、十分量のPBS(-)にて洗浄を行う（10分間、2回）。
- (7) PBS(-)洗浄後、スライドを蒸留水に2～3秒浸して塩を除去した後に風乾を行う。
- (8) 染色操作の終了した圧片標本をグリセリンで封入して蛍光顕微鏡下で狂犬病ウイルス抗原を検索する。

顕微鏡観察：通常200倍で観察。抗原量の少ない検体や蛍光の弱い検体では400倍で詳細な観察を行う。

## 2. RT-PCR 法

RT-PCR法は脳組織以外に唾液や髄液、頸部の毛根部皮膚生検等（主に人の生前診断）についても行われる。複数の検体を取り扱う場合には、目的遺伝子の重複汚染に注意をはらい、可能であれば検査施設は一般の実験室と独立していることが好ましい。

<必要な試薬、器具、機材（記載されている同等品を使用）>

- \* Oリング付き2.0ml遠心チューブ (IWAKI、スクリューキャップマイクロチューブ、No:2758-020)
- \* RNA抽出液：TRI-ZOL reagent (GibcoBTL社、No:15596)
- \* クロロホルム
- \* イソプロパノール
- \* 逆転写酵素：RTase (Promega社、AMV reverse transcriptase、No:M5101)
- \* Taq DNAポリメラーゼ (TaKaRa社、TaKaRa Ex Taq、No:RR001A)
- \* RNase阻害剤 (Promega社、Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor、No:N2511)
- \* エタノール
- \* RNase free 蒸留水
- \* エチジウムブロマイド (EtBr)
- \* アガロース (Wako社、Agarose1600、No:017-09531)
- \* DNAサイズマーカー (New England BioLabs, Inc.、1kb DNA Ladder、No:323-2L)
- \* マイクロチューブ用遠心機 (TOMY社、MX-160)
- \* サーマルサイクラー (ASTECC社、PC707)
- \* 電気泳動槽 (コスモバイオ社、ミューピッド2)
- \* UVトランスイルミネータ (フナコシ社、CSF-10BF)
- \* ポラロイドカメラ (フナコシ社、DS-300)
- \* ポラロイドフィルム (Fujifilm社、FP-3000B)
- \* 逆転写用プライマー：10g [CTA CAA TGG ATG CCG AC]
- \* PCRプライマーセット
  - 1) フォワードプライマー：10g [CTA CAA TGG ATG CCG AC]、リバープライマー：304 [TTGAC GAA GAT CTT GCT CAT]、1468bpを増幅
  - 2) フォワードプライマー：N1 [TTT GAG ACT GCT CCT TTT G]、リバープライマー：N2 [CCCAT ATA GCA TCC TAC]、443bpを増幅
- \* グローブ

<検査手順（操作は安全キャビネット内（クラスII）で行う）>

ウイルスRNAの抽出：

- (1) 検査材料50～100mg当たり1mlのTRIZOL溶液でホモゲナイズを行う。検査材料はTRIZOL溶液の10%を越えてはならない。材料の容量に応じてチューブを選択するが、Oリング付きスクリューキャップマイクロチューブ（2.0μl）を使用すると操作が容易で安全である。
- (2) ホモゲナイズした溶液を室温（15～30℃）で5分間静置する。
- (3) 使用したTRIZOL溶液1mlに対してクロロホルム200μlを加えてキャップを閉じた後に15秒間激しくボルテックスで攪拌を行う。
- (4) 室温（15～30℃）で2-3分間静置した後に2～8℃、12,000 xgで15分間の遠心を行う。
- (5) 遠心により分離した液相を新しいチューブに移して使用したTRIZOL溶液1mlに対してイソプロ

パノール 500 $\mu$ l を加えて室温 (15 ~ 30  $^{\circ}$ C) で 10 分間静置を行う。

- (6) 静置後、2 ~ 8  $^{\circ}$ C、12,000 xg で 10 分間の遠心を行う。
- (7) 遠心後の上清を取り除いた後で、使用した TRIZOL 溶液 1ml に対して 75% エタノール 1ml を加えてボルテックス後に 7,500 xg で 5 分間の遠心を行う。
- (8) 遠心上清を取り除いた後に 5 ~ 10 分間の乾燥を行い 50 $\mu$ l の蒸留水 (RNase 不活化処理をした) に溶解して使用直前まで -80 $^{\circ}$ C に保存しておく。

逆転写反応 (RT 反応) :

- (1) ウイルス RNA 溶液 10 $\mu$ l に逆転写用プライマー (10g) 1 $\mu$ l (10pmol) を加えて 95  $^{\circ}$ C、1 分間の加熱後に水中で急速冷却を行った後に室温 (15 ~ 30  $^{\circ}$ C) とする。
- (2) ウイルス RNA と逆転写用プライマー混合液に順次 4 $\mu$ l の 5x 反応用バッファー、4 $\mu$ l の 2.5mM dNTP、1ml の RNasin、1 $\mu$ l の AMV RTase を加えて反応液の総量を 20ml とする。
- (3) 42  $^{\circ}$ C で 45 分間、95  $^{\circ}$ C で 5 分間の RT を行う。

PCR 反応 :

- (1) RT 反応終了溶液 1ml に順次 PCR 用プライマーセット [(1) 10g と 304] もしくは [(2) N1 と N2] を各々 1 $\mu$ l (10pmol)、10x ExTaq Buffer を 5 $\mu$ l、dNTP Mixture を 4 $\mu$ l、TaKaRaEx Taq (5U/ml) を 0.25 $\mu$ l 加えたのちに総量を蒸留水で 50 $\mu$ l として PCR 反応を行う。

PCR 反応は以下の条件で行う。

[プライマーセット [(1) 10g と 304]]

94 $^{\circ}$ C、1 分  
----- 94 $^{\circ}$ C、30 秒  
30 回 50 $^{\circ}$ C、30 秒  
----- 72 $^{\circ}$ C、90 秒  
72 $^{\circ}$ C、7 分

[プライマーセット [(2) N1 と N2]]

94 $^{\circ}$ C、1 分  
----- 94 $^{\circ}$ C、30 秒  
30 回 45 $^{\circ}$ C、30 秒  
----- 72 $^{\circ}$ C、90 秒  
72 $^{\circ}$ C、7 分

増幅遺伝子の確認 :

増幅産物をアガロース電気泳動後、EtBr 染色を行い UV 照射によって目的遺伝子の存在を確認する。

プライマーセット [(1) 10g と 304] では 1468bp の増幅遺伝子を確認する

プライマーセット [(2) N1 と N2] では 443bp の増幅遺伝子を確認する

### 3. ウイルスの分離方法

狂犬病ウイルスの分離は乳のみマウスを利用したマウス脳内接種法とマウス神経芽細胞腫由来培養細胞（MNA細胞）を利用したウイルス分離法で行うことが可能である。マウス接種法は簡便で検出感度の優れた方法ではあるが検査に長い日数（一般に21～28日間の観察が必要）を必要とする。一方、培養細胞を利用したウイルス分離法は簡便であり、短期間でウイルス分離が出来る。

#### a) 乳のみマウスを利用したマウス脳内接種法

マウス接種法による狂犬病ウイルスの分離は脳組織や唾液線の乳剤をマウスの脳内に直接接種して行う。なお、ウイルス分離の最終確認は前述の「直接蛍光抗体法」によるウイルス抗原の検出で行う。生後3日以内のマウスが最も感受性が高いが、性成熟したマウスの使用も可能である。狂犬病ウイルスに対する感受性は雌雄間で差がない。

<必要な器具等（記載されている同等品を使用）>

マウス：

1から3日令の乳のみマウスもしくは6週令以前の成熟マウスを使用（Swiss albino、BALB/c、ICR等の白色マウスを使用する）

- \* マウスケージ
- \* 給餌及び給水器
- \* 麻酔瓶
- \* ハサミ
- \* ナイフ
- \* ピンセット
- \* 舌圧子
- \* 針と注射器（ツベルクリン用、25 $\mu$ l容量、2段針もしくは1.0mlデイスポ注射器、27～26ゲージ針）
- \* ホモゲナイザー（破碎する組織の大きさに応じたものを使用）
- \* 10～50%の非動化済み動物血清（ウマ、ウサギもしくはハムスター）を含む生理食塩水もしくはPBS(-)等の緩衝液（組織をホモゲナイズするのに使用）
- \* 麻酔用エーテル
- \* ピペット
- \* オートピペッター
- \* 試験管もしくはコニカルチューブ（乳剤の希釈及び分注）

<検査手順（操作は隔離された専用の感染実験動物区で行う）>

感染乳剤の作製：

感染乳剤は無菌的に作製する。接種乳剤中には重量あたり10%の検査組織が含まれるように調整する。乳剤は接種前に少なくとも30分以上静置してその上清を接種に使用する。もし可能であれば、5分間、150～200 x gの遠心を行いその上清を接種に使用する。細菌汚染を防ぐために乳剤作製に使用する緩衝液にストレプトマイシン（100mg/ml）とペニシリン（100U/ml）を加える。

マウスへの接種方法：

マウスへの乳剤接種はエーテル等で麻酔してから行う。親指でマウスの下顎、人さし指で反対側の頭部を抑えてマウスの頭部を固定する。一方の手で注射器をもちながら針をマウスの右目と右耳の間点の頭頂部から脳内に0.1～0.2cm刺して30 $\mu$ lを注入する。接種の終わったマウスは速やかにマウスケージに移して次の接種を始める。接種事故によりマウスが死亡しないことを確認して狂犬病発症の観察に移る。もし、接種後短時間（2日以内）にマウスが死亡した場合は廃棄して別の接種マウスを加えて数をそろえる。

マウスの観察：

狂犬病ウイルスを脳内に接種されたマウスが接種後5日以内に病的症状を示すことはまれではあるが、接種1日目から毎日観察を行うことが望まれる。

接種マウスは、その数、病状、死亡について21日間継続して観察と記録を行う。

<記録すべきマウスの症状>

- \* 体毛の逆立
- \* 振戦（尾をピンセットでつまみ上げて空中で観察）
- \* 後肢の協調運動の欠落（テーブルに置いて歩かせて観察）
- \* 麻痺
- \* 衰弱（瀕死状態）

ウイルスを接種して24～48時間で死亡したマウスは狂犬病ウイルスではなく、ウイルス接種時の外傷による場合や細菌感染もしくは狂犬病ウイルス以外のウイルス感染によるものである。

ウイルス接種5日目以降から、診断目的のために1ないし2匹のマウスを毎日致死処分して直接蛍光抗体法によるウイルスの検査を行う（付属書11.確定診断のための「(A)検査方法」(P.79)を参照)。ウイルス検査に必要なマウス脳の取りだしは「付属書10.確定診断の為の「(B)脳の取出し方」(コウモリ、マウス等)」(P.76)を参照する。

## b) 培養細胞を利用したウイルス分離法

狂犬病ウイルスの分離はマウス神経芽細胞腫由来培養細胞（MNA細胞）によって行う。本培養法

は、マウスによる検査系の欠点である長い検査日数（一般に21～28日間の観察が必要）を必要としない点がすぐれているが、野外株によっては抗原の検出が難しい場合がある。

<必要な試薬と機材（記載されている同等品を使用）>

- \* 組織培養フラスコ（IWAKI、25cm<sup>2</sup> フラスコ、No：4100-010）
- \* 培養液（EMEM-10：MEM培地（SIGMA社、MEM、No：M-4655）に10%ウシ胎児血清に抗生物質（100U/ml-Penicillin、100mg/ml-Streptomycin）・抗カビ剤（0.25mg/ml、アンホテリシンなど）を加える）
- \* ウシ胎児血清（SIGMA社、No：F2138）
- \* 抗生物質（GIBCO社、Penicillin-Streptomycin、No：1570-063）
- \* 抗カビ剤（WAKO社、Amphotericin B、No：015-13361）
- \* トリプシン（Cellgro社、0.05%-Trypsin/E.TA、No：25-052-C1）
- \* メンブランフィルター（Millipore社、Millex-G5、No：15070-063）
- \* Oリング付き1.5ml遠心チューブ（IWAKI、スクリュウキャップマイクロチューブ、No：2752-015）
- \* ディスポザブルピペット（1ml、5ml、10ml）
- \* ピペットエード
- \* CO<sub>2</sub> インキュベーター（5%-CO<sub>2</sub>、35℃）
- \* スライドグラス（8穴、テフロンコーティング：HTC Super cured autoclavable）
- \* 検査用標識抗体（1. 直接蛍光抗体法で使用しているものと同等品）

<検査手順（操作は安全キャビネット（クラスII）内で行う）>

- (1) Oリング付き1.5ml遠心チューブに800ulのEMEM-10を準備する。
- (2) およそ50mgの検体を遠心チューブに加えて20%のホモゲナイズ液とする。
- (3) 遠心（4℃、1600回転、10分）を行い破碎した組織を沈殿させる。
- (4) 遠心上清を1.5mlの培養細胞浮遊液（およそ2×10<sup>6</sup>個のMNA細胞を15mlコニカルチューブに浮遊したもの）に加える（細菌等の汚染が強い場合には0.22mm径のメンブランフィルターでろ過する）。
- (5) ウイルスと培養細胞の混和液を37℃で1時間培養を行う（15分ごとに攪拌。1時間以上の培養も可能）。
- (6) EMEM-10をウイルス-培養細胞液に加えて5mlに調整する。
- (7) ウイルス-培養細胞液を8穴のスライドに1～2滴滴下（5mlピペット使用）してスライド上で培養を行う。残りのウイルス-培養細胞液（およそ半量）は培養フラスコ（25cm<sup>2</sup>（50ml）フラスコ）で培養を行う。
- (8) 48時間後に8穴スライドをPBS（-）で軽く洗いアセトン固定を行う。
- (9) 標識抗体を用いて培養細胞内のウイルス抗原を確認する。

※ 前述（9）でウイルス抗原の確認が困難な場合や、検査成績が陰性でも臨床所見や疫学的情報から狂犬病ウイルスの感染が強く疑われている場合には以下に進む



- (10) (7) でウイルス-培養細胞液を播種した培養フラスコの培地を新鮮な培地と交換してさらに3日から4日間培養を継続する。
- (11) 継続培養が終了したら、トリプシン処理を行って培養細胞を培養フラスコからはがす。
- (12) EMEM-10 を培養細胞液に加えて5ml に調整する。
- (13) 8穴のスライドに培養細胞液を滴下して細胞をスライドに固着させる(3ないし4時間、もしくは翌日まで培養)。
- (14) アセトン固定後に標識抗体を用いて培養細胞内のウイルス抗原を確認する。
- (15) 判定、もしくはウイルスの回収。

cf. スライドグラスによる感染細胞の培養はシャーレ等の容器内で行いウイルス液の外部への飛散を防ぐ。使用したシャーレ等の容器内には湿らせたペーパータオル等を敷いてスライド上の培養液の蒸発・乾燥を防ぐ。

## 付属書 12. 犬・ネコ等の輸出入検疫について

### (1) 検疫が必要な動物の種類

	動物種
犬	イヌ科、イヌ属、イエイヌ1種
ネコ	ネコ科、ネコ属、イエネコ1種
きつね	イヌ科、キツネ・クルペオギツネ・ホッキョクギツネ・オオミミギツネ属、全種
あらいぐま	アライグマ科、アライグマ属、全種
スカンク	イタチ科、スカンク・マダラスカンク・ブタバナスカンク属、全種

### (2) 犬の輸入ができる空海港

空港	新千歳、新東京国際（成田）、東京国際（羽田）、名古屋、関西国際、福岡、鹿児島、那覇
海港	苫小牧、京浜、名古屋、大阪、神戸、関門、博多、鹿児島、那覇

## I. 輸入検疫

### ① 犬・ネコ

犬・ネコ	区分	狂犬病の予防注射を受けている <sup>1)</sup>		狂犬病の予防注射後30日を超えていない		家畜防疫官の許可を受けて係留場所で狂犬病の予防注射を実施		指定地域 <sup>3)</sup> から直接輸入され、健康証明書がある	指定地域以外の地域から輸入され、指定施設で隔離されていたこと等についての証明書がある <sup>4)</sup>	その他
		健康証明書がある <sup>2)</sup>	健康証明書がない	健康証明書がある	健康証明書がない	健康証明書がある	健康証明書がない			
犬・ネコ	けい留期間	14日	30日	注射を受けた日から係留を始めた日までの日数を		係留を始めた日から注射を受けた日までの日数に		12時間以内	30日	180日
				44日から差し引いた日数	60日から差し引いた日数	44日を加えた日数	60日を加えた日数			

② あらいぐま・きつね・スカンク

あ ら い ぐ ま  き つ ね  ス カ ン ク	区分	指定地域から直接輸入され、健康証明書がある <sup>3)</sup>	指定地域以外の地域から輸入され、指定施設で隔離されていたこと等についての証明書がある <sup>4)</sup>	その他
	係留期間	12時間以内	30日	180日

1) 狂犬病の予防注射： 注射後30日を超えており、かつ、不活化ワクチンの場合は180日以内、生ワクチンの場合は1年以内、輸出国政府機関がその有効期間を証明している場合はその期間内であること。

2) 健康証明に必要な事項： 狂犬病にかかっていない、又はその疑いがないこと。

3) 指定地域から輸入される犬等のうち12時間以内のけい留期間となるものの健康証明書に必要な事項：

- I. 狂犬病にかかっていない、又はその疑いがないこと。
- II. 当該地域において過去6カ月間又はその生産以来飼養されていたこと。
- III. 当該地域に過去6カ月間狂犬病の発生がなかったこと。

\*農林水産大臣の指定する地域は下記のとおり（平成13年5月末現在）。

アジア州： サイプラス、シンガポール、台湾

ヨーロッパ州： アイスランド、アイルランド、スウェーデン、ノルウェー、連合王国（グレート・ブリテン及び北アイルランドに限る。）

大洋州： オーストラリア、グアム、ニュー・ジーランド、フィジー諸島、ハワイ

4) 指定地域以外の地域から輸入される犬等のうち30日のけい留期間となるものの健康証明書に必要な事項：

- IV. 狂犬病にかかっていない、又はその疑いがないこと。
- V. 狂犬病に感染するおそれのある動物の侵入を防止できる施設として輸出国政府機関が指定し、農林水産大臣に通知した施設において過去6カ月間又はその生産以来隔離されていたこと。
- VI. 当該施設に過去6カ月間犬等が導入されていなかったこと。
- VII. 当該施設において過去6カ月間狂犬病の発生がなかったこと。

VIII. 輸出検疫

けい留期間は、12時間以内（輸出国の輸入条件がある場合、それに基づく検査）が必要となる。

## 付属書 13. 汚染物品等の消毒方法

(参考:「ハワイ州Rabies Contingency Plan Incident Command System 2001」、「Laboratory Techniques in rabies, Forth edition, World Health Organization」、「英国 Memorandum on Rabies February 2000,Prevention and Control」)

汚染された可能性のある「衣服」や「用具」は、家庭用の「消毒用石鹼」や「洗濯用洗剤」を使用した洗濯または「オートクレーブ滅菌」により狂犬病ウイルスを不活化することが可能であるが、所有者がいとわなければ衣服などは「焼却」する。

狂犬病の動物を飼育および解剖を行った部屋の床壁等は、「1%の温湯石鹼水」や「洗剤液」もしくは「第4級アンモニア塩」によって狂犬病ウイルスを不活化する事が可能である。

注) 洗剤等の噴霧により部屋を清浄化する前には、床や壁に付着した感染動物の飛散組織等の有機物を洗剤で十分に取り除いておくことが重要である。

ちなみに米国の動物検疫所の洗濯機は、通常の洗濯石鹼や家庭用の洗剤を摂氏63度で使用している。

## <対応の課題とその検討事項>

手引書中の箇所	課題とその検討事項
<p>通常時の対応</p> <p>(付属書1)</p>	<p>犬の所有者や医療関係者等の狂犬病に対する意識、知識が低いことから、今後とも啓発活動に努めることが望ましい。</p> <p>検疫対象動物以外の近年ペットとして飼育される、例えばコウモリのような動物についても、何らかの安全性チェックを検討することが望まれる。</p> <p>手荷物として検疫対象動物を検疫せずを持ち込まないように検疫制度を周知することが望まれる。</p> <p>狂犬病の感染の恐れのある作業に従事する者への免疫付与、安全装備の配備が望まれる。</p> <p>国内で狂犬病の発生が無い場合、狂犬病を発症した動物の臨床症状を直接経験することが出来ず、狂犬病を疑って診察等を行わないため診断が遅れるおそれがあることから、狂犬病発症動物に直接接触する可能性の最も高い獣医師等の関係者に対して、定期的に狂犬病の実態を把握できるビデオ、講習などによる意識の啓発などが望まれる。また、野生動物等では臨床症状の不明な部分が多く判断が困難なことから、流行国の発生状況や具体的な臨床症状等に関する情報収集を適時行い、必要な注意喚起を行うことが課題。</p>
<p>犬の抑留 (I.1.(2).ア)</p>	<p>狂犬病に感染している疑いのある動物を所有者宅で保管にしたい旨の希望があった場合には、まずは都道府県動物管理施設でけい留するよう勧めることとし、不可能な場合には感染の恐れがないよう十分に指導することが望まれる。</p> <p>都道府県動物管理施設にあっては、狂犬病予防法の施行通知(昭和25年10月5日厚生省発衛第170号)に記載の「一頭ずつけい留出来る設備のあること」に十分留意することが課題。</p>
<p>動物愛護 (I.1.(3))</p>	<p>確定診断のための犬等の致死処分に対する反対を想定し、確定診断に際しては緊急時の措置として必要であることの理解を得られるよう配慮することが課題。(環境省自然環境局総務課動物愛護管理室とも連携が望まれる)</p>
<p>野生鳥獣の捕獲 (I.4.(3).ア)</p>	<p>野生鳥獣の捕獲の場合、環境省等への許可申請は、必要が生じた都度行う必要があり、緊急時に間に合わないことが考えられることから、環境省等と協議し、狂犬病予防対策の場合は、特別事例として各年度始め等に事前に許可を受けておけるような対応の依頼を検討。</p>

<p>一斉ワクチン接種 (VI.3.(1).キ)</p> <p>(VI.3.(2).ク.(ウ))</p>	<p>また発生時に必要となる人及び動物用ワクチンの量についての試算を行うことが課題。</p> <p>一斉ワクチン接種の対象とする犬の範囲の検討も課題。</p>
<p>確定診断 (IV)</p> <p>(付属書10)</p> <p>(付属書11)</p>	<p>国立感染症研究所以外に検査実施可能な検査機関をリストアップすることが課題。</p> <p>検体の輸送手段について、あらかじめ想定して確保しておくことが望まれる。各自治体は少なくとも、狂犬病の疑いのある動物の頭部を切断し、国立感染症研究所に送付するための施設と職員を確保しておくことが望ましい。</p> <p>国立感染症研究所及び動物検疫所において直接蛍光抗体法に使用する抗体は輸入に頼っており、また人の生検を凍結材料として検査可能な機関がないことから、特異抗体の作成を行うか、遺伝子診断等の代替検査法を確立し、生検についてホルマリン固定材料を使用した検査方法を確立することが課題。</p> <p>輸入狂犬病ウイルスに対する新しい検査方法の検証が国内だけでは不可能なことから、狂犬病流行国との情報交換を常時行い、新しい検査方法に関する評価を含めた共同研究を積極的に行うことが望まれる。</p>
<p>人狂犬病発生子 防対策 (II.1.(3).ウ)</p> <p>(II.1.(3).エ)</p>	<p>1. 人抗狂犬病免疫グロブリン (HRIG)</p> <p>狂犬病暴露後発病予防は狂犬病ワクチン接種とHRIGまたはウマ抗狂犬病免疫グロブリン (ERIG) の接種によって行うことがWHOなどから勧告されている。しかし、日本ではHRIGやERIGは輸入も製造もされておらず、入手不可能である。日本においてERIGは技術的にただちに製造可能であると思われる。ただし、平時の需要はきわめて少ないと推測されるので、まむし抗毒素血清のように政府が一定量を買って備蓄する制度が必要であろう。HRIGはただちに製造することは不可能であろうが、一定量を海外メーカーから輸入することは可能であろう。ERIGはウマ由来で血清病の危険があり、またHRIGは人由来血液製剤であるため、製造量に限度があり、未知のウイルス混入を否定できないなどの問題がある。将来的には遺伝子操作によりHRIGと同等の抗狂犬病免疫グロブリンを微生物に生産させる技術の開発が望まれる。</p> <p>2. 組織培養狂犬病不活化ワクチン</p> <p>日本では1社が製造しているが、年間生産量は高々2万ドーズにすぎない。これは約3,500人分の暴露後発病予防に必要な量であり、約6,700人分の暴露前免疫を行える量に過ぎない。国内で狂犬病が発生した場合には医療および獣医療関係者の暴露前免疫を行うための狂犬病ワクチンさえも不足することが明白である。したがって、外国産の組織培養狂犬病不活化ワクチンの輸入が必要となる。平時には狂犬病ワクチンの輸入が必要でなくとも、緊急輸入の方法についても検討することが望ましい。</p>

<p>(Ⅱ. 1. (3))</p>	<p>3. 医療機関</p> <p>狂犬病暴露後発病予防を希望する咬傷被害者を受け入れて、接種スケジュールに従った狂犬病ワクチン接種を行える医療機関の数が絶対的に不足している。少なくとも各地の2次、3次救急病院では組織培養不活化狂犬病ワクチンを常備して、狂犬病常在地で咬傷を受けた被害者の処置要請に対応できることが望ましい。</p>
<p>厚生労働省と農林水産省の連携</p> <p>(動物検疫所における狂犬病の発生等について)</p> <p>(Ⅲ. 2)</p> <p>(Ⅴ. 2)</p>	<p>国立感染症研究所とのダブルチェックの必要性、疑わしい事例 (FA陽性等) は輸入禁止と判断する是非について、場合によっては厚生労働省の担当部局と相談できるような連絡体制の整備が課題。</p> <p>動物検疫所に置いて発生した場合、法律に基づく届出規定 (法第8条) のみであり、疫学情報等の収集規定がないことから、農林水産省及び厚生労働省のそれぞれ担当部局による連絡体制の整備が課題。</p>
<p>都道府県等の動物管理施設</p> <p>(I. 1. (2). イ. (ア))</p>	<p>自治体の動物管理施設の拡充を図り、疑わしい動物のけい留施設として、観察から致死処分、検体採取及び検体送付を一括して行えるよう整備することは、狂犬病対策はもとよりその他の動物由来感染症対策にも有益と思われ、その検討が望まれる。</p>

## <用語索引集>

### あ

アライグマ 33, 55, 59  
RT-PCR 法 79, 80, 81

### い

一斉検診 41, 43, 45,  
一斉ワクチン接種 41, 44, 45  
移動制限 43, 45  
犬 49, 55, 58  
犬のけい留命令 42

### う

ウイルスの分離方法 84  
ウイルス暴露を防ぐための環境 80

### か

飼い犬に関する条例 31  
海外渡航歴 61  
下顎唾液腺の取り出し方 75  
確定診断 35, 67, 79  
家畜防疫官 32  
家畜防疫官指定場所 32  
環境省 31, 41  
鑑別診断 48

### き

聞き取り調査票 27, 53  
キツネ 33, 55, 58  
狂犬病動物輸出国への情報提供 42  
狂犬病暴露後発病予防 34, 56  
狂犬病予防員 27  
狂犬病予防注射 43  
狂犬病予防法 7, 27  
狂犬病常在地 34, 58, 61  
狂犬病ワクチン 34, 42, 55, 56

### く

空港公団 33

### け

警察庁 41  
けい留命令 42  
検疫 32, 88  
健康局結核感染症課 37, 38, 40  
検査方法 79  
検体採取 37  
検体送付方法 67

### こ

抗狂犬病免疫グロブリン 34, 56  
咬傷犬取り扱い基準 57  
咬傷被害者への治療 55  
国立感染症研究所 36, 37  
コウモリ 55, 59, 76  
コヨーテ 55

### し

集合施設の禁止 43  
獣医病院 27  
消毒 90  
人体用狂犬病ワクチンの種類 65

### す

スカンク 33, 55, 58

### せ

税関 40  
生前診断のための検査 61

### た

WHO狂犬病暴露後発病予防治療指針 56



## ち

地域別狂犬病危険動物種 55  
致死処分 28, 52  
地方衛生研究所 28, 37  
鳥獣保護及狩猟ニ関スル法律 31  
調整会議 39  
直接蛍光抗体法 38, 61, 62, 79, 80

## つ

通行遮断 44

## と

頭部切り離し 67  
動物愛護協会 40  
動物管理施設 27, 28  
動物検疫所 31, 32, 37, 39  
動物咬傷歴 61  
動物の愛護及び管理に関する法律 31  
動物の保管依頼書 27, 51  
動物の輸入検査における検査実施項目等の指針 32  
動物用生物学的製剤協会 41  
登録 46

## に

日本医師会 40  
日本獣医師会 39, 41

## の

脳の取り出し方 69  
農林事務所 31  
農林水産省生産局畜産部衛生課 37, 39

## は

破傷風トキソイド 34  
暴露後発病予防 34, 56

## ひ

病原体等安全管理規定 68

## ふ

「FORTH (フォース) 海外渡航者のためのホームページ」 32  
物資調達 42, 44

## ほ

報道 40, 42  
放浪動物 31  
捕獲 31  
保健所 27  
保健所長 27

## ま

マウス脳内接種法 84  
マンゲース 34, 55, 58, 59

## や

薬殺 44  
野生動物 31, 35

## ゆ

輸出国政府発行の証明書 32  
輸出入検疫 32, 46, 88

## り

臨床診断 27

## れ

連絡会議 40

## わ

ワクチン接種可能医療機関 32

# 手引書作成に際して検討した事項（参考文献等）目次

1. 米国ハワイ州関係資料	99
資料の分析と紹介 国立感染症研究所獣医科学部 井上 智	
(1) 1991年にハワイで発見された狂犬病感染コウモリに関する論文	99
(2) ハワイ州「Rabies Contingency Plan 2001（狂犬病危機管理プラン2001）」	106
2. 米国獣医学協会「動物狂犬病の予防対策概説 2001年版」	115
資料の分析と紹介 国立感染症研究所 井上 智	
(1) 「動物狂犬病の予防対策概説 2001年版」	116
(2) 「動物狂犬病の予防対策概説 2001年版」の変更点	117
(3) 「動物狂犬病の予防対策概説 2001年版」の全文	119
3. 英国農務省「検疫と狂犬病 1998年」	129
資料の分析と紹介 農林水産省動物検疫所 大友 浩幸	
検疫と狂犬病（Quarantine & Rabies）（抜粋）	
(1) 狂犬病発生のリスクアセスメント（第10章）	130
(2) 欧州連合内の他国での狂犬病予防対策（付属書9）	149
4. 狂犬病発生時に関する我が国の地方獣医師会へのアンケート調査	157
アンケート調査結果の分析 東京都獣医師会 佐藤 克	
アンケート調査結果	164
5. 狂犬病予防法の逐条解説	165
資料の分析と紹介 東京都動物保護相談センター 四宮 勝之	
兵庫県県民生活部生活衛生課 沼田 一三	
「狂犬病予防読本 原田雪松著（昭和26年5月3日発行）」（抜粋）	

### 1. 米国ハワイ州関係資料

「1991年にハワイで発見された狂犬病感染コウモリに関する論文」

「ハワイ州 Contingency plan 2001 (狂犬病危機管理プラン 2001)」

国立感染症研究所 井上 智

ハワイは、米国で唯一の狂犬病清浄州である。州内に入ってくるすべての犬・ネコは、1912年から1997年まで120日間の検疫期間が義務づけられてきた。ハワイ州が同等か、より厳しい調査および検疫プログラムによって狂犬病が存在しないと認めている英国、オーストラリアおよびニュージーランドからのみ犬・ネコの直接空輸が例外として認められている。このような状況下で、1991年にカリフォルニアから到着したコンテナ船内で狂犬病に感染したコウモリが発見されて大きな話題となった。この事件以降、ハワイ州では狂犬病に対する対策とその在り方が大きく見直される事となり、1992年には各関係方面における狂犬病対策の現状解析と偶発的に起りうる狂犬病の発生に対する最も効果的な対応手順と課題を示した報告書「Rabies contingency plan. Incident command system. 1992.」が提出された。本報告書は、毎年見直しをするものとして現在最新版として「Rabies contingency plan. Incident command system. 2001.」が報告されている。

報告書の構成は以下のとおりであり、我々は特に、「10. 動物検疫所危機管理計画」を本研究において分析し参考とした。

#### < Rabies contingency plan. Incident command system 2001 >

1. 協力機関
2. 狂犬病諮問委員会
3. 診断の確定
4. 人の狂犬病予防：勧告及び費用
5. 人の狂犬病ワクチン製剤の取得および配布
6. 動物における兆候及び症状
7. 噛む動物の評価
8. 狂犬病検査のための標本提出
9. 狂犬病検査のための部門間調整
10. 動物検疫所危機管理計画
11. 保険局疫病部予備的計画

12. 保険局媒介動物管理部予備的計画
13. 保険局試験所予備的計画
14. 農業局動物試験所予備的計画
15. ハワイ動物愛護協会迷い動物予備的計画
16. ハワイ獣医協会緊急大量ワクチン接種予備的計画
17. 調査様式
18. 新聞発表草案

現在、日本国内では狂犬病の発生報告が無いが、これは1950年に制定された「狂犬病予防法」により犬の狂犬病対策が強力に推進された結果である。1956年の犬6頭を最後に現在まで1例も狂犬病の報告がないが、海外で犬の咬傷を受けて帰国後に狂犬病を発症して死亡した例が1970年に1例報告されている。感染症予防法の改正に伴う狂犬病予防法改正により2000年度から検疫の対象動物として犬以外にネコ、アライグマ、キツネ、スカンクを加えて、野生動物の輸入による狂犬病の国内侵入阻止が強化される事となったが、一方で、海外の狂犬病流行国からの帰国者や訪問者、もしくは持ち込まれたペットが狂犬病となった場合の対策、さらには検疫対象外である輸入コウモリ等の野生動物に対する対策が十分に検討されていない。

今回、国内で狂犬病が発生した場合に迅速かつ適切な対応を行える「狂犬病発生時の対応手引書(案)」を作製するにあたり、ハワイ州の公衆衛生獣医師であり先に示した「Rabies contingency plan. Incident command system. 1992.」作成の中心的人物であるSasaki博士から、ハワイで毎年更新されている「Rabies contingency plan」の最新版と1992年に報告された一連の文書、さらには、ハワイにおける狂犬病対策見直しのきっかけとなった1991年のコウモリに関する論文を本研究班で検討する参考資料として送っていただいた。1991年に「Rabies contingency plan」以前の段階で狂犬病コウモリのハワイ本土への上陸が未然に防がれた経緯は、狂犬病に感染した動物が日本で発見された場合の対応における貴重な参考資料となるであろう。1991年の事例で、狂犬病に感染していたコウモリの上陸が未然に防がれて社会的な混乱を引き起こすことなく事態を解決できたのは、領域を越えた関係各機関の密接な連帯と迅速な対応の結果であると報告している。ハワイにおける狂犬病対策は、厳しい検疫と指定された家畜以外はいかなる動物も輸入しないという背景で行われており、狂犬病に感染した動物の摘発体制や、狂犬病の確定診断に関しては本国にCDCが控えている。ハワイでは緊急時の対応策が十分に整っており、日本での状況とは異なる部分があるが、狂犬病清浄国の狂犬病対策と現状を解析する重要な資料として「1991年にハワイで発見された狂犬病感染コウモリに関する論文」と「ハワイ Contingency plan 2001」を以下に添付する。

Sasaki博士から頂いた多くの資料は、「狂犬病発生の疑いがある場合の対応手引書(案)」を作成するに際して狂犬病清浄国における狂犬病対策の在り方と課題点を理解する上で非常に役に立つものであった。しかしながら、ハワイにおいて10年近い歳月を費やして更新されてきた「Rabies contingency plan」と同じものが本研究班の数カ月で出来るはずもなく、Sasaki博士の厚意に答えるためにも今回報告する「狂犬病発生の疑いがある場合の対応手引書(案)」が毎年更改されて、日本の狂犬病対策の一助となっていくことを願う。