

厚生科学研究費

生活安全総合研究事業

侵入動物及び侵入ベクターの
サーベイランスシステム構築に関する研究

平成 11 年度 研究成果報告書

平成 12 年 3 月

班 長 内 田 幸 憲

神 戸 検 疫 所

厚生科学研究費

生活安全総合研究事業

侵入動物及び侵入ベクターの
サーベイランスシステム構築に関する研究

平成11年度 研究成果報告書

平成12年3月

班 長 内 田 幸 憲

神 戸 検 疫 所

目 次

■ 総括報告、分担研究報告書

総括研究報告

- 侵入動物および侵入ベクターの
サーベイランスシステム構築に関する研究…………… 1
内田 幸憲（神戸検疫所）

分担研究報告

1. 遺伝子分析による侵入動物の
実態調査に関する研究…………… 5
鈴木 荘介（名古屋空港検疫所支所）
2. 侵入ベクターのサーベイランスシステム構築に関する
予備的研究・・・特に蚊科について……………42
内田 幸憲（神戸検疫所）
3. コンテナ貨物による侵入ベクターの
調査と防除に関する検討……………51
内田 幸憲（神戸検疫所）
4. 高感度・高特異的な改良 one stop RT-PCR 法を用いた、
媒介蚊からのデングウイルスの検出……………64
倉根 一郎（国立感染症研究所）
5. クリミア・コンゴ出血熱ウイルスの組換え核蛋白を
用いた抗体検出システムの開発……………70
倉根 一郎（国立感染症研究所）
6. 諸外国の人獣共通感染症にかかわる動物およびベクターの
サーベイランスに関するアンケート調査……………75
内田 幸憲（神戸検疫所）

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

総括研究報告書

侵入動物及び侵入ベクターのサーベイランスシステム構築に関する研究

主任研究者 内田 幸憲 （神戸検疫所長）

研究要旨：

世界的に感染症輸入のボーダレス化を迎えている状況下、侵入動物・侵入ベクターのサーベイランスシステム構築が望まれる。侵入動物の遺伝学的検査法（染色体検査、生化学的標識遺伝子(Hbb)検査およびミトコンドリアDNA検査）による調査により、小樽港ではオセアニア型のクマネズミが侵入定着していることを初めて確認し、横浜港では外来種のハツカネズミの存在を確認した。ネズミ族の分類同定の手法として遺伝学的検査法は極めて有効であった。蚊の同定法として分子生物学的分類法を文献により検討したが実践的には形態学的分類法の方が勝っていると判断した。病原体検査法では、デングウイルス保有蚊からのデングウイルスゲノムの高感度かつ特異的な増幅・検出を行うために改良した one step RT-PCR 法を確立した。クリミア・コンゴ出血熱スクリーニング検査では人血清での IgG ELISA 法及び蛍光抗体法を確立し、動物・ベクターでの検査法確立のための基礎的検討が完了した。諸外国における人獣共通感染症サーベイランスシステムについてアンケート調査を実施した。10カ国中7カ国から回答があり、2カ国（アメリカ合衆国、フィリピン）は完全回答までに時間を必要とし保留を申し出ている。5カ国（韓国、シンガポール、オーストラリア、ニュージーランド、ドイツ）からは完全回答が得られた。5カ国すべてでサーベイランスが機能し、サーベイランス時期、地域、方法などは、対象疾病・動物・ベクターにより効率的に調整され、得られた情報はインターネットなどにより積極的に還元されていた。これらの結果を21世紀のサーベイランスシステム構築の基礎資料として活用したい。

分担研究者

倉根 一郎 (国立感染症研究所
ウイルス第一部長)
鈴木 荘介 (名古屋空港検疫所支所長)
内田 幸憲 (神戸検疫所長)

A. 研究目的

世界各地で新興再興感染症が発生、増加し、その半数以上は、動物・ベクター由来の感染症(人獣共通感染症)である。一方、物質の大規模な国際交流を背景に、世界的に感染症輸入のボーダレス化を迎えている。新たな感染症の脅威は我が国においても外来感染症の増加とその多様性が懸念され、これら感染症の媒介能を有する侵入動物・侵入ベクターに対する検疫体制にも抜本的な対応を含む問題を提起している。初年度の本研究においては以下の6項目について調査及び研究開発を行うこととする。

①侵入動物の代表ともいえるネズミ族が外来性か否かを判定するために科学的手法である遺伝学的検査法を用いてその実効性を確認し、全国空海港におけるサーベイランス及びコントロールの基礎データとする。(鈴木他)

②侵入ベクターの代表である蚊科の分類同定において形態学的判定と分子生物学的判定のいずれが実用性が高いかを文献的に整理し、侵入ベクターサーベイランスへの活用について検討する。(内田他)

③侵入動物及び侵入ベクターを持ち込む可能性の高い輸入コンテナの調査を行う(内田他)。

④現在、最も危惧されている外来感染症の1つであるデング熱についてデングウイルス感染蚊の同定方法の確立をめざす。(倉根他)

⑤ウイルス性出血熱の1つであり、侵入動物または侵入ベクターによって持ち込まれる可能性が最も高いクリミ

ア・コンゴ出血熱のスクリーニング検査系の開発を行う。(倉根他)

⑥諸外国の人獣共通感染症サーベイランスシステムの実態調査を行う。(内田他)

B. 研究方法

種々の感染症の媒介体の代表であり、侵入動物の中心であるネズミ族について、外来性か否かの判定を科学的手法である遺伝学的検査法(染色体検査、生化学的標識遺伝子検査及びミトコンドリアDNA検査)を用い我が国の港湾や空港で捕獲したネズミ、外国航路の船舶内で捕獲したネズミ及び台湾の国際港で捕獲したネズミについて検査を行った。もう一方の侵入ベクターの代表である蚊族について外来性か否かの判定を形態学的に行うべきか、分子生物学的に行うべきかいまだに学問的に定まらないため、文献的検討を行った。また、輸入コンテナからの侵入動物・侵入ベクターの調査を行なうための予備調査を神戸港、大阪港、関西空港において中国大陸からのもの、東南アジアからのもの、その他の地域からのものと大別してコンテナ内の衛生害虫等の調査を行った。蚊族の検査において、ウイルスに感染した媒介蚊の疫学情報を早期に得るために、デングウイルス感染蚊を用い、one step RT-PCR法を確立し、デングウイルスゲノムの検出について検討した。ウイルス性出血熱の病原体検査法の開発に関し、クリミア・コンゴ出血熱(CCHF)ウイルスのウイルス核蛋白のcDNAをパスツール研より供与を受けた。組換えバキュロウイルスを作製し、IgG ELISA法の開発を目指した。またCCHFウイルスの核蛋白(CCHF-NP)を恒常的に発現するHeLa細胞株を樹立して蛍光抗体法(IF法)

の確立を目指した。諸外国の侵入動物及び侵入ベクターサーベイランスシステムの調査は、質問票を作製し、人獣共通感染症にかかわる動物・ベクターのサーベイランスシステムの調査とし、カナダ、アメリカ合衆国、中華人民共和国、韓国、台湾、フィリピン、シンガポール、オーストラリア、ニュージーランド、ドイツの10ヶ国に電子メール、航空郵便またはファックスで送付した。質問票はA、Bに分かれ、質問票Aにおいてサーベイランスがなされているとの回答に限って、質問票Bに回答することとした。質問票Bでは黄熱、デング熱、日本脳炎などの蚊媒介性疾患、ラッサ熱、ハンタウイルス肺症候群などのげっ歯類媒介性疾患、クリミア・コンゴ出血熱、ライム病などのダニ媒介性疾患、そして狂犬病やその他の人獣共通感染症について疾病別のサーベイランスシステムについて、一疾病一シートの形式で質問した。

C. D. 結果と考察

全国の主要空海港、外国航路船舶にて捕獲したネズミの遺伝学的検査において、小樽港では、オセアニア型クマネズミの侵入定着が初めて確認された。横浜港では東南アジア、中国華南地方に広く分布するキャスタネウスマウスや欧州やオーストラリアなどに分布するドメスティカスマウス（いずれもハツカネズミ）が存在することが確認された。また、船舶内でのネズミは、それぞれ自国から船内へ侵入したネズミであることが確認された。台湾で捕獲したネズミは在来種であり、日本の在来種との比較ができた。いずれにせよネズミの分類同定法として外部形態のほかに遺伝学的検査法を導入することは、外来種を決定するため

に大いに有効であった。また、外来種の由来地域が同定できる場合には、侵入ネズミ族の病原体検査は由来地域での疾病状況により選択的かつ効率的に行えるものと推測される。侵入ベクターの代表である蚊科の分類同定についての文献的検討を行ったが、分子生物学的同定は近年始まったばかりで、外来性か否かの判定を行うサーベイランス現場で利用するまでには至っていないと思われた。現状では形態学的判定を行うとともに、蚊が保有する病原体検索を併用することが望まれる。輸入コンテナ調査のあり方は、コンテナの形態変化なども再度考慮し、諸外国のサーベイランスシステムなども参考にして実効性の高い方法を検討する必要があると考える。病原体保有蚊からのウイルス検出が最も望まれるデングウイルス検出法について今回はデングウイルスゲノムの高感度かつ特異的な増幅・検出を行うために改良した one step RT-PCR法を確立した。本法を用いて1個体の陽性蚊、49個体の陰性蚊のプールからデングウイルスゲノムを検出することができた。本症流行地での媒介蚊対策を検討する際に、本ウイルスを保有している媒介蚊の動態を把握することに本法が応用されることが期待される。CCHFウイルス核蛋白（CCHF-NP）を抗原とするIgG ELISA法やIF法の確立をし、この検査法が感度と精度ともに高いものであることを確認した。BL4の高度安全研究施設が可動できない我が国において重要な検査法が開発された。この系は人血清に対する反応系であるため、今後は侵入動物・ベクター（ネズミ、マダニ）のスクリーニング検査にも応用できるものとしたい。諸外国のサーベイランスシステムに関するアンケート調査で

は、韓国、シンガポール、オーストラリア、ニュージーランドの5ヶ国から最終回答が得られた。アメリカ合衆国とフィリピンは回答が間に合わなかった。回答のあった5ヶ国すべてで、サーベイランスシステムが機能していた。水際防疫としてのサーベイランスは、シンガポール、ニュージーランドで行われていた。サーベイランス期間・時期、サーベイランス地域、サーベイランス方法は、対象疾病、動物・ベクターにより効率的に調整されていた。サーベイランスで得られた検査資料は、バイオセーフティ規則に従い厳重な管理運営がなされ、サーベイランスにより得られた情報はインターネットなどにより積極的に還元されていた。

E. 結論

初年度の研究計画は十分に達成できた。遺伝学的検査による侵入動物の実態調査では、小樽港、横浜港において外来種のネズミの定着、存在が確認された。侵入ベクターの代表である蚊科の分子生物学的解析の現場での応用は現状では利用するまでに至っていないが、デングウイルス陽性蚊の同定が可能となり、デングウイルスを保有している媒介蚊の動態を把握することが可能となった。また、CCHF ウイルスの特異抗体をIgG ELISA 法やIF 法で検出できるようになり、ネズミ血清等のスクリーニング検査の基礎検討が完了した。諸外国における人獣共通感染症にかかわる動物及びベクターサーベイランスシステムのアンケート調査では、5ヶ国から最終回答が得られたが、さらに詳しく分析整理を行うとともに、期限までに回答されなかった国からの情報を加えて、21世紀の日本と世界の人獣共

通感染症サーベイランス体制作りに寄与する資料としたい。また、侵入動物及び侵入ベクターのサーベイランスシステム作りにおける中核的理論構築の資料としても活用したい。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 内田 幸憲：伝染病予防法改正に伴う動物由来感染症対応の方向性、関西実験動物研究会会報 19. 101～114. 1998.

2) 内田 幸憲：検疫法の改正、感染症と化学療法 4. 22-25. 1999.

2. 学会発表

1) 鈴木 荘介、蔦宗 俊明、青木 英雄、飯塚 信二、島村 博、内田 幸憲、米川 博通、土屋 公幸：日本の港湾区域等におけるネズミの遺伝的特性に関する調査研究：第2回日本検疫医学会 東京 2000.

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

遺伝子分析による侵入動物の実態調査に関する研究

分担研究者 鈴木 莊介（名古屋検疫所）
研究協力者 青木 英雄、飯塚 信二（横浜検疫所）
米川 博通、津田 薫（東京臨床医学総合研究所）
土屋 公幸（宮崎医科大学）
張 鴻仁（中華民国行政院衛生署疾病管制局）

研究要旨

日本と台湾の港湾区域で捕獲されたネズミの分類同定を外部形態による他、染色体、生化学的標識遺伝子（Hbb）及びミトコンドリアDNA（mtDNA）の遺伝学的検査法により外来種を決定するための調査を行った。日本の港湾区域におけるクマネズミの染色体数は、在来種のアジア型（ $2n=42$ ）が主体であったが、北海道小樽港のクマネズミは、11頭の全てがオセアニア型（ $2n=38$ ）の外来種であった。ハツカネズミは、mtDNAによる解析を行うと、横浜港には日本在来のモロシヌスマウスの他に、東南アジアや中国華南地方に広く分布するキヤスタネウスマウスや欧州、新大陸に分布するドメステिकासマウスが存在した。小樽港、関西空港、松山港、門司港及び博多港のハツカネズミは、全てモロシヌスマウスで、名古屋港はモロシヌスマウスとキヤスタネウスマウス、那覇港はモロシヌスマウスとキヤロライとの混在であった。外国航路の船舶内におけるクマネズミは、染色体数 $2n=42$ のアジア型であって、Cバンドから各々自国から侵入したネズミであった。台湾で捕獲されたネズミ等は、ドブネズミ、クマネズミ、*R. losea*、ハツカネズミ、ジャコウネズミであった。ハツカネズミは、mtDNAから台湾在来のキヤスタネウスマウスであった。Hbbパターンは、クマネズミがa、ab、b、ドブネズミがA、AB、B、ハツカネズミがp、d、s、p/dと各々多型であった。アカネズミ、プラティスリックス、ナンヨウネズミ、ミラルディア、ジャコウネズミ及び*R. losea*は、Hbbパターンによって各々他の種類と区分が可能であった。日本の港湾区域には外来種のネズミが侵入定着していたが、台湾のネズミ等は在来種であった。ネズミの分類同定の手法として、外部形態の他に遺伝学的検査法を導入することは、外来種を決定するために極めて有効であった。

A. 研究目的

近年における国際化の進展及び船舶・航空機の輸送手段の発達、ヒトの移動と貨物の国際物流の増加と広域化をもたらし、地球規模でのボーダレス化を進めている。このことは、世界各地で発生しているラッサ熱、ハン

タウイルス肺症候群（HPS）等の新興感染症並びにインドにおけるペスト流行等の再興感染症が、一地域にとどまらないことを意味している。即ち、ネズミは、ペスト、腎症候性出血熱、ハンタウイルス肺症候群、広東住血線虫症、ラッサ熱、リンパ球性脈絡髄膜炎等の各

種感染症を媒介する動物であることが広く知られている。同時にネズミは移動の媒体として船舶以外にも、最近では貨物の輸送形態の変化から船舶貨物コンテナや航空機の貨物の中に紛れて侵入している。また、日本の港湾区域で捕獲されたネズミは、1967年から1996年までの30年間で合計80,267頭にも達し、ドブネズミ (*Rattus norvegicus*) が最も多く、次いでハツカネズミ (*Mus musculus*)、クマネズミ (*R. rattus*) の順で、最近ではハツカネズミが占める率が増えている。この中には、分類が困難であったネズミも含まれており、1984年1月水島港ではHPSの病原体を保有することが知られているシカシロアシマウス (*Peromyscus maniculatus*) が1頭捕獲されていることが確認された。更に船舶で捕獲されたネズミは、合計16,957頭であって、クマネズミが最も多く、次いでハツカネズミ、ドブネズミの順で、そのいずれにも入らない「その他」のネズミが102頭も含まれていた。このように、船舶・航空機内や海港の港湾区域及び空港区域(以下、港湾区域等と略す。)のネズミは、外部形態の特徴により同定することが困難な事例に遭遇することが多く、同区域等には外来ネズミの侵入定着が考えられる。そこでネズミの分類を外部形態による他、染色体分析、生化学的標識遺伝子(Hbb)及びミトコンドリアDNA(mtDNA)の遺伝子分析法により調査を行った結果、港湾区域のクマネズミは、染色体数とCバンドの欠失を認めることからアジア型(2n=42)であった。ドブネズミは核型等による地域特異性は認められなかった。横浜港のハツカネズミは、mtDNAによって、日本在来のモロシヌスマウス(*Mus musculus musculus*)の他に台湾由来キヤスタネウス Maus(*M. m. castaneus*)及びドメステイカスマウス(*M. m. domesticus*)との混在が認められ、外来種の侵入定着が確認された。

今回、小樽港、名古屋港、門司港、博多港、高知港、松山港、関西空港の7港を新たに加え、

合計14カ所の港湾区域で捕獲されたネズミの分類同定を遺伝子分析による外来種の決定を行い、外来ネズミの侵入を調査した。また、台湾は日本と同じアジアに位置し、ヒトと貨物などの交流が頻繁であって、その交流の接点である国際港(基隆港、蘇澳港、花蓮港、高雄港)に生息するネズミの種類とその遺伝的特性を調査し、日本のネズミとの遺伝的特性を比較検討する。従って、ネズミによって運び込まれる感染症の侵入経路をネズミの由来から探る遺伝的分析法を検疫行政に導入のための方策を構築し、感染症侵入防止対策に活用する。

B. 研究方法

1. 調査場所

日本の港は国際港(小樽港、横浜港、成田空港、伏木港、富山港、七尾港、金沢港、名古屋港、関西空港、松山港、高知港、門司港、博多港及び那覇港)の14カ所の港湾区域と外国航路の船舶を対象とした。

台湾の港は国際港(基隆港、蘇澳港、花蓮港、高雄港)の4カ所の港湾区域を対象とした。

2. 調査方法

1) 日本の港湾区域等の調査は、毎月、定期的に行っているネズミの生息・駆除調査時に捕獲されたネズミを用いた。船舶内のネズミは、青酸ガス駆除等によって捕獲されたものを用いた(表1)。

台湾の港湾区域等の調査は、1999年11月から12月にかけて捕獲されたネズミを用いた(表2)。

2) 外部形態による分類

捕獲されたネズミは、今泉の原色日本哺乳類図鑑による外部形態の特徴により分類同定を行った。

3) 染色体による分析

染色体標本は、尾端部の培養細胞か骨髓細胞を用い、自然乾燥法によって作製し、ギム

ザ染色法、Gバンドはトリプシン法、CバンドはBSG法によって核型分析を行った。

ア. 染色体標本作製

ア) コルヒチン処理

ネズミの腹腔内にコルヒチン加生理食塩溶液(1mg/ml)をドブネズミ、クマネズミの成獣には1ml、ドブネズミなどの子供やハツカには0.3~0.5mlを注射し、1時間放置する。

イ) 骨髓細胞の洗い出し

エーテルを用いて麻酔し、大腿骨を関節から取りだし、大腿骨の両端を切り取った後、一端から生理食塩水1mlを注射器で注入して骨髓細胞を生理食水の入った遠心管に洗い出す。パスツールピペット(以下、ピペットと略す。)で静かに攪拌する。

ウ) 低張処理

1,200rpmで5分間遠心後、上清を捨て、0.075M KCl液(KCl 1.12gに蒸留水200mlを加える。)を2ml加え、静かにピペットで攪拌して37℃の恒温水槽内に15分間放置する。

エ) 細胞固定

低張処理後攪拌してから直ちに、固定液(無水エタノールと酢酸を3:1に混ぜたもの。)を5滴管壁に沿って徐々に加え、ピペットで静かに攪拌し、更に2倍量の固定液を加えピペットで静かに攪拌し、5分間置いてから1,200rpmで5分間遠心する。上清を捨て、固定液5~7mlを加え、ピペットで攪拌し、直ちに1,200rpmで5分間遠心する。再び上清を捨て、固定液0.2~0.5mlを加え、ピペットで攪拌し、骨髓細胞の濃い懸濁液を作る。

オ) 染色体標本の作製

55℃の恒温水槽内に、試験管立の上に無水アルコールで脱脂、ガーゼでよく拭いたスライドグラスを置き、水面とスライドグラスが触れない程度の水量とし、スライドグラス上に骨髓細胞の懸濁液を1~2滴落とし、乾燥させる。

イ. 染色法

ア) ギムザ染色法

ギムザ液(メルクのギムザ原液2mlに25倍量の1/15M PBS($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 11.94g、 KH_2PO_4 4.5gに蒸留水を加え、pH6.8とし、1ℓとする。)に染色体標本のスライドグラスを入れ、5分間染色する。両面を軽く水で流し、水を切り乾燥させ、顕微鏡観察及び撮影し核型分析を行った。

イ) Gバンド染色法

0.025%トリプシン加 pH6.8 PBS(1/15M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 23.9g/ℓを70ml、1/15M KH_2PO_4 9.1g/ℓを30ml)にトリプシン25mgを加え、静かに攪拌したもの。)に染色体標本のスライドグラスを入れ、30~45秒間処理、pH6.8 PBSの中で5秒間置き、ア)のギムザ染色液で2~3分間染色する。以下はギムザ染色法と同じ。

ウ) Cバンド染色法

0.2NのHClに染色体標本のスライドグラスを入れ30~40分間置き、軽く水洗いする。5%水酸化バリウムを55℃に加温、攪拌して上層の膜を除いて、5~10分間処理する。十分に水洗いしてから55℃に加温した2倍SSC(NaCl 17.52g、クエン酸ソーダ8.82gに蒸留水を1ℓ加える。)中に30分間置き、軽く水洗いする。ギムザ液で20~30分間染色する。以下はギムザ染色法と同じ。

4) 生化学的標識遺伝子による分析

生化学的標識遺伝子による分析としてヘモグロビンβ鎖(Hbb)の検索をセルロース・アセテート膜電気泳動法により行った。

ア、泳動用試料の作製

抗凝固剤(0.02%ヘパリン)を加えた血液を4~5倍容の生理食塩水でよく洗浄、遠心を3回程度繰り返した後、赤血球層に溶血試薬(30%ショ糖100ml、0.5% TritonX-100 0.5ml、tris-aminometane 0.1214g加)を加え、激しく振盪した後、3,000rpmで15分間遠心し、上層部を泳動用試料とした。

イ. セルロースアセテート膜電気泳動法

ア) 専用の泳動槽の両極槽にTris-EDTA-borate(pH8.4)緩衝液(tris-aminometane 10.9g、E

DTA 0.6g、boric acid 3.1g 蒸留水で1ℓにする。)を50mℓずつ入れ、細長く切った濾紙(チャンバーウイックス)を両極槽に浸す。

イ) タイタンⅢセルロースアセテート膜(ヘレナ社製)を緩衝液に静かに浸す(バッファライズ)。

ウ) 必要量の試料をサンプルウエルプレート(試料槽)に取り、試料をアプリケーション(試料塗布器)に移す。バッファライズしたタイタンⅢセルロースアセテート膜上に試料を取ったアプリケーションを乗せ試料を塗布する。エ) 塗布部分が泳動槽の陰極になるようにセルロースアセテート膜の面を下にして置き、電圧350V、30分間泳動する。

オ) 泳動時間が切れたら、膜の両極の緩衝液を濾紙で取り、ポンソーSにて6分間染色する。5%酢酸溶液で3~5分間3回洗い、バンドを分析する。

5) ミトコンドリアDNA(mtDNA)の分析

ア. mtDNAの抽出

ア) 捕獲したハツカネズミより肝臓又は尾を採取する。

イ) 肝臓又は尾からSDS-フェノール法で核酸を抽出する。

ウ) エタノールで核酸を沈殿させた後、TE緩衝液に核酸を溶解し、濃度を吸光度により測定する。

エ) 4℃、あるいは-20℃に保存する。

オ) PCRの直前に、濃度をPCRに適するように調整する。

イ. mtDNA-ループ内超可変領域のPCRによる特異的増幅

ア) ア. で抽出した核酸を用い、以下の組成でPCR用反応液を作成する。

PCR用反応液

核酸溶液 (10ng/μl)	2.5 μℓ
10倍濃度のPCR緩衝液	5.0 μℓ
MgCl ₂ 溶液 (25mM)	3.0 μℓ

dNTP (2mM)	2.5 μℓ
プライマーF (20mM) *	0.5 μℓ
プライマーR (20mM) *	0.5 μℓ
耐熱性DNA(Taq)ポリメラーゼ	0.5 μℓ
滅菌再蒸留水 (超純水)	35.5 μℓ

総量 50.0 μℓ

*HY-33 : 5'-CAC CAC CAG CAC CCA AA-3'

**HY-39R : 5'-TCA CGG AGG ATG GTA GA-3'

イ) 以下の条件でPCRを行う。

PCRの条件

前熱処理 (95℃) 5分

変性 (94℃) 30秒

アニーリング (55℃) 30秒

DNA鎖伸長 (72℃) 1分

後熱処理 (72℃) 5分

ウ) 5~10 μℓの反応液で特異的な増幅が起こったことを電気泳動とその後の臭化エチジウム染色により確認する。

ウ. DNAシーケンシングのためのPCR産物の精製

ア) MicroSpin S-300HR Columnsを用意する。

イ) 3,000rpm、1分間の遠心でカラム内の水分を除去する。

ウ) 上記のPCR反応液をカラムに注入する。

エ) 3,000rpmで2分間の遠心を行い、濾液を集める

オ) 濾液に存在する精製PCR産物をエタノールなどで沈殿させる。

エ. Dye terminator FSキットによるDNAシーケンシング

ア) シーケンシングのための反応液を作製する。

シーケンシング用反応液

精製PCR産物	8.8 μ l
ターミネータ混合液	8.0 μ l
プライマー (1pmol)	3.2 μ l
<hr/>	
総量	20 μ l

イ) 以下の条件でPCRを行う。

PCRの条件	
<hr/>	
変性 (96°C)	10秒
アニーリング (50°C)	5秒
DNA鎖伸長 (60°C)	4分
<hr/>	
後熱処理 (72°C)	5分

ウ) 自動シーケンサー (ABI Prism 373) によりシーケンシングを行う。

オ. 塩基配列の比較と系統樹の作成

ア) DNA塩基配列データを塩基配列解析ソフト (DNAsis) によって整列させ、その後Kimuraのtwo-parameter法により塩基置換率 (sequence divergence) を算出する。

イ) 得られた塩基置換率をもとに近隣接合法により系統樹を作成する。

C. 研究結果

1. 染色体調査

日本の港湾区域等において捕獲されたネズミ等の染色体調査結果をまとめたのが、表3、表4、表5、図1、図2及び図3である。

台湾の港湾区域において捕獲されたネズミ等の染色体調査結果をまとめたのが表6及び図4である。

1) クマネズミ (*Rattus rattus*)

清水港におけるクマネズミの染色体数は、37頭が $2n=42$ で、雌の1頭が $2n=41$ (XO型) を示し、いずれもアジア型であった。同じく伏木・富山港及び名古屋港のクマネズミは、 $2n=42$ のアジア型であった。その核型は図1に示すとおりであった。しかし、1999年9~11月

に捕獲された北海道小樽港のクマネズミは11頭全てが染色体数 $2n=38$ で、Cバンドパターンもオセアニア型と一致した。成熟した雄は、体重220~250g、後肢長35~38mmと大型であった。第1染色体の多型は、サブテロセントリック (Sと略す) とアクロセントリック (Aと略す) とに分けられ、清水港のクマネズミは、A/Aが最も多く、次いでA/S、S/Sの順であった。伏木港のクマネズミは、A/Aが5頭、A/Sが1頭であった。小樽港のクマネズミは、全てS/Sであった。

台湾の花蓮港におけるクマネズミの染色体数は、9頭の全てが $2n=42$ のアジア型で、その核型は図4のとおりであった。他の港ではクマネズミを捕獲できなかった。第1染色体は、全てA/Aであった。

2) ドブネズミ (*Rattus norvegicus*)

清水港など9カ所の港湾区域等で捕獲されたドブネズミ209頭の核型は、全て $2n=42$ であった。第3染色体の多型に関する調査では、小樽港、横浜港、三島、伏木港、清水港、名古屋港、大阪、博多港、那覇港及び北海道で捕獲されたネズミは、伏木港と三島を除いてA/Aが多く、伏木港では、A/Sが最も多く、次いでS/Sも多く、他の地域とは異なる第3染色体の多型を示した。

船舶内 (韓国船及び日本船) で捕獲されたドブネズミ3頭の染色体数は、全て $2n=42$ であった。第3染色体は、多型であった。染色体調査から地域特異性を見つけ出すことはできなかった。

台湾の基隆港など4カ所で捕獲されたドブネズミの染色体数は、44頭の全てが $2n=42$ で、その核型は図4のとおりであった。第3染色体の多型は、全てA/Aであった。

3) ハツカネズミ (*Mus musculus*)

清水港、伏木港、横浜港、名古屋港、門司港及び博多港の港湾区域で捕獲されたハツカネズミ17頭の染色体数は $2n=40$ であった。

台湾の花蓮港及び高雄港で捕獲されたハツ

カネズミの染色体数は、6頭の全てが $2n=40$ であった。

4) アカネズミ (*Apodemus speciosus*)

港湾区域等で捕獲されたアカネズミ39頭の染色体数は、伏木港及び富山港周辺のアカネズミが $2n=46$ 、成田空港のアカネズミが $2n=48$ であった。

5) ハタネズミ (*Microtus montebelli*)

伏木港及び金沢港の港湾区域で捕獲されたハタネズミ2頭の染色体数は、 $2n=30$ であった。

6) ジャコウネズミ (*Suncus murinus*)

那覇港の港湾区域で捕獲されたジャコウネズミ4頭の染色体数は $2n=40$ であった。

台湾の基隆港及び高雄港で捕獲されたジャコウネズミの染色体数は、 $2n=40$ で、その核型は図4のとおりであった。

7) *R. losea*

台湾の花蓮港で捕獲された*R. losea*の染色体数は、3頭全てが $2n=42$ で、その核型は図4のとおりであった。他の港では、*R. losea*を捕獲できなかった。

2. 生化学的標識遺伝子 (Hbb) による分析

各種ネズミにおけるヘモグロビン β 鎖(Hbb)の電気泳動像とその結果をまとめたのが図5及び表7で、その泳動像の模式図を示したのが図6である。また、日本の港湾区域等において捕獲されたネズミ等のHbbの結果をまとめたのが表8である。

台湾の港湾地域において捕獲されたネズミ等のHbbの結果をまとめたのが表9である。

1) クマネズミ

国立遺伝学研究所細胞遺伝部において維持されていたクマネズミのうち、日本産(奄美)のネズミのHbbパターンは、a、ab、bの3つの多型を示し、ホンコン産*Rattus flavipectus*、スリランカ産*R. r. kandianus*及びインド産*R. rattus*は、全てaタイプであった。また、港湾区域及び船舶に生息するクマネズミのHbb

パターンは、a、ab、b、の3つの多型を示していた。内訳は、清水港のネズミではaが最も多く93.8%、次いでabが6.2%の2つのタイプであった。小樽港ではaタイプのみであった。船舶内のネズミでは、韓国船がa、ab、bタイプの多型、インドネシア船と日本船がaとabの多型、台湾船がaタイプのみであった。クマネズミのHbbパターンは、他の種類とは明確に区分が可能であった。

台湾の花蓮港におけるクマネズミのHbbは、9頭全てがaタイプのみであった。

2) ドブネズミ

ドブネズミのHbbパターンは、A、AB、Bの3つの多型を示している。実験動物のWMfW、NIG III、WKS及びLEW由来のネズミのHbbパターンは、全てBで、BUF/Ms由来ネズミはABであった。同じく港湾区域のドブネズミのうち、清水港のネズミは、ABが最も多く42.2%、次いでAとBが共に28.9%で、横浜港ではABとBが共に47.7%、Aが4.6%、那覇港では、Bが最も多く92.3%、Aが7.7%であった。名古屋港ではBが最も多く62.5%、次いでAが37.5%、博多港ではBが最も多く75%、次いでABが25%であった。ドブネズミのHbbパターンは、他の種類とは明確に区分が可能であった。

船舶内で捕獲されたネズミのHbbパターンは、AとBがそれぞれ1頭であった。

台湾の基隆港など4カ所で捕獲されたドブネズミのHbbパターンは、49頭全てがBタイプのみであった。

3) ハツカネズミ

Hbbパターンは、p、d、s、p/dの多型であった。清水港のハツカネズミには、p型が89.6%と最も多く、s型も8.3%に認められた。また、横浜港ではd型が46.3%と多く、次いでp/d型23.8%とp型が18.9%に認められた。

台湾で捕獲されたハツカネズミのHbbパターンは、花蓮港の3頭がdタイプ、高雄港がdタ

イブ2頭、p/dタイプ1頭であった。

4) アカネズミ

アカネズミのHbbパターンは、2本のバンドが広く離れた型と1本のバンドとの2型を示した。

5) プラティスリックス

国立遺伝学研究所細胞遺伝部において維持されていたプラティスリックス(インド産)のHbbパターンは、2本のバンドの1型であった。2本のバンドを持つ種類は多種にもあるが、他の種類とは明確に区分が可能であった。

6) ナンヨウネズミ

国立遺伝学研究所細胞遺伝部において維持されていたナンヨウネズミ(タイ産)のHbbパターンは、2本のバンドの1型であった。2本のバンドを持つ種類は多種にもあるが、他の種類とは明確に区分が可能であった。

7) ミラルディア

国立遺伝学研究所細胞遺伝部において維持されていたミラルディア(インド産)のHbbパターンは、4本のバンドの1型であった。

8) ジャコウネズミ

那覇港におけるジャコウネズミのHbbパターンは、2本のバンドと3本のバンドの2型であった。

台湾で捕獲されたジャコウネズミのHbbパターンは、基隆港が2本と3本のタイプ、高雄港が3本のタイプの2型であった。

9) *R. losea*

台湾の花蓮港で捕獲された*R. losea*のHbbパターンは、3頭全てがaタイプのみであった。

3. ハツカネズミのmtDNA分析

mtDNA多型を調査するのに使用した領域は mtDNA上でD-ループ(重鎖複製開始点)と呼ばれる領域である。このD-ループ領域は、mtDNA上で最も塩基置換率が高いことが色々な動物で知られている。このことはハツカネズミでも例外でなく、例えば*M. m. domesticus*の1個体と上海産の*M. m. musculus*の全塩基配列を

比較した結果によれば、mtDNA全域での平均塩基置換率3.2%に対して10%、即ち3.7倍もこの値が高くなっている。ここでは、この平均塩基置換率が非常に高い部分をD-ループにおける超可変領域(以下、超可変領域と略す。)と呼ぶことにする。もしこの領域を使っても、4亜種の同定が、D-ループ全域を使用したときのように出来るならば、それぞれの亜種間での地域的な差さえもかなりの精度で検出することが可能になることが期待される。そこで、この部分のみで亜種の推定が可能か否かを判定するための実験を行った。

そこでまず、この超可変領域を特異的に増幅するプライマーを設計し、PCRで増幅した。その後自動DNAシーケンス法を用いてこの領域の塩基配列を決定し、最後にこれらの塩基配列を相互に比較し、分子系統学的な解析を加えることにより、この超可変部分のみで亜種の推定が可能か否かを判定した。また、D-ループ領域の模式図、使用したプライマーの位置、増幅される領域についての情報及び方法の詳細については図7及び研究方法にそれぞれ示した。

この実験の結果は以下の通りであった。まずこの図7に示したように、mtDNAのD-ループの全長877塩基対の5'-末端から3'-方向へ283塩基対のびた部分をPCRによって増幅し、DNAシーケンシングを行った。その結果、亜種、あるいはある個体群間で特異的に出現する塩基置換や、1~2塩基対の部分欠失を確認した。これらの塩基置換等は亜種に特異的な塩基置換と推定できたため、系統樹を作成した(図8)。解析した総計83頭、これらの全ての個体でそれぞれの亜種を同定できた。その内訳は、日本の港湾区域では、*M. m. musculus*に属するものが42頭(54.5%)、*M. m. castaneus*に属するものが24頭(31.2%)、*M. m. domesticus*に属するものが6頭(7.8%)及び*M. caroli*に属するものが5頭(6.5%)。台湾の港湾区域では、全て*M. m. castaneus*であっ

た。各港におけるハツカネズミのmtDNAによる種類の分布を示すと図9のとおりである。

D. 考察

1. 染色体調査

1) クマネズミ

世界のクマネズミは、Wilsonらの哺乳動物分類(1993)によるとYosida(1980)によって行われた遺伝学的調査を基に、アジアに分布し、染色体数が $2n=42$ を持つアジア型とアジア以外の地域に広く分布し、染色体数が $2n=38, 39, 40$ を持つオセアニア型との2つに大きく分類された(図10)。また、Yosida(1980)によると日本の北海道から沖縄までの内陸部におけるクマネズミの染色体数は、アジア型の $2n=42$ で、Cバンドの欠失が見られた。更に積雪量の多い地方では、第1染色体がサブテロセントリック(S)を認めていないのが特徴である。

日本の港湾区域で捕獲されたクマネズミは、清水港、伏木港及び名古屋港のクマネズミは、雌の1頭が $2n=41$ (XO型)を示した他、いずれも $2n=42$ のアジア型で第1染色体に多型が見られた。しかし、1999年9月北海道小樽港で捕獲されたクマネズミは、11頭全てが染色体数 $2n=38$ で、Cバンドパターンもオセアニア型と一致、外来種の存在が確認された。これらのクマネズミがどこの国から侵入したかを、輸入貨物と輸出国から調べると、最も多いのが米、雑穀、豆、麦などの穀類で、次いで肥・飼料、マトンがオセアニア型のクマネズミが分布する米国、カナダ、ブラジル、ニュージーランドから輸入されていた(表10)。一方、ロシアとの交流も盛んであるが、この地域にどのようなクマネズミが存在しているが不明である。また、侵入時期については、ネズミの捕獲・駆除の年次別推移から調べると、平成9年以降、港の全域でクマネズミが捕獲されはじめており、平成8年より以前に侵入したものと考えられた(図11)。従って、現

在までのところオセアニア型のクマネズミが何処からどの様な進路で侵入したかは確定できなかった。平成12年度は、mtDNA分析を加え北海道の国際港を詳細に調査したい。清水港のクマネズミは、アクロセントリック(Aと略す)A/Aが最も多く、次いでA/S、S/Sの順で、Yosidaが三島市のクマネズミを調査した結果とほぼ同様であった。伏木港のクマネズミは、A/Aが5頭、A/Sが1頭であった。Yosida、土屋らは、積雪量の多い地方で行った調査で、クマネズミの第1染色体にはA/Sを認めていない。伏木港も積雪量が多い地域に位置しており、ネズミが捕獲された場所は小型船舶を作る造船所であって、修理船舶内に紛れ込んだネズミが逃げ込んだ可能性もある。船舶内(韓国船、台湾船、日本船及びインドネシア船)で捕獲されたクマネズミ30頭の染色体数は、 $2n=42$ のアジア型で、かつCバンドパターンから各々自国から侵入したネズミと推測された。

台湾の花蓮港におけるクマネズミは、 $2n=42$ のアジア型で、第1染色体に多型が見られなく、台湾の在来種であった。Cバンドの分析は次年度に検討する。

2) ドブネズミ

1967年~1996年の30年間、日本の港湾区域等において最も多く捕獲されたのがドブネズミで76%を占めていた。清水港など9カ所の港湾区域等で捕獲されたドブネズミ209頭の核型は、全て $2n=42$ で、日本の内陸部での調査結果と同じ染色体数であった。第3染色体の多型(アクロセントリック(Aと略す。)とサブテロセントリック(Sと略す。))に関する調査では、小樽港、横浜港、三島、清水港、伏木港、名古屋港、大阪、博多港、那覇港及び北海道で捕獲されたネズミは、伏木港と三島を除いてA/Aが多く、伏木港では、A/Sが最も多く、次いでS/Sも多く、他の地域とは異なる第3染色体の多型を示した。船舶内(韓国船及び日本船)で捕獲されたドブネズ

ミ3頭の染色体数は全て $2n=42$ であった。第3染色体は、多型であった。染色体調査から地域特異性を見つけ出すことはできなかった。 $2n=42$ で、日本のそれと同じであった。

台湾の基隆港などで捕獲されたドブネズミは、染色体数 $2n=42$ で、日本のそれと同じであった。

3) ハツカネズミ

世界のハツカネズミの染色体は、通常アクロセントリック (A) で20対の染色体 ($2n=40$) である。しかし、ヨーロッパアルプスの山麓に生息する *M. m. domesticus* の地方種でタバコマウス (Tabacco mouse) が、ロバートソン転座 (Robertsonian translocation) による染色体異常によって、染色体数 $2n=40$ より少ない染色体数を持っていた。また、最近アフリカのアデイラ島においても染色体数が $2n=40$ より少ない *M. m. domesticus* が発見されている。日本の清水港、伏木港、横浜港、名古屋港、門司港及び博多港の港湾区域で捕獲されたハツカネズミ17頭の染色体数は全て、 $2n=40$ であって、染色体異常のハツカネズミは発見されなかった。

台湾の花蓮港などで捕獲されたハツカネズミは、染色体数 $2n=40$ で、日本のそれと同じであって、染色体異常のハツカネズミは発見されなかった。

4) アカネズミ

港湾区域等で捕獲されたアカネズミ39頭の染色体数は伏木港及び富山港周辺のアカネズミが $2n=46$ 、成田空港のアカネズミが $2n=48$ であった。土屋によると日本産アカネズミは、形態分類学的には4種に、細胞分類学的には2種に分けられる。即ち、中部地方の富山と浜松を結ぶ線を境にして、西側には $2n=46$ 、東側には $2n=48$ の染色体を有するアカネズミが分布しているとしている。この境界地域には両型が混棲し、自然に交雑したと思われる $2n=47$ の染色体を持つ個体が見つかっている。従って、伏木港及び富山港周辺のアカネズミ

は、境界線から西側の $2n=46$ 、成田空港のアカネズミは東側の $2n=48$ で、ともに日本在来種であった。

5) ハタネズミ

伏木港及び金沢港の港湾区域で捕獲されたハタネズミ2頭の染色体数は、 $2n=30$ の日本在来種であった。

6) ジャコウネズミ

ネズミではないがペスト、腎症候性出血熱などの感染症の媒介動物としても重要であり、九州や沖縄の港で捕獲されているので、今回ここで取り上げた。那覇港の港湾区域で捕獲されたジャコウネズミ4頭の染色体数は $2n=40$ の日本在来種であった。

台湾の基隆港などで捕獲されたジャコウネズミは、染色体数 $2n=40$ で、日本のそれと同じであった。

7) *R. losea*

台湾の花蓮港で捕獲された *R. losea* は、染色体数 $2n=42$ で、第1染色体が s/s で、Yosida が調べた結果と同じであった。

2. 生化学的標識遺伝子 (Hbb) による分析

1) クマネズミ

クマネズミのHbbパターンは、a、ab、bの3つの多型を示し、ホンコン産 *Rattus flavipectus*、スリランカ産 *R. r. kandianus* 及びインド産 *R. rattus* は、全て a タイプのみで、日本産 (奄美) ネズミは3つの多型であった。また、港湾区域及び船舶に生息するクマネズミのHbbパターンは、a、ab、bの3つの多型を示していた。清水港のクマネズミは、a が最も多く、次いで ab の2つのタイプであった。小樽港のクマネズミは、a タイプでインド産 *R. rattus* ($2n=38$) と同一であった。クマネズミのHbbパターンは、他の種類とは明確に区分が可能であった。

台湾の花蓮港におけるクマネズミは、Hbb が全て a タイプのみであって、台湾国籍の船舶内クマネズミと同じタイプであった。

2) ドブネズミ

ドブネズミのHbbパターンは、A、AB、Bの3つの多型を示している。また実験動物であるラットのWMfW、NIGⅢ、WKS及びLEW由来のHbbパターンは、全てBで、BUF/Ms由来ネズミはABであった。港湾区域のドブネズミのうち、清水港のネズミは、ABが最も多く、次いでAとBで、横浜港ではAB、B、那覇港では、Bが最も多く次いでAであった。清水港以外ではBタイプが最も多かった。ドブネズミのHbbパターンは、他の種類とは明確に区分が可能であった。

船舶内で捕獲されたネズミのHbbパターンは、AとBがそれぞれ1頭であった。

台湾の基隆港などにおけるドブネズミは、Hbbが全てBタイプのみであって、日本のネズミとは異なり多型でなかった。

3) ハツカネズミ

ハツカネズミのHbbパターンにp型、d型及びs型という多型があり、世界的な分布としてはp型というのは、ほぼアジアにしかなく、d型とs型のほうは世界中に分布していることが知られている。

港湾区域におけるハツカネズミのHbbパターンは、p、d、s、p/dの多型であった。清水港のハツカネズミには、p型が最も多く、s型も8.3%に認められた。また、横浜港ではd型が多く、次いでs型が11%に認められ、外来種のハツカネズミの侵入定着が認められた。

台湾の花蓮港などにおけるハツカネズミは、Hbbがdとp/dであって、日本の*M. m. musculus*のようにpタイプが存在しなかった。

4) アカネズミ

アカネズミのHbbパターンは、2本のバンドが広く離れた型と1本のバンドの2つの型を示した。アカネズミのHbbパターンが、2つの型か否かは調査数を増やした調査が必要である。

5) プラティスリックス

プラティスリックスのHbbパターンは、2本

のバンドの1型であった。2本のバンドを持つ種類は多種にもあるが、多種とは明確に区分が可能であった。

6) ナンヨウネズミ

ナンヨウネズミのHbbパターンは、2本のバンドの1型であった。2本のバンドを持つ種類は多種にもあるが、多種とは明確に区分が可能であった。

7) ミラルディア

ミラルディアのHbbパターンは、4本のバンドの1型であった。4本のバンドを持つドブネズミとは明確に区分が可能であった。

8) ジャコウネズミ

那覇港におけるジャコウネズミのHbbパターンは、2本のバンドと3本のバンドの2型であった。

台湾のジャコウネズミのHbbパターンは日本のジャコウネズミと同じ2型であった。

いずれの港においても、調査を行ったジャコウネズミの数が少ないので、今後は調査数を増やした調査が必要である。

9) *R. losea*

台湾の*R. losea*のHbbパターンは、クマネズミのHbbと同じaタイプのみであった。

*R. losea*のHbbパターンが、クマネズミの場合と同じく、a、ab、bの多型であるのか否かは、調査数を増やした調査が必要である。

3. ハツカネズミの分布とmtDNA分析

ハツカネズミ属は、分類学的に見て、12の種(species)が存在する(図12)。この種は、形態学的、遺伝学的見地から大きく4つの亜種(subspecies)に分類されている。その亜種とは、*M. m. domesticus*、*M. m. musculus*、*M. m. castaneus*、そして*M. m. bactrianus*である。これらの亜種の分布域は以下の通りである。*M. m. domesticus*は西ヨーロッパ、新大陸、オーストラリア、そして太平洋・大西洋・インド洋の島々であり、*M. m. castaneus*は東南アジアから中国華南(揚子江以南)にかけ、*M.*

*m. bactrianus*はイラン、アフガニスタン等の近東、中近東諸国に、*M. m. musculus*は東ヨーロッパから極東にかけての北部ユーラシア大陸全域にまたがっている。また、これらの亜種にはいくつかの地方種(geographical race)を持つものもある。ハツカネズミは元来旧大陸由来の動物であり、現在最も信頼できる文献情報によれば、発生地はカスピ海南西部の高原地域であり、そこで亜種分化を行った後、汎世界的に分布を広げたと考えられる。それ故、*M. m. domesticus*の例のように新大陸、オーストラリア、そして太平洋・大西洋・インド洋の島々に生息しているものは二次的に移り住んだものであり、この様な分布はヒトの移動によるものとされている。

また、習性学的見地から、ハツカネズミはaborigine型(土着型)、commensal型(対ヒト寄生型)、そしてferal型(再野生型)の3種に分類される。aborigine型はヒトの生活と独立の生息形態を示し、いわゆる生粋の野生状態で生息するもの、commensal型はその生息がヒトの生活圏の中にあり、生息場所としては民家、養鶏場、養豚所、穀物倉庫など人工的環境になじんでいる。このため、これらcommensal型の分布はヒトの移動に伴って拡大したと考えられており、上記の4亜種、即ち*M. m. domesticus*、*M. m. musculus*、*M. m. castaneus*、そして*M. m. bactrianus*は全てcommensal型に属する。また、feral型は一度commensal型に分化したものが、再度野生的環境に順応したものと考えられている。現在、この様なferal型のハツカネズミは、世界的に見てもヨーロッパアルプスの山麓付近に生息する*M. m. domesticus*の地方種でタバコマウス(Tobacco mouse)と呼ばれるものが存在するに過ぎない。この様に、タバコマウスではこのマウス特有の染色体異常を持つことから、以前は*Musposchavinos*という学名*Mus musculus*とは異なった種と考えられていた。しかしながら、森脇・米川らの行ったmtDNAのRFLP解析や、核の遺伝

子、特に生化学的標識遺伝子などの解析から、現在ではタバコマウス(*'Mus poschavinos'*)は*M. m. domesticus*の地方種の1つとして見なされるようになった。

更に米川は、森脇和郎博士(前国立遺伝学研究所教授;現総合研究大学大学副学長)との共同研究で、世界各地の約800頭以上に上る野生ハツカネズミを用いてmtDNAの多型(RFLP、もしくは塩基配列)とハツカネズミの亜種の変異が深い相関を持っていることを見いだした。このことを言い換えれば、mtDNAの多型は、ハツカネズミの亜種を識別するための非常に強力な分子マーカーになることを見出した(図13)。それ故、このmtDNA多型である標的となる地域に生息するハツカネズミを判定することによって、その地域のハツカネズミの亜種が何かをかなり高い確率で推定することが可能になる。また、亜種が決定されれば、さらに詳細な検討を加えることにより、そのハツカネズミが運ばれてきたもともとの生息地を推定することも可能になる可能性が高い。米川・森川らのこれまでの調査で、本州の福島県郡山市以南において*M. m. castaneus*が発見されたことが無く、また、*M. m. domesticus*においても福岡県笹栗市でかつて1頭のみが発見されただけである。横浜港のようにこれほど*M. m. domesticus*や*M. m. castaneus*が高率に発見されたことは無かった(図14)。それ故、これらの*M. m. castaneus*と*M. m. domesticus*は船舶貨物に伴って港湾区域に侵入し、そこでこれらのコロニーを作ったものと推察された。

また、系統樹の結果からは、*M. m. castaneus*は中国華南よりは東南アジア、あるいはロシアからの、*M. m. domesticus*は英国など北ヨーロッパよりも、南仏、あるいはスペイン、ポルトガル、あるいはラテンアメリカの諸国に由来すると考えられた。実際に横浜港大黒埠頭の輸入貨物量の航路別リスト(図15)を見ると、その約7割が*M. m. domesticus*の生

息地域を、その約2.5割が *M. m. castaneus* と *M. m. musculus* の混棲地域を、約0.5割が *M. m. castaneus* の生息地域を、それぞれ出発点としていた。

E. 結論

1. 日本の港湾区域におけるネズミの遺伝的特性

調査対象としたネズミは、外部形態、染色体分析、Hbb分析によって次の6種に分類同定され、同定が困難な事例には遭遇しなかった。しかし、ハツカネズミを亜種に分類する場合は詳細な形態学的分析及びmtDNAを必要とした。

1) クマネズミの遺伝的特性

クマネズミは、染色体数が $2n = 42$ でCバンド欠失を持つアジア型が主体であったが、北海道小樽港では染色体数 $2n = 38$ を持つオセアニア型の外来クマネズミが確認された。在来種との交雑ネズミは認められなかった。外国航路の船舶（韓国船、台湾船、日本船及びインドネシア船）のクマネズミは、染色体数 $2n = 42$ のアジア型であって、内部構成的核型であるC-バンドパターンから、それぞれ自国から侵入したネズミと考えられた。クマネズミのHbbパターンは、a、ab、bの3つの多型を示し、他の種類とは明確に区別が可能であった。

2) ドブネズミ

ドブネズミは、染色体数が $2n = 42$ で、核型による地域特異性は認められなく、染色体分析による表型的核型によって種類の分類は可能であるが、亜種までの分類は困難であった。ドブネズミのHbbパターンは、A、AB、Bの3つの多型を示し、他の種類とは明確に区別が可能であった。

3) ハツカネズミ

mtDNA分析から、横浜港には日本在来の *M. m. musculus* の他に、中国華南地方に広く分布する *M. m. castaneus*、欧州、新大陸に分布する

M. m. domesticus の外来種が存在した。小樽港、関西空港、松山港、門司港及び博多港のハツカネズミは、全て *M. m. musculus* で、名古屋港は *M. m. musculus* と *M. m. castaneus*、那覇港は *M. m. musculus* と *M. caroli* の混在であった。いずれの染色体数も $2n = 40$ であった。Hbbパターンは、p、d、s、p/dの多型であった。清水港のハツカネズミには、p型が最も多く、s型も認められ、また、横浜港ではd型が多く、次いでs型が多く認められ、Hbbパターンからも外来種のハツカネズミの侵入定着が認められた。

4) アカネズミ

アカネズミは、西日本（伏木港及び富山港）のネズミが染色体数 $2n = 46$ 、東日本（成田空港）のネズミが染色体数 $2n = 48$ の在来種であった。アカネズミのHbbパターンは、2つの型を示した。

5) ハタネズミ

港湾区域のハタネズミは、染色体数 $2n = 30$ の在来種であった。

6) ジャコウネズミ

港湾区域のジャコウネズミは、染色体数 $2n = 40$ の在来種であった。Hbbパターンは、2本のバンドと3本のバンドの2型であった。

2. 台湾の港湾区域におけるネズミの遺伝的特性

1) クマネズミ

クマネズミは、染色体数が $2n = 42$ でアジア型の在来種であった。Hbbパターンは、aタイプのみで、台湾船のクマネズミと一致していた。

2) ドブネズミ

ドブネズミは、染色体数が $2n = 42$ で、核型による地域特異性は認められなかった。Hbbパターンは、Bタイプのみで多型でなかった。

3) ハツカネズミ

ハツカネズミは、染色体数が $2n = 40$ 、Hbbパターンが、d、d/pで、mtDNA分析から全

て *M. m. castaneus* の在来種であった。

4) ジャコウネズミ

ジャコウネズミは、染色体数 $2n = 40$ の在来種であった。Hbbパターンは、日本のそれと同じく2型であった。

5) *R. losea*

R. losea は、染色体数 $2n = 42$ 、第1染色体が s/s で、Hbbパターンは、クマネズミの a タイプと同じであった。

以上、日本の港湾区域には外来種のネズミが侵入定着していたが、台湾のネズミ等は在来種であった。ネズミの分類同定の手法として、外部形態の他に遺伝学的検査法を導入することは、外来種を決定するために極めて有効であった。

F. 謝辞

本調査の実施にあたり、多大なご協力をいただいた関係検疫所職員の方々に深く感謝いたします。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 米川博通、鈴木莊介、青木英雄、飯塚信二、峰松一郎、土屋公幸、津田 薫 : 感染症媒介ネズミの遺伝学的検査法による分類の行政的応用に関する研究 : 平成9年度厚生科学研究報告書 (特別研究)、1998.

2) 鈴木莊介、峰松一郎、青木英雄、土屋公幸、米川博通 : 日本の港湾区域等において捕獲されたネズミの推移に関する調査研究 : 平成9年度厚生科学研究報告書、1998.

3) 鈴木莊介、青木英雄、飯塚信二、峰松一郎、米川博通、津田 薫、土屋公幸 : 日本の港湾区域等におけるネズミの遺伝学的特性に関する調査研究 : 平成9年度厚生科学研究報告書、1998.

4) 米川博通、津田 薫、鈴木莊介、青木英雄、峰松一郎、土屋公幸 : 横浜港大黒埠頭におけるハツカネズミ亜種の分布について : 平

成9年度厚生科学研究報告書、1998.

5) 青木英雄、飯塚信二、田島章太郎、林昭宏、多賀賢一郎、森英人、江田淳二、水田英生、鈴木莊介、内田幸憲 : 全国の港湾地域におけるネズミのハンタウイルス抗体調査 : 日本検疫医学会誌 (1) 37-40、1999.

2. 学会発表

1) 鈴木莊介、蔦宗俊明、青木英雄、飯塚信二、島村博、内田幸憲、米川博通、土屋公幸 : 日本の港湾区域等におけるネズミの遺伝的特性に関する調査研究 : 第2回日本検疫医学会、東京 (2000. 2).

2) 米川博通、津田 薫、土屋公幸、鈴木莊介、青木英雄、飯塚信二 : 日本の港湾区域等におけるハツカネズミ亜種の分布について : 第2回日本検疫医学会、東京 (2000. 2).

3) 青木英雄、鈴木莊介 他 : 全国の港湾地域におけるネズミのハンタウイルス抗体調査 : 平成11年度日本獣医公衆衛生学会、静岡市 (2000. 2).