

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 12 年度 研究成果報告書

平成 13 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. 輸入コンテナ貨物を介して侵入してくる感染症媒介 昆虫等に関する調査と防除に関する検討……………	30
内田 幸憲（神戸検疫所）	
3. 侵入疾病媒介蚊サーベイランスに関する基礎的研究……………	42
内田 幸憲（神戸検疫所）	
4. 蚊の採取方法に関する検討……………	59
太田 周司（成田空港検疫所）	
5. RT-PCR法によるフラビウイルス （デング・黄熱・日本脳炎）検査法の基礎的検討……………	87
内田 幸憲（神戸検疫所）	
6. PCR法を用いたデングウイルス媒介蚊の鑑別、および外国産 を含むヒトシマカDNAシストロンのITS2領域の比較……………	100
倉根 一郎（国立感染症研究所）	

7. クリミア・コンコ`出血熱ウイルス組換え核蛋白発現 HeLa  
細胞を抗原とした蛍光抗体法によるヒツジ血清中  
イムノグロブリンG抗体の検出…………… 110  
倉根 一郎 (国立感染症研究所)
8. 動物・ベクターサーベイランスの見地から見た感染症  
発生動向調査について…………… 115  
内田 幸憲 (神戸検疫所)
9. 諸外国における侵入動物及び侵入ベクターに  
対するサーベイランス・システムの現状と課題…………… 127  
高橋 央 (国立感染症研究所)

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：

世界的に感染症侵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と病原体検査法の確立が望まれている。昨年に引き続き、侵入動物の代表であるネズミ族の遺伝学的分析法、侵入ベクターの代表である蚊族の調査採取法、最も侵入の可能性のあるデング熱感染蚊の実践的検査法と保存方法、クリミア・コンゴ出血熱（CCHF）ウイルス抗体検査法（間接蛍光抗体法）の動物血清への応用について検討を深めた。また諸外国のサーベイランスシステムについては、昨年のアンケート調査をふまえ担当官に直接聞き取り調査を行った。昨年に引き続き、新たに4港（名古屋、大阪、神戸、志布志）で、侵入ハツカネズミが確認された。コンテナの個別調査は効率が悪く、コンテナヤード周辺の調査が有効であると思われた。蚊族の採取方法は対象とする蚊の特性に応じた方法が再確認された。デング熱ウイルスを主としたフラビウイルス感染蚊の採取・同定後から検査センター送付までの保存条件が確立された。ネッタイシマ蚊、ヒトスジシマ蚊の発生地域別判別はPCR法で行うことが可能と思われた。CCHF ウイルス抗体測定 of 動物血清への応用は人血清同様十分有用であることが確認された。しかし、感染マダニから直接 CCHF ウイルスを同定することはP4の使用ができない我が国では不可能かと思われた。諸外国では、その国の状況に応じてサーベイランスシステムの強化が計られ、関係機関の業務を連絡調整する機構が設置されていた。2年間の研究結果をふまえ最終年度は実践的応用に向けて調査研究を実施することにした。

## 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 (名古屋検疫所  
名古屋空港検疫所支所長)  
高橋 央 (国立感染症研究所  
感染症情報センター)  
内田 幸憲 (神戸検疫所長)

### A. 研究目的

今年度も世界各地で人獣共通感染症の脅威が報告された。アメリカ合衆国では1999年からの西ナイル脳炎が定着し疾病コントロールにもかかわらずニューヨーク州から周辺の4州に患者発生が拡大し、感染蚊及びセンチネルバード(見張り鳥)の西ナイル脳炎感染の拡大も確認されている。また、台湾では腎症候出血熱(ネズミ族由来)による患者死亡例がハンタ肺ウイルス症候群として報道され市民はパニック寸前の状況となった。(EU諸国では、恐牛病、口蹄疫、でその経済損失は計り知れない状況となっている。)我が国においては1999年4月より感染症法が新たに施行されているが侵入動物・侵入ベクターの確認方法や病原体保有状況の検査システムは確立されていない。昨年度の研究成果をふまえ、侵入動物の代表ともいえる全国港湾地域で捕獲したネズミ族の遺伝学的検討、今後強く懸念されるデング熱ウイルス・感染蚊の侵入に対する検査方法・調査システムの実践的応用(侵入ベクター対策)およびクリミア・コンゴ出血熱(CCHF)の検査法の確定を主目的に2年目の研究活動を行った。また、世界各国における人獣共通サーベイランスシステムのアンケート調査にもとづき各国政府に

直接聞き取る調査等を行い最終年度に行う予定の我が国におけるサーベイランスシステム提言の基礎資料とすることを目的とした。

### B. 研究方法

侵入動物サーベイランスのために、検疫法で定められた全国主要港の政令区域内で捕獲したネズミ族の遺伝学的検査(染色体数:ミトコンドリアDNA検査)を用いて対象地域を拡大して検討を行った。侵入ベクターサーベイランスのためには、その代表モデルとなるデング熱感染蚊の採取方法及び感染蚊の確認検査法のあり方を昨年のone step RT-PCR法を用いて実践応用に向けた検討を行った。マダニを媒介ベクターとするCCHFウイルスの同定検査方法は昨年の基礎検討をもとに動物血清においてその精度、感度について検討した。世界各国における人獣共通サーベイランスシステムの検討は侵入ベクターサーベイランスを行っているシンガポール、ニュージーランド、ドイツの各国政府担当者に直接聞き取り調査を行うとともに、韓国マラリアのコントロール状況についても現地調査を行った。

### C. D. 研究結果及び考察

ネズミ族の遺伝学的検討において、今年度も新たに大阪港、名古屋港、神戸港、志布志港の4港において外来性(侵入)ハツカネズミが確認された。昨年、小樽港において侵入・定着が確認されたクマネズミ(染色体38本)はオセアニア系クマネズミ

であるが、その分布は広く、今年度の検討からは極東ロシア地区からのものと判定してよいかと思われた。2年間の調査で全国の主要港の状況が整理できたが、6港において外来性ハツカネズミの侵入・定着が、1港において極東ロシアからクマネズミの侵入・定着が確認された。外部形態だけでは外来性（侵入）ネズミの判定が困難なこともあるが、多少でも異常があるネズミに関しては遺伝学的検査を是非とも行うべきと思われた。そしてこれらの侵入ネズミ族に関しては、その生息地域で問題となっている感染症情報をもとに、病原体保有の有無についても十分検討を行う必要があると思われた。来年度のテーマとしたい。また、東京都内で多数捕獲されている胸部に大きな白斑をもつドブネズミは日本古来の生息種であることが遺伝学的検査で確認された。胸部白斑は近親交配による特然変異的なものと思われた。侵入ベクターの検討は蚊族を中心に行った。空港、海港におけるコンテナ調査では、昨年同様病原体媒介ベクターの採取効率は悪く、むしろ食品害虫が多く採取された。個別のコンテナ調査は平時においては調査効率が悪く、とくに飛翔能力のある蚊族の採取は不可能に近いと思われた。むしろコンテナヤード周辺の環境状況をよく検討して周辺調査が大切かと思われる。ただし、コンテナ積み込み地におけるベクター媒介感染症の流行多発時にはコンテナ消毒などの個別対応が必要であろう。港湾地域での蚊族採取にはライトトラップの設定時間、設定場所、トラップの形式（ドライアイスの使用等）など目標と

すべき蚊族の特性を十分理解したうえで、定点ポイントをしっかりとめて行うことが重要であることが再確認された。オビトラップ法についてもその有用性が確認された。また、感染蚊検査において生存したままの蚊の採取が必要であれば研究班で考案した炭酸ガス粘着トラップも有効であろうと思われた。感染蚊のウイルス検査同定法については異種の蚊族が混入していても1匹の感染蚊に対して100匹一緒に検査を行っても検出が可能なこと、採取された後すみやかに $-80^{\circ}\text{C}$ で凍結すれば10日間室温放置してもウイルス検出が可能なこと、デング熱ウイルス検出以外でもフラビウイルス属であればone step RT-PCR法で同定が可能なことを確認した。今後は、ライトトラップ内で自然死した感染蚊からの同定の可否、他の昆虫混在（蛾のりん粉等）の影響についても検討を進め、確実な実践応用に供するシステムを確立し検疫業務で活用する予定である。また、ネッタイシマ蚊、ヒトスジシマ蚊の発生地域判別のPCR法での判定は、可能かと思われる結果が得られた。CCHFウイルス抗体検査法について、昨年は人血清について、今年は中国5地域のヒツジ血清について検討した。ヒツジ血清については検出感度は80%とやや低下したが、精度は100%と十分高く、ヒツジ血清における疫学的研究に有用であると思われた。感染マダニからのCCHFウイルス同定も可能かと思われるが、陽性コントロールとなる感染マダニの入手は困難であり、かつP4施設が使用できないため、研究の目途は立たない。諸外国のベクターサーベイ

ランスシステムについては直接聞き取り調査により以下の結果が得られた。ニュージーランド、シンガポール、ドイツ、韓国の4ヶ国は地理的状況、社会構造、産業形態、政治システムの相違によってシステムの構築がなされていた。共通点として、1) 新興再興感染症のサーベイランスが特に強化され公衆衛生上必要な侵入動物・ベクター感染症につき国レベル、地域共同体レベルで強化されつつあった。2) 関係機関の業務を連絡調整する機構が設置され、より実効的なサーベイランスと対応策の実施が目ざされていた。今後は、日本に必要とされる侵入動物・ベクターのサーベイランスシステムの内容と形態を検討し、あわせて既存のサーベイランスを評価していく作業が必要と思われた。

#### E. 結論

①遺传的検討において小樽港、横浜港、名古屋港、大阪港、神戸港、志布志港、那覇港において外来性ネズミ族の侵入または定着を確認した。東京都下の形態異常のドブネズミは突然変異によるものと判断された。侵入動物（ネズミ族）の遺伝学的検査の有用性が確認され、今後、病原体保有状況の検査も必要であると思われた。②侵入ベクター対策として蚊の採取方法、感染蚊の検査方法及び感染蚊の遺伝学的検査方法がほぼ確立され、次年度の実践的検討の基盤が確立された。③CCHFウイルス抗体検出方法は、動物（ヒツジ）においても有用であることが証明されたがその媒介体であるマダニの検査法については陽性コントロ

ール入手が困難であり、検討は困難のように思われた。④諸外国のベクターサーベイランスシステムの直接聞き取り調査から、各国ではその国の状況に応じてサーベイランスシステムの強化が計られ関係機関の業務を連絡調整する機構が設置されていた。

以上のことを参考にして我が国に必要なサーベイランスシステムの構築と具体的実践計画を最終年度に報告する予定である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) 内田幸憲、井村俊郎、竹嶋康弘：神戸市および福岡市医師会会員への動物由来感染症（ズーノーシス）に関するアンケート調査、感染症学会誌 75 (4) 2001 (印刷中)

2) 青木英雄、水田英生、鈴木荘介、内田幸憲他：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、獣医公衆衛生研究 2000 3(8) 19-22

3) 内田幸憲：感染症新法と輸入感染症、兵庫県医師会医学雑誌 2000 42(3) 18-24

4) Sosuke Suzuki, Hiromichi Yonekawa, Kimiyuki Tsuchiya, Toshiaki Tsutamune, Kazunari Fujikawa and Yukinori Uchida : Oceanian type black rats (*Rattus rattus*) found in the Port Otaru of Hokkaido, Japan. *Medical Entomology and Zoology*. (投稿中)

##### 2. 学会発表

なし

# 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 加藤 成生、中井 博美、佐久本微笑（小樽検疫所）  
飯塚 信二、青木 英雄、今成 敏夫（横浜検疫所）  
糸井 正人 後藤 郁夫（名古屋検疫所）  
津田 薫、米川 博通（東京都臨床医学総合研究所）  
土屋 公幸（宮崎医科大学）

#### 研究要旨

我が国の港湾区域等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。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、1999年から2000年に北海道小樽港にて捕獲されたクマネズミは、18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ムスクルス他に、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や欧州、新大陸に分布するドメステイカスが存在した。小樽港、関西空港、水島港、松山港、門司港及び博多港のハツカネズミは、全てムスクルスで、名古屋港、神戸港及び志布志港はムスクルスとドメステイカス、大阪港はムスクルスとキヤスタネウス、那覇港はムスクルスと別種オキナワハツカネズミとの混在であった。釧路港はキヤスタネウスであった。外来種のハツカネズミは、昨年度の2港から3港が新たに加わり、調査を行った13港のうち5港（38.5%）に認められた。アカネズミ及びエゾヤチネズミのHbbパターンは、各々多型であった。Hbbパターンによって他の種類と区分が可能であった。港湾区域には外来種のクマネズミ及びハツカネズミが侵入定着していた。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は、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、HPS、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。これまでに、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た。

前年度の調査において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、港湾区域等のクマネズミは、染色体数から在来種のアジア型（ $2n=42$ ）が主体であったが、北海道小樽港のクマネズミは全てオセアニア型（ $2n=38$ ）の外来種であった。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。横浜港及び名古屋港のハツカネズミは、mtDNAによって、日本在来のムスクリス（*Mus musculus musculus*）の他に外国由来キヤスタネウス（*M. m. castaneus*）、ドメスティカス（*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、稚内港、釧路港、新千歳空港、大阪港、神戸港、水島港、志布志港及び那覇空港の8港を新たに加え、港湾区域等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。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

港は、国際港（小樽港、稚内港、釧路港、新千歳空港、成田空港、横浜港、清水港、伏木港、富山港、七尾港、金沢港、名古屋港、関西空港、大阪港、神戸港、水島港、松山港、高知港、門司港、博多港、三池港、志布志港、那覇港及び那覇空港）の24ヵ所の港湾区域等、外国航路の船舶及び内陸部の一部地域を対象

とした。

### 2. 調査方法

1) 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並びに当研究目的に捕獲されたネズミを用いた（表1）。

#### 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（ $0.5\text{mg}/\text{m}\ell$ ）をドブネズミ、クマネズミの成獣には $1\text{m}\ell$ 、ドブネズミなどの子供やハツカには $0.3\sim 0.5\text{m}\ell$ 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 $1\text{m}\ell$ 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

$1,200\text{rpm}$ で5分間遠心後、上清を捨て、 $0.075\text{M}$  KCl液（KCl  $1.12\text{g}$ に蒸留水 $200\text{m}\ell$ を加える。）を $2\text{m}\ell$ 加え、静かにピペットで攪拌して $37^\circ\text{C}$ 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 $1,200\text{rpm}$

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を50mℓの1/15M PBS ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  11.94g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  4.5g に蒸留水1ℓを加え、pH6.8とする。)に希釈した染色液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  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  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( $\text{NaCl}$  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%シヨ糖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、EDTA 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(チャンパーウィックス)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、試料をアプリケーター(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ター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、ボンソー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. DNA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 D-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/ $\mu$ l)	2.5 $\mu$ l
10倍濃度のPCR緩衝液	5.0 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> 溶液 (25mM)	3.0 $\mu$ l
dNTP (2mM)	2.5 $\mu$ l
プライマー-F (20mM) *	0.5 $\mu$ l
プライマー-R (20mM) *	0.5 $\mu$ l
耐熱性DNA (Taq) ポリメラーゼ	0.5 $\mu$ l
滅菌再蒸留水 (超純水)	35.5 $\mu$ l
総量	50.0 $\mu$ l

\*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  $\mu$  l 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 $\mu$ l
ターミネータ混合液	8.0 $\mu$ l
プライマー (1pmol)	3.2 $\mu$ l
総量	20 $\mu$ l

イ) 以下の条件でPCRを行う。

#### PCRの条件

変性 (96℃)	10秒
アニーリング (50℃)	5秒
DNA鎖伸長 (60℃)	4分
後熱処理 (72℃)	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

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2、表3、図1、図2及び図3である。

### 1) ドブネズミ (*Rattus norvegicus*)

新千歳空港など新たに加えられた5カ所計14カ所の港湾区域等で捕獲されたドブネズミ259頭の核型は、全て $2n=42$ であった(表2)。第3染色体の多型に関する調査では、小樽港、新千歳空港、稚内港、釧路港、横浜港、三島、伏木港、清水港、名古屋港、大阪、神戸港、水島港、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(図1)。

内陸部(東京都内池袋)にて捕獲されたクロドブネズミで胸部がツキノワグマの様に白いネズミの染色体数は $2n=42$ であった。

### 2) クマネズミ (*Rattus rattus*)

1999年9月から2000年に捕獲された北海道小樽港のクマネズミは、18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。神戸港におけるクマネズミの染色体数は、 $2n=42$ で、アジア型であった。同じく志布志港、那覇港及び那覇空港のクマネズミは、 $2n=42$ のアジア型で、Cバンドの欠失も認められた(表1及び図2)。腹部の体毛色がハブ色ではなく、白色を呈するクマネズミが含まれていた内陸部(小笠原父島)のクマネズミは、6頭全てが染色体数 $2n=42$ のアジア型で、Cバンドの欠失も認められた。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、神戸港、志布志港のクマネズミは、全てA/Aであった。那覇港のクマネズミは、A/Aが2頭、A/Sが1頭であった。小樽港、那覇空港のクマネズミは、全てS/S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、神戸港、水島港、門司港、博多港、三池港及び那覇港、計10カ所の港湾区域で捕獲されたハツカネズミ20頭の染色体数は $2n=40$ であった(表2)。

### 4) アカネズミ (*Apodemus speciosus*)

港湾区域等で捕獲されたアカネズミ51頭の染色体数は、新千歳空港及び成田空港のアカネズミが $2n=48$ (図2)、伏木港及び富山港周辺のアカネズミが $2n=46$ であった(表2)。

### 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(表2)。

### 6) エゾヤチネズミ (*Clethrionomys*)

新千歳空港で捕獲されたエゾヤチネズミ25頭の染色体数は、 $2n=56$ であった(表2及び図2)。1頭のエゾヤチネズミから第4染色体の1本にメタセントリックを認めた(図3)。

### 7) 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8頭の染色体数は、 $2n=40$ であった(表2)。

## 2. 生化学的標識遺伝子(Hbb)による分析

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4である。

### 1) ドブネズミ

ドブネズミのHbbパターンは、3つの多型を示している。港湾区域等のドブネズミ207頭のHbbの分布パターンを見るとABとBが共に39.6%、次いでAであった。港別ではBが占める率が最も多く、次いでAB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。

### 2) クマネズミ

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、志布志港、那

覇港及び那覇空港ではaタイプのみであった。内陸部の小笠原父島も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。

### 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。港湾区域等のハツカネズミ235頭のHbbパターンを見るとd(35.3%)が最も多く、次いでp(32.8%)、p/d(20.0%)、s(11.9%)の順であった。港別では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。名古屋港、神戸港、志布志港、那覇港及び那覇空港ではd型が認められた。

### 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、2本のバンドが76.5%と最も多い。

### 5) エゾヤチネズミ

エゾヤチネズミのhbbパターンは、2本と3本のバンドの2型を示し、2本のバンドが91.3%と最も多い。

### 6) 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、1本、2本及び3本のバンドの3型であった。

## 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、例えばドメスティカスの1個体と上海産のムスクルスス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4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とおりであった。まずこの図4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266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5)。解析した総計110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、ムスクルスに属するもの(8つの多型がある)が72頭(65.5%)、キャストネウスに属するもの(2つの多型がある)が25頭(22.7%)、ドメスティクスに属するもの(6つの多型がある)が9頭(8.2%)及びオキナワハツカネズミ*M. caroli*に属するものが4頭(3.6%)。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4及び図6のとおりである。

調査を行った13港のうち5港(38.5%)に外来種のハツカネズミを認めた。

## D. 考察

### 1. 染色体調査

#### 1) ドブネズミ

清水港など14カ所の港湾区域等で捕獲されたドブネズミ260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、新千歳空港、稚内港、釧路港、横浜港、三島、清水港、伏木港、名古屋港、大阪、神戸港、水島港、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。

以上のことからドブネズミは、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。

#### 2) クマネズミ

世界のクマネズミは、MusserとCarletonの世界の哺乳類の分類（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7）。また、Becasova（1984）は、ロシアのサハリン、沿海州及びモスクワのクマネズミの染色体を調べ、いずれも $2n=38$ であることを確認している。一方、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、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、名古屋港、神戸港、志布志港、那覇港、及び那覇空港のクマネズミは、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月から2000年に北海道小樽港で捕獲されたクマネズミは、18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、大型で体毛もアジア型とは異なる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小樽港へ侵入したかを、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、次いで原木、水産品、肥・飼料、マトンがオセアニア型のクマネズミが分布するロシア、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5）。一方、1990年代初めの頃からロシアの小型魚介類積載船舶の来航が急増しており、同港では外航船舶接岸埠頭内に倉庫・サイロ群が存在する環境である。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、1997年以降、港の全域でクマネズミが捕獲され始めており、この時期より少し前に侵入したものと考えられた（図8）。従って、小樽港とロシアとの交流が盛んになった以降、小樽港にはそれまでに捕獲されなかったクマネズミが異常に捕れていることからオセアニア型のクマネズミはロシアから侵入ものと考えている。小樽港と同様にロシアからの来航船舶が多い北海道の稚内港と釧路港では、2000年にネズミ調査を行ったがクマネズミを捕えることができなかった。第1染色体の多型から地域特性を見ると、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。小笠原父島におけるクマネズミ（胸部の体毛がバフ色でなく白色を呈する。）の染色体は、 $2n=42$ で、Cバンドの欠失を認め、アジア型であった。

以上のことから、クマネズミは、染色体調査により、外来種を決定するために極めて有効であった。

### 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) による染色体変異によって、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、神戸港、水島港、門司港、博多港、三池港及び那覇港の港湾区域で捕獲されたハツカネズミ20頭の染色体数は全て、 $2n=40$  であって、染色体変異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51頭の染色体数は、新千歳空港及び成田空港のアカネズミが  $2n=48$  で、伏木港及び富山港周辺のアカネズミが  $2n=46$  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、東側には  $2n=48$ 、西側には  $2n=46$  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、新千歳空港及び成田空港のアカネズミは東側の  $2n=48$ 、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  $2n=46$  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) エゾヤチネズミ

北海道新千歳空港のエゾヤチネズミ25頭の染色体は、 $2n=56$  のエゾヤチネズミであった。

### 7) 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の染色体数は、 $2n=40$  の日本在来種であった。

## 2. 生化学的標識遺伝子 (Hbb) による分析

### 1) 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。港湾区域のドブネズミのうち、Hbbパターンは、ABとBが共に多く認めた。港別では清水港のネズミは、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。清水港及び釧路港以外では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。

### 2) 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、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、志布志港、那覇港、那覇空港及び小笠原父島のクマネズミは、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。

### 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。横浜港ではd型が多く、次いでs型が11%に認められた。また、名古屋港、神戸港、志布志港、那覇港及び那覇空港ではd型が認められ、外来種のハツカネズミの侵入定着が認められた。

#### 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) エゾヤチネズミ

北海道新千歳空港におけるエゾヤチネズミのHbbパターンは、2本と3本のバンドの2つの型を示した。エゾヤチネズミの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。

#### 6) 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、1本、2本及び3本のバンドの3型であった。ジャコウネズミのHbbパターンが3つの型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。また、ハツカネズミは、遺伝学的見地から大きく4つの亜種 (subspecies) 群に分類される。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) に向け、*M. m. bactri-*

*anus*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。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変異を持つことから、以前は*Mus poschavinos*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。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キャストネウスが発見されたことが無く、また、ドメスティカス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ドメスティカスやキャストネウスが高率に発見されたことは無かった（図6）。それ故、これらのキャストネウスとドメスティカス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、キャストネウスは中国華南よりは東南アジア、あるいはロシアからの、ドメスティカス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。

調査を行った13港のうち横浜港、名古屋港、大阪港、神戸港及び志布志港の5港（38.5%）から外来種のハツカネズミを認めた。釧路港からキャストネウスが認められているが、従来から北海道にはキャストネウスが生息して

いることから、釧路港のキャストネウスは、日本在来と考えられた。

## 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) 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。

#### 2) 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。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。

#### 3) ハツカネズミ

mtDNA分析から、横浜港には日本在来のムスクルスの他に、中国華南地方に広く分布するキャストネウス、欧州、新大陸に分布する *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、全てムスクルスで、名古屋港、神戸港及び志布志港はムスクルスとドメスティカス、那覇港はムスクルスとオキナワハツカネズミの混在であった。釧路港はキャスト

ネウスであった。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。世界的に多く分布するd型とs型が横浜港、清水港、名古屋港、神戸港、志布志港、那覇港及び那覇空港で認められた。調査を行った13港のうち横浜港、名古屋港、大阪港、神戸港及び志布志港の5港(38.5%)から外来種のハツカネズミを認めた。

#### 4) アカネズミ

アカネズミは、東日本(新千歳空港及び成田空港)のネズミが染色体数 $2n=48$ 、西日本(伏木港及び富山港)のネズミが染色体数 $2n=46$ 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

ハタネズミは、染色体数 $2n=30$ の在来種であった。

#### 6) エゾヤチネズミ

北海道新千歳空港のエゾヤチネズミは、染色体数 $2n=56$ のエゾヤチネズミであった。

#### 7) ジャコウネズミ

沖縄那覇港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、1本、2本及び3本のバンドの3型であった。

以上、日本の港湾区域等には外来種のネズミが侵入定着していた。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。また、検体の提供をいただいた東京都豊島区池袋保健所及びイカリ消毒株式会社技術研究所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.

6) 鈴木莊介、薦宗俊明、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学的特性に関する調査研究: 日本検疫医学会誌(2) 43-50. 2000.

7) 米川博通、津田 薫、土屋公幸、青木英雄、塚田信二、鈴木莊介、内田幸憲: 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: 日本検疫医学会誌(2) 51-58. 2000.

8) 青木英雄、鈴木莊介、内田幸憲 他: 全国の港湾区域におけるネズミのハンタウイルス抗体調査、日本獣医公衆衛生学会誌、19-22. 2000

9) Sosuke Suzuki, Hiromichi Yonekawa, Kimiyuki Tsuchiya, Toshiaki Tsutamune, Kazunari Fujikawa and Yukinori Uchida: Oceanian type black rats (*Rattus rattus*) found in the

Port Otaru of Hokkaido, Japan. Medical Entomology and Zoology(投稿中).

## 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).
- 4) 鈴木莊介：ネズミと検疫感染症：第52回日本衛生動物学会東日本支部大会、シンポジウム、横浜市(2000.10).
- 5) 中井博美、高田裕也、鈴木莊介、水田英生、藤川和生、内田幸憲：新千歳空港におけるネズミの遺伝的特性と内・外部寄生虫等に関する調査：第2回日本検疫医学会、東京(2001. 2).
- 6) 加藤成生、佐久本微笑、中井博美、鈴木莊介、内田幸憲：北海道(小樽港、釧路港及び稚内港)におけるネズミの遺伝的特性に関する調査：第2回日本検疫医学会、東京(2001. 2).
- 7) 津田薫、米川博通、土屋公幸、鈴木莊介、内田幸憲：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報)：第2回日本検疫医学会、東京(2001.2).

表1 日本の港湾区域等において捕獲され調査に用いたネズミ等の種類と数

捕獲場所	調査時期	種 類							計	
		ドブネズミ	クマネズミ	ハツカネズミ	アカネズミ	ハタネズミ	ジャコウネズミ	エゾヤチネズミ		
港	小樽港	1999 ~ 2000	23	18	1				42	
	新千歳空港	2000 ~ 2001	19			13		26	58	
	稚内港	2000	11						11	
	釧路港	2000	8		1				9	
	成田空港	1990				2			2	
湾	横浜港	1992 ~ 2000	44		212				256	
	清水港	1983 ~ 1985	83	65	48				196	
	伏木港	1985 ~ 1987	76	6	5	32			119	
	富山港	1987	1			5	1		7	
	金沢港	1987					1		1	
	七尾港	1987	5						5	
	名古屋港	1999 ~ 2000	8	1	8				17	
	大阪港	2000			10				10	
	関西空港	1997			8				8	
	神戸港	1984 ~ 2000	2	3	3				8	
域	水島港	2000	1		6				7	
	松山港	1997			10				10	
	志布志港	2000		6	13				19	
	門司港	1999			4				4	
	博多港	1999	4		2				6	
	那覇空港	2000		1	3			1	5	
	那覇港	1997 ~ 2000	16	5	8			13	42	
	等	日本船	1983 ~ 1984	2	10					12
インドネシア船		1984		6					6	
台湾船		1984		4					4	
韓国船		1983 ~ 1985	2	27					29	
内陸部	東京(池袋)	2001	2						2	
	小笠原(父島)	繁殖群		6					6	
合 計			307	158	342	52	2	14	26	901