

厚生科学研究費補助金

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13年度 総括研究成果報告書

平成14（2002）年3月

班 長 内 田 幸 憲

神 戸 検 疫 所

目 次

I. 総括研究報告書

- 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）

II. 分担研究報告

1. 遺伝子分析による侵入動物の
実態並びに感染症汚染実態調査…………… 6
鈴木 莊介（東京検疫所）
 2. 地理的に異なった地域に生息するヒトスジシマカを
PCR法で区別する試み…………… 39
倉根 一郎（国立感染症研究所）
 3. 蚊からのフラビウイルス（デング・黄熱・日本脳炎・ウエストナイル）
ゲノム検出法の改良及び侵入ベクターサーベイランスへの活用…………… 50
内田 幸憲（神戸検疫所）
 4. クリミア・コンゴ出血熱ウイルス組換え核蛋白を抗原とした
ELISAによるヒツジ血清中イムノグロブリンG抗体の検出と
RT-PCR法によるダニからの同ウイルスゲノムの検出…………… 61
倉根 一郎（国立感染症研究所）
 5. 人獣共通感染症に係わる侵入動物および侵入ベクター
に対するサーベイランスシステムの研究
（日本－韓国－台湾におけるマラリア対策）…………… 67
高橋 央（国立感染症研究所）
 6. 侵入動物及び侵入ベクターに対する
サーベイランス・システムの構築に関する研究
－海外の現状と、日本の検疫所業務の現状と課題との比較・解析…………… 78
高橋 央（国立感染症研究所）
- III. 研究成果の刊行に関する一覧表…………… 94

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

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

昨年までに残された課題（侵入ネズミの確認と港湾ネズミ族の病原体保有状況、感染蚊からのウイルスゲノム検出の実践応用、ネッタイシマカ、ヒトスジシマカ発生地域判別のPCR法での判定、感染マダニからのCCHF（クリミア・コンゴ出血熱）ウイルスの同定、我が国での既存のサーベイランスの評価と新たなシステムの提言）を中心にサーベイランスシステムの構築に向けて最終年度の検討を行った。今年度も東京、鹿児島港に外来性ハツカネズミが確認された。この3年間で外来性ハツカネズミが確認された7港のうち4港（横浜、名古屋、大阪、神戸）ではLCM（リンパ球性脈絡髄膜炎）ウイルス抗体保有ハツカネズミが確認された。ペスト抗体はすべてのネズミ族で陰性、HFRSウイルス抗体はこの3年間は保有率は低下していた。広東住血線虫の発見港は減少しているが今年度新たに大阪港で発見された。外部寄生虫で問題となるケオプスネズミノミは那覇港でのみ増加していた。成虫でのネッタイシマカとヒトスジシマカの形態判別は困難であるがPCRで判別可能となり、ヒトスジシマカの発生地域判別もPCRで可能となった。蚊からのフラビウイルスゲノム検出法も改良され、感度は10-100倍上がり全国的な感染蚊サーベイランスの実践活用が動き出した。さらに動物血清でもCCHFウイルス特異抗体の検出法が確立され、CCHFウイルス感染マダニからのウイルスゲノム検出法は可能と思えるようになり、プライマーの設計、PCRの条件等さらなる検討の課題が残された。諸外国と我が国の既存システムの比較では多くの問題点が浮かび上がったが、水際から国内までの連携の必要性、人員集約化と民間活力の利用等、実施効率を高める新システム構築が強く望まれた。

分担研究者

倉根 一郎（国立感染研究所 ウイルス第一部長）

鈴木 荘介（東京検疫所 衛生・食品監視課長）

高橋 央（国立感染研究所 感染症情報センター）

内田 幸憲（神戸検疫所長）

る中で、感染症の拡散、拡大もボーダレス化を迎えている。また、新興再興感染症の60%以上は人獣共通感染症であり、物流の大量高速移動に伴って病原体を保有する侵入動物、侵入ベクターの移動が容易になっている。欧米各国ではそれぞれ対応システムを構築しているが、我が国ではベクターサーベイランス・コントロール体制は現行感染症法の中では後退し、検疫所における機能も弱体化している。

A. 研究目的

世界中のグローバル化が進行す

本研究は最終年度を迎えているが、侵入

動物・侵入ベクターサーベイランスシステムの構築に向け不足していたことの補充、実践応用への整備、過去の実態分析、現状体制の問題点の整理を行うことで新しい『侵入動物・侵入ベクターサーベイランスシステム構築』の提言を行うべく最終検討を行った。システムへの提言は総合研究報告書において述べる。

B. 研究方法

遺伝学的解析による侵入動物の実態と感染症汚染実態調査では、過去 30 年間 (1971 - 2000 年) の検疫所業務年報の分析整理の中で港湾ネズミ族の捕獲実態の変化、外部寄生虫 (ノミ)、内部寄生虫 (広東住血線虫) の拡大状況を解析した。また侵入動物の保有病原体 (ペスト菌、ハンタウイルス: HFRS ウイルス、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス: LCM ウイルス) についても整理、解析をした (鈴木)。また、ネズミ族捕獲を民間に委託できないかを検討する目的で東京、名古屋、神戸地区でペストコントロール協会と委託契約を行い実施した (内田)。侵入ベクターの代表である蚊族の遺伝学的分析は不可能と思われたが地域特性を持つヒトスジシマカを PCR 法で区別することを試みた (倉根)。蚊からのフラビウイルス (デング熱、黄熱、日本脳炎、ウエストナイル脳炎) ゲノム検出法の改良を行い、全国的に蚊のサーベイランスへの実践活用を試みた (内田)。クリミア・コンゴ出血熱 (CCHF) ウイルス感染症の診断と疫学調査のために ELISA 法による IgG 抗体検出法を検討し、CCHF ウイルス保有ダニから Nested PCR 法を用いてウイルスゲノム検出の検討を行った (倉根)。韓国保健院、台湾 CDC、検疫

所、八重山保健所の担当者と直接面談方式にて情報収集するとともに各国の月報、年報も分析し、日本・韓国・台湾におけるマラリア対策を検討した。さらに海外の現状と日本の現状と課題についてこれまでの 2 年間の海外調査をふまえ、全国検疫所へ直接訪問して現場状況、人員の配置、業務概況の分析を行った (高橋)。

C. D. 研究結果及び考察

過去 30 年間の検疫所業務年報分析によれば 64499 匹 (ドブネズミ 74%、ハツカネズミ 14%、クマネズミ 8%、アカネズミ 4%) が捕獲され 10 年連続で捕獲数は激減していた。しかしハツカネズミの比率は上昇していた。また船内で捕獲されるネズミは減少していた。船舶輸送がコンテナ化したためと思われるがコンテナヤード周辺で外来性ハツカネズミが多く発見されていた。しかしこれらの事実の裏には検疫所での衛生活動機能の低下がある (後述) との指摘もあり、港湾の整備、環境改善によるものとの判断は下せないかと思われた。外部寄生虫のノミについてはケオプスネズミノミの採取数が増えていた。これはほとんどが那覇港のネズミからであった。侵入動物の遺伝学的解析は継続され、新たに東京湾、鹿児島湾において外来性ハツカネズミの侵入定着が確認され、この 3 年間で小樽港では外来性クマネズミが、横浜、名古屋、大阪、神戸、志布志、東京、鹿児島 の 7 港では外来性ハツカネズミが侵入定着していることが確認された。これらの侵入定着ねずみを含めてペスト、HFRS、LCM、広東住血線虫の病原体保有状況の検査成績を整理した。ペストは 1994 年以降開始された抗体検査

ではすべて陰性であった。HFRS の抗体陽性ネズミが確認された港は 1975 - 1995 年の間では 9 港、1996 - 1998 年では 14 港で陽性率、抗体価ともに高かったが、1999 - 2001 年では 8 港と減少し、陽性率、抗体価も低下していた。LCM 抗体保有ハツカネズミは大阪、横浜港で確認されていたが本年度は名古屋、神戸港でも確認された。広東住血線虫を保有するネズミは、1980 年代には 9 港、1990 年代は 6 港で発見されていたが、今年度は新たに大阪港でも発見された。東京、名古屋、神戸の 3 地区において民間委託によるネズミ族の捕獲はかろうじて成功し、3 ヶ月間で 70 匹が捕獲された。これまで駆除を中心に行っていたが指導により捕獲も可能と思われた。地理的に異なった地域に生息するヒトスジシマカを PCR 法で区別する試みについてはようやく目処がついた。まず、成虫になって形態学的特徴が不明瞭となったネツタイシマカとヒトスジシマカの判別はゲノム DNA 上にあるリボソーム DNA シストロンの ITS 2 領域をハエ目に共通して利用できるプライマーを用いて PCR を行うことで可能となった。また、ヒトスジシマカの地理的に異なった生息地域の判別は ITS 2 領域の PCR 産物を少なくとも Hinf I 制限酵素で切断したパターンを比較することで区別することが可能となった。また、蚊からのフラビウイルスゲノム検出法に改良を加え、感度は 100 倍となり、ウエストナイルウイルス感染蚊からのウイルスゲノム検出にも成功した。さらに全国検疫所で採取された蚊からのウイルスゲノム検出検査も組織的に行われるようになり、実践活動が開始された。今年度の検査ではすべて陰性であった。CCHF ウイルス感染

症の診断と疫学調査のための研究で一番大きな障害は BSL 4 実験室が我が国では使用が不可能なことである。しかし、BSL 4 実験室でなくてもウイルス学的検査が可能になるように、組換えウイルス抗原を用いた ELISA 法により CCHF ウイルス特異 IgG 抗体検出法及び HeLa/CCHF ウイルス-NP 細胞を樹立して IFA (蛍光抗体法) による IgG 抗体検出法を確立し、ヒツジ血清で確認ができた。ELISA 法での感度は 100%精度は 86%であった。IFA での感度は 94%、精度 94%であった。ダニからの CCHF ウイルスゲノムの検出は可能であったが中国における CCHF ウイルスの塩基配列に違いがありプライマーの設計、PCR の条件等さらに検討する課題が残された。日本 - 韓国 - 台湾におけるマラリア対策及び海外の現状と日本の検疫所業務の現状と課題との比較・解析においては、各国は地域の特性、歴史的体験をふまえたそれぞれのガイドラインを実施している。我が国においては各検疫所間での情報交換は弱く、国内対策を行う保健所での蚊対策の実施はなされず、検疫所との連携もみられなかった。検疫所では対応人員が過度に不足しているにもかかわらず入国可能港が過分散している。また現状の物流状況で侵入動物・ベクター対策は水際だけの防疫業務では不十分であり周辺自治体との連携や動物検疫所・植物防疫所との連携も必要と思われた。

E. 結論

1. 侵入動物の判定に遺伝学的検討は有効であり、新たに東京、鹿児島港においてハツカネズミの外来種が確認された。小樽港におけるクマネズミ外来種の定着も

1992年以降何度か繰り返された侵入の結果であると判定された。ハツカネズミの侵入定着の確認された横浜、大阪港での LCM ウイルス保有ハツカネズミに加え、侵入が確認される名古屋、神戸港でも新たに LCM ウイルス保有ハツカネズミが確認された。また、広東住血線虫の港湾ネズミへの感染は大阪港で新たに確認された。侵入動物の遺伝学的検査のもと、侵入ネズミが確認された港のネズミ族の病原体保有検査は十分に行われるべきである。

2. 侵入ベクターの遺伝学的検討は困難であったが成虫となって形態学的判別が困難なネッタイシマカとヒトスジシマカを PCR 法で判別することが可能となった。また外来性のヒトスジシマカと在来性のものとの判別も PCR 法で可能であった。
3. フラビウイルス感染蚊からのウイルスゲノム検出法においてさらに感度を 10 – 100 倍上げること成功し実践活用に供することができた。この 1 年間で全国検疫所で採取された蚊からフラビウイルスを検出することはなかった。
4. BSL 4 実験室の使用が許されない我が国において組換え CCHF ウイルス抗原を用いた ELISA 法、HeLa/CCHF ウイルス-NP 細胞を樹立して行うことができるようになった IFA 法を確立し、動物血清でのスクリーニング検査が可能となった。また、感染ダニからの CCHF ウイルスゲノムの検出は可能となったが、中国における CCHF ウイルスの塩基配列に違いがあることからプライマーの設計、PCR の条件等さらなる検討が必要であることが判明した。

5. 諸外国は地域の特性、歴史的体験をふまえた侵入動物・侵入ベクター対策、ガイドラインに基づく対応をしているが、我が国では国内対策はほとんどなされず、水際においても人員不足と人員の過分散、周辺自治体や他検疫所、動物・植物検疫所との連携のない孤立的対応しかなされていなかった。水際と国内間の連携、人員の集約化、民間委託等、連携を高める効率的なシステム構築が強く望まれた。

研究最終年を迎え、昨年残された課題も含め本研究の課題は大略果たされたものと思われる。これらの成果をふまえ総合報告書に我が国における侵入動物・侵入ベクターサーベイランスシステムの提言を行う。

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) 276 – 282. 2001.
- 2) Sosuke Suzuki, Hiromichi Yonekawa, Kimiyuki Tsuchiya, Toshiaki Tsutamune, Kazunari Fujikawa and Yukinori Uchida : Oceanian – type black rats (*Rattus rattus*) found in Port Otaru of Hokkaido, Japan. : Med. Entomol. 52 (3) 201 – 207. 2001.
- 3) 津田 薫、土屋公幸、青木英雄、飯塚信二、鈴木莊介、内田幸憲、米川博通：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）：日本検疫医学会誌、(3) 150 – 160. 2001.
- 4) 江下優樹、福田昌子、デュ・ジョーン・

マハンディ・クルス、ロナルド・エンリケ・モラレス、山田堅一郎、倉根一郎、内田幸憲、長谷川 太、五十嵐 章：蚊類のアルボウイルス媒介能 (1) RT-PCR による蚊からのデングウイルスゲノム検出。第 53 回日本衛生動物学会大会、山形市中央公民館、2001 年 4 月 4-5 日、第 70 回日本寄生虫学会・第 53 回日本衛生動物学会合同大会記録：135, 2001.

- 5) 福田昌子、江下優樹、安西三郎、大塚靖、青木千春、高岡宏行、高崎智彦、山田堅一郎、内田幸憲、倉根一郎：蚊類のアルボウイルス媒介能 (2) PCR を用いたウイルス媒介蚊の識別。第 54 回日本衛生動物学会南日本支部大会・第 51 回日本衛生動物学会南日本支部大会・合同大会。2001 年 10 月 27 日、北九州市、産業医科大学、Med. Entomol. Zool., 52 : 2001.

G. 知的所有枚の取得状況

特になし

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並びに感染症汚染実態調査

分担研究者 鈴木 莊介（東京検疫所）
研究協力者 島村 博、加藤 雅英（東京検疫所）
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）
後藤 郁夫（名古屋検疫所）
土屋 公幸（宮崎医科大学）
津田 薫、米川 博通（東京都臨床医学総合研究所）

研究要旨

1971年から2000年までの30年間、日本の港湾区域等で捕獲されたネズミは、ドブネズミが最も多く、次いでハツカネズミ、クマネズミ、アカネズミ等で、最近ではハツカネズミが増えてきた。水島港では北米原産の*Peromyscus*（ペロミスカス）が含まれていた。船舶内のネズミはクマネズミが最も多い。航空機内にもネズミが確認された。ネズミに寄生するネズミノミは、港湾区域ではヨーロッパネズミノミ、船舶ではケオプスネズミノミが多い。ネズミ等の分類同定を外部形態によるほか、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うと、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、小樽港のクマネズミは、すべてオセアニア型(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、東京港と鹿児島港には日本在来のムスクルスのほかに、外来種のキャストネウスやドメステイカスが存在した。小樽港と大阪港はムスクルスとキャストネウスであった。釧路港と石狩港はキャストネウスであった。日本の港湾区域には、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。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。ネズミの分類同定の手法として、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極めて有効であった。

検疫感染症等の病原体保有をみると、ペスト抗体はいずれのネズミにも認められなかった。ドブネズミとヤチネズミには、ハンタウイルス汚染が認められた。広東住血線虫汚染が広がりつつある。外来種のクマネズミには、検疫感染症等の病原体に汚染されていなかったが、外来種のハツカネズミが捕獲された名古屋港、神戸港では、LCM汚染が認められた。

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(HFRS)、HPS、広東住血線虫症、ラッサ熱、リンパ球性脈絡髄膜炎(LCM)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内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ていた。

そこで、全国港湾区域等において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。同時に外来ネズミを含むネズミのペスト、HFRS、広東住血線虫症及びLCMの病原体汚染調査を行い、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、感染症侵入防止対策に活用する。

B. 研究方法

1. 日本の港湾区域等におけるネズミ、ノミの捕獲実態

1971年から2000年の30年間、港湾区域等におけるネズミ、ノミの捕獲実態を検疫所業務年報と全国検疫所へのアンケート調査により調べた。

2. 遺伝子分析等による侵入動物の実態

(1) 調査場所

日本の港は、国際港(小樽港、釧路港、新千歳空港、留萌港、石狩港湾、東京港、鹿島港、東京空港、川崎港、新潟港、大阪港、鹿児島港)の12カ所の港湾区域等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

たネズミ並びに現地に出向き、当研究目的に捕獲されたネズミを用いた。

②外部形態による分類

捕獲されたネズミは、今泉(1970)の原色日本哺乳類図鑑に従い、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。

A. 染色体標本作製

A) 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(0.5mg/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0.2~0.5ml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醉し、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水盆上に水平に置き、水面とスライドグラスが触れない程度に離し、スライドグラス上に骨髓細胞の懸濁液を1~2滴落とし、自然乾燥させる。

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、 KH_2PO_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) 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-borat

e(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ェルプレート (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、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. 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/ μ ℓ)	2.5 μ ℓ
10倍濃度のPCR緩衝液	5.0 μ ℓ

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°C) 5分

変性 (94°C) 30秒

アニーリング (55°C) 30秒

DNA鎖伸長 (72°C) 1分

後熱処理 (72°C) 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 μℓ
ターミネータ混合液	8.0 μℓ
プライマー (1pmol)	3.2 μℓ

総量 20 μℓ

イ) 以下の条件でPCRを行う。

PCRの条件

変性 (96°C) 10秒

アニーリング (50°C) 5秒

DNA鎖伸長 (60°C) 4分

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。

3. 検疫感染症等の病原体保有実態

(1) 調査対象

全国の主な港湾区域 (小樽港、稚内港、釧路港、仙台港、石巻港、東京港、鹿島港、横浜港、新潟港、名古屋港、四日市港、大阪港、神戸港、広島港、新居浜港、高知港、松山港、門司港、博多港、鹿児島港及び那覇港等) 並びに空港区域 (新千歳空港、仙台空港、成田空港、関西空港及び那覇空港等) の合計34カ所において捕獲されたネズミを対象とした。

(2) ペスト抗体検査

ペスト抗体価は、ペスト菌に特異的なエンペロープ抗原であるFraction-I抗原を用いたラテックス凝集反応試験及びELISA法により測

定した。

(3) ハンタウイルス抗体検査

HFRSの病原体であるハンタウイルスの抗体価は、抗原としてハンタウイルスSR-11株（ソウル型）を感染させたVeroE6細胞を用い、被血清を一次血清、FITC標識抗ラットIgG又は抗マウスIgGを二次血清として間接蛍光抗体法を行った。血清希釈32倍以上の希釈で反応するものを陽性とした。

(4) リンパ球性脈絡髄膜炎(LCM)ウイルス抗体検査

LCM抗体価は、組み換えバキュロウイルスで発現、精製したLCMウイルスの組み換えタンパク（国立感染症研究所、森川茂室長提供）を用いたELISA法により測定した。

(5) 内部寄生蠕虫類検査

広東住血線虫検索のため、肺、心臓を実態顕微鏡下で観察・同定した。

C. D. 研究結果及び考察

1. 日本の港湾区域等で捕獲されたネズミ、ノミの種類と推移

(1) 港湾区域等におけるネズミ

1971年から2000年の30年間、港湾区域等で捕獲されたネズミは、合計64,499頭で、内訳をみるとドブネズミ47,586頭(73.8%)と最も多く、次いでハツカネズミ8,904頭(13.8%)、クマネズミ5,140頭(8.0%)、アカネズミ2,377頭(3.7%)及び「その他」256頭(0.4%)の順で、10年毎に大幅な減少がみられた(表1)。捕獲ネズミの種類構成を10年毎の推移で見ると、ドブネズミは、どの時期でも62.7~82.6%と、第一位を占めてはいるが、減少傾向であった。また、クマネズミも減少傾向であった。一方、ハツカネズミとアカネズミは、増加傾向であった。「その他」のネズミが多い理由は、1983年まで、ドブネズミ、クマネズミ、ハツカネズミの3種を分類、アカネズミ等は分類ができて「その他」として報告することとしていた。しかし、1984年以降の分類で、ドブネズ

ミ、クマネズミ、ハツカネズミ、アカネズミ及びハタネズミまで行うこととなつてから、「その他」が減少した。「その他」の中で分類が確かな例として、1984年1月13日、水島港の川崎製鉄で捕獲された、ペロミスカス(雄)が入っていた。このネズミは、水島港の川崎製鉄で捕獲され、検疫所で同定検査を行ったが、分類ができず国立博物館へ分類を依頼したものである。その後同地区を詳細に調査したが、ペロミスカスは捕らえられていない。なお、当時水島港は、ペロミスカスの生息が知られている北米との貿易が盛んで、鉄屑に紛れて侵入した可能性が高い。ペロミスカスは、北米一帯に生息する小型のネズミで、1993年にハンタウイルス肺症候群の原因ウイルスが発見されたことで知られているネズミであつて、専門家からは北米の内陸部に生息する同種が、我が国に侵入することはないといわれていた。

主な港湾区域等で捕獲されたネズミの数をみると、東京、横浜、名古屋、神戸、門司、博多などの港では、ドブネズミ、クマネズミ、ハツカネズミが多く捕れ、内陸部に位置する成田空港や河川部にある伏木富山港では、アカネズミが多く捕れている。

同じく港湾区域で捕獲されたネズミの種類推移を見ると(図1、図2及び図3)、最近の10年(1991年から2000年)では、ハツカネズミが捕れる率が、新潟港、伏木富山港、横浜港、大阪港、神戸港、関西空港(大阪空港)、門司港において1971年から1980年の10年と比較すると大幅に増加している。即ち、捕獲ネズミの中でハツカネズミの占める率は、20%以上の港が最初の10年で1港、以降の20年で6港にも及んでいる。したがって、最近の港は、ネズミの生息環境の面からみると、大型のネズミ(ドブネズミ、クマネズミ)から、小型のハツカネズミが生息するのに適した環境へと変化していることが伺える。

(2) 船舶内におけるネズミ

船舶で捕獲されたネズミは、合計9,413頭で、内訳をみるとクマネズミ5,907頭(62.8%)、ドブネズミ1,843頭(19.6%)、ハツカネズミ1,641頭(17.5%)、「その他」16頭の順で、駆除船舶数の減少に伴って10年毎に大幅な減少がみられた(表1)。「その他」と分類した16頭には、*Rattus exulans*(ナンヨウネズミ)などが含まれている可能性は高いが、詳細な記録がないため明らかにできなかった。しかし、筆者が1969年から1974年の5年間、神戸検疫所に勤務していた折り、外国船舶の青酸ガス駆除により捕獲されたネズミを検査した記憶によると、クマネズミの外部形態の特徴(腹部の毛色が白色等)からヨウシュウクマネズミ(オセアニア型クマネズミ)と思われるネズミを多数みているが、染色体を調べておらず、また、写真やネズミ本体を保存していないため正確なところは不明であるが、外国国籍の船舶内の中には明らかにヨウシュウクマネズミなどの外来種が含まれていた。

最近の10年間(1991年から2000年)では、ドブネズミ、クマネズミ、ハツカネズミともに捕獲頭数は極めて少ない。これは、船舶貨物の輸送形態の変化、即ち、バラ積みからコンテナ貨物へと移行したことによって、船舶内ではネズミは捕獲されず、コンテナの中に荷物と一緒に紛れ込んで直接港湾区域等の国内又は内陸部へ運ばれていることが考えられる。このことは、コンテナの衛生調査の結果やコンテナヤード周辺部のハツカネズミに外来種が確認されている事実とも一致する。

(3) 航空機内におけるネズミ等

1981年から1997年の17年間、成田空港において航空機内で捕獲されたネズミをまとめたのが表2である。これまでに、世界の10空港から来航した航空機で13回ネズミ等が捕獲された事例があった。ネズミ等は合計15頭で、内訳をみるとハツカネズミ8頭、クマネズミ3頭、*Rattus sp.*2頭、ドブネズミ1頭と、ネズミではないがジャコウネズミ1頭が確認された。捕

獲された場所は、航空機内が最も多く8回、次いで手荷物2回であった。船舶のコンテナ貨物と同じく、ネズミが航空貨物や手荷物に紛れ込んで侵入していることが明らかになった。

(4) 港湾区域等で採取されたノミ

ケオプスネズミノミは、世界各地や我が国でのペスト発生と密接な関連があったことが知られており、ペストサーベイランスにおいては、ネズミと同様にネズミノミの対策は重要である。全国の港湾区域のネズミに付着して、採取されたノミの種類を1971年から2000年の30年間について調べてみると、合計29,123個体で、その内訳はヨーロッパネズミノミ16,323個体(56.0%)と最も多く、次いでケオプスネズミノミ8,851個体(30.4%)、ヤマトネズミノミ1,999個体(6.9%)、「その他」1,013個体(3.5%)、メクラネズミノミ937個体(3.2%)の順であった(表3)。ノミの地理的分布をみると、ヨーロッパネズミノミ、ヤマトネズミノミの2種は、ともに全国の港から採取されていた。しかし、ケオプスネズミノミとメクラネズミノミは気候が温暖な地域に多く、積雪が多い地域では採取の報告は稀であった。しかし、10年毎の推移でみると、最近ではヨーロッパネズミノミの占める率が減少、ペストと深い係わりがあるケオプスネズミノミが多くなり、その大部分は那覇港で採取されたものであった。したがって、このような衛生環境のもとでは、一端ペストが侵入すると、流行する可能性が大であることから、ノミのコントロールとともにペストの存在の有無を継続して調査する必要がある。

船舶内のネズミに付着して採取されたノミは、合計359個体で、内訳は、ケオプスネズミノミ357個体(99.4%)と最も多く、次いでヨーロッパネズミノミ2個体であった。ここ10年間はねずみ駆除船舶の減少からネズミが採取されず、船舶からノミを採取していない(表3)。

2. 遺伝子分析等による侵入動物の実態

(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4、表5及び図4である。

①ドブネズミ (*Rattus norvegicus*)

日本の小樽港など計8カ所の港湾区域等及び内陸部で捕獲されたドブネズミ82頭の核型は、すべて $2n=42$ で日本の内陸部と同じ染色体数であった(表4)。内陸部(東京都内、小樽市内)の港湾周辺のドブネズミも染色体数は $2n=42$ (表4)であった。

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たことができなかった。

②クマネズミ (*Rattus rattus*)

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。また、Becaso va(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。

日本の港湾区域等のうち、鹿島港、清水港、新潟港、鹿児島港及び内陸部(東京)で捕獲されたクマネズミは、外部形態上背面の体毛色が茶褐色、腹面がバフ色及び測定値(頭胴長、尾長、尾率、体重、後足長、耳長)が在来種と一致(表6-1)、染色体は清水港における雌の1頭が $2n=41$ (XO型)を示したほか、いずれも $2n=42$ のアジア型で、Cバンドの欠失が認められる在来種であった(表6-1)。し

かし、1999年9月から2001年に北海道小樽港のほぼ全域から捕獲されたクマネズミは、すべてが染色体数 $2n=38$ で、Cバンドパターンもオセアニア型と一致、外部形態上も体毛色(背面が茶褐色又は黒茶色、腹面が白、全身が黒色)と、後足長、体重の測定値が大型でアジア型とは異なる外来種の存在が確認された(表6-1)。在来種との交雑種は発見されなかった。

小樽港でのオセアニア型クマネズミの発見は、アジアで初めての侵入定着であって、この侵入経緯を調べておくことは、感染症保有ネズミが侵入した場合、汚染拡散の基礎データとなり重要である。オセアニア型クマネズミがいつどここの国から小樽港へ侵入拡散したかを、小樽港港湾区域衛生対策実施報告書などから調べてみた(図5、表7、表8、図6)。侵入時期は、ネズミの捕獲・駆除の年次別推移から見ると、過去10年以上捕獲されなかったクマネズミが1997年以降、港の全域で異常に捕れ始めた(図5、図6)。また、小樽港で捕獲されたネズミの年と位置からも、1997年より少し前に侵入したものと考え、1996年以前のねずみ族検査記録表を含め精査したところ、1996年にも明らかに8頭のクマネズミが捕獲されていた。これらの状況から、おそらく1回の侵入だけでなく複数回、異なる場所からネズミが入ったことが考えられた。そこで、どここの国から侵入拡散したかを、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7)。特に小樽港へは、1992年頃からロシアの小型魚介類積載船舶の来航が急増していた(表8)。この小型船は、埠頭の岸壁の高さとほぼ同じで、船内にネズミが生息していた場合、陸地への侵入が容易であって、同港では外航船舶接岸埠頭に倉庫・サイロ群が存在する環境であった(図7)。したがって、複数回侵入

可能な条件が整う国として考えられるのはロシアである。1992年から急増したロシア船からオセアニア型クマネズミが小樽港へ侵入し、在来クマネズミの存在しない穀類倉庫、飼料工場内で繁殖が行われ、港のほぼ全域に拡散したものと推測された。

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についても、オセアニア型クマネズミが侵入している可能性が考えられることからネズミ調査を行った。2000年と2001年に調査を行ったが、クマネズミを捕えることができなく、オセアニア型クマネズミの存在の有無を確認できなかった。そこで、以前から北海道にオセアニア型クマネズミが存在していたかを確認する目的で、過去に北海道の港で捕獲されたクマネズミの測定値を分析してみた。1963年から1967年に稚内港において捕獲されたクマネズミについて、測定値を他の地域と比較すると、清水港などのネズミと似ており、アジア型の在来種と考えられた(表6-1)。このことから、北海道のクマネズミは従来から日本の本州や九州と同じく、染色体数 $2n=42$ のアジア型が生息していて、小樽港にはロシアとの交流が盛んになった1992年以降、ロシアからオセアニア型クマネズミが侵入定着したものと推測された。

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 (*Mus musculus*)

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ドメスティカス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レ島においても染色体数が $2n=40$ より少ないドメスティカスが発見されている

(Davidianら, 2000)。

日本の小樽港、新千歳空港、釧路港、東京港及び鹿児島港の港湾区域で捕獲されたハツカネズミ25頭の染色体数は、すべて $2n=40$ であって、染色体数変異のハツカネズミは発見されなかった(表4)。

④アカネズミ (*Apodemus speciosus*)

港湾区域等で捕獲されたアカネズミ13頭の染色体数は、新千歳空港及び新潟港のアカネズミが $2n=48$ であった(表4)。土屋(1976)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群に分けられる。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まっている。したがって、新千歳空港及び新潟港のアカネズミは東側の $2n=48$ であった。

⑤エゾヒメネズミ (*Apodemus argenteus hokkaidi*)

新千歳空港で捕獲されたエゾヒメネズミの染色体数は、 $2n=46$ であった(表4、図4)。

⑥エゾヤチネズミ (*Clethrionomys rufocanus bedfordiae*)

新千歳空港及び釧路港で捕獲されたエゾヤチネズミ40頭の染色体数は、 $2n=56$ であった(表4)。

⑦ジネズミ (*Crocidura dsinezumi*)

新潟港で捕獲されたジネズミの染色体数は、 $2n=40$ の日本在来種であった(表4、図4)。

(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。港湾区域等のドブネズミのうち、Hbbの分布パターンは、ABとBが共に多く認められた。港別では小樽港など9港中5港とBタイプが占める割合が最も多く、次いでABタイプが新千歳空港など3港、Aタイプが

川崎港の1港であった。また、多くの港は2タイプ又は3タイプの多型であった（表9）。

②クマネズミ

クマネズミのHbbパターンは、a、a b、b、の3つの多型であるが、今回調べた港湾区域のクマネズミは、すべてaタイプのみと比較的均一性であった（表9）。

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が、亜種の分類には適さなかった。

③ハツカネズミ

ハツカネズミのHbbパターンは、p型、d型及びs型の多型であって、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型の方は、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（表9）。東京港ではs型が認められ、外来種のハツカネズミの侵入定着の可能性が認められた。

一方、北海道産のハツカネズミには、従来からd型が確認されており、今回捕獲されている小樽港と釧路港のハツカネズミにもd型を認めた。

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（表9）。アカネズミのHbbパターンが、2つの型か否かはさらに多くの個体を調査する必要がある。

⑤エゾヤチネズミ

北海道新千歳空港及び釧路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型を示した（表9）。エゾヤチネズミのHbbパターンが2つの型か否かはさらに調査数を増やしてから決定する必要がある。

⑥エゾヒメネズミ

北海道新千歳空港におけるエゾヒメネズミのHbbパターンは、1本と2本のバンドの2つの型を示した（表9）。エゾヒメネズミが2つの

型か否かは調査数を増やしてから決定する必要がある。

⑦ジネズミ

新潟港におけるジネズミのHbbパターンは、1本のバンドを示した（表9）。調査数を増やす必要がある。

（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8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8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26

6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があり、それを用いて亜種が区別できた。解析により各港湾で捕獲されたハツカネズミは、3亜種22の多型に分けることができた(図9、図10)。ハツカネズミを解析した総合計62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、キャストネウスに属するものが31頭(50.0%)、ムスクルスに属するものが25頭(40.3%)及びドメスティクスに属するものが6頭(9.8%)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11のとおりである。

調査を行った6港のうち東京港、大阪港、鹿児島港の3港(50.0%)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、小樽港、石狩湾港、釧路港のキャストネウスは、日本在来と考えられたが、九州鹿児島港(志布志港を含む)におけるハツカネズミとも一致していることから、船舶貨物など何らかの関連があるものと推測された。

(4) 現地調査

新潟港、小樽港、小樽市内、釧路港、名古屋港、四日市港及び鹿児島港に出向きネズミの生息、捕獲、染色体分析、感染症実態調査などを行った。主な港の衛生状態は次のとおりであった。新潟港では、ネズミの捕そ率が10.1%と高く、船舶の発航地(国)は韓国、ロシア、北朝鮮、ベトナムなどである。小樽市内の調査は、港で捕れているオセアニア型のクマネズミと似ているネズミが最近みられるようになったとの情報から行ったが、ドブネズミとハツカネズミの2種が捕獲された。鹿児島港では、ネズミの捕そ率が7.7%と高く、ハツカネズミ9頭、クマネズミ6頭、ドブネズミ3

頭が捕獲され、飼料工場での衛生状態は、必ずしも良好ではなかった。

3. 港湾区域等に生息するネズミの種類と特徴

(1) クマネズミ

港湾区域のうち、小樽港を除く港に生息するクマネズミの特徴は、表6-1に示すとおりであった。尾長は、頭胴長よりも長く(日本在来種と同じ尾率 $108.4 \pm 5.1 \sim 115.5 \pm 13.0$ 、稀に尾が短い場合があるが、体毛色、耳長などからドブネズミと区別できる。)、耳は大きく前に倒せば目を覆う。染色体をみると、 $2n=42$ のアジア型は、Cバンドの欠失を示し、日本在来種と同じであった。

小樽港のクマネズミは、体毛色が全身黒又は背面茶褐色、腹面白色の大型で、染色体 $2n=38$ 、Cバンドが存在し、日本在来種とは明確に区別が可能なオセアニア型であった。一般に捕獲したクマネズミはヒトが近づいても鳴かないが、このオセアニア型クマネズミは鳴く。

(2) ドブネズミ

港湾区域に生息するドブネズミの特徴は、表6-2に示すとおり内陸部と同じで、日本在来種と外来種とを区別する遺伝特性を見出していない。尾長は、頭胴長に比べ短い(尾率 90.5 ± 6.3)。

(3) ハツカネズミ

港湾区域に生息するハツカネズミの特徴は、表6-2のとおりであった。キャストネウスやドメティスカスが混在する横浜港のハツカネズミは、清水港のハツカネズミに比べ大型であった。

(4) アカネズミ(エゾアカネズミとホンドアカネズミ)

東日本(新千歳空港)と西日本(伏木港)に生息するアカネズミの特徴は、表6-2のとおりで、前者の染色体数 $2n=48$ と後者 $2n=46$ とに区別された。この種の生息域は河川、山を利用した海港や空港区域に多くみられる。これ

らの地域に他のハツカネズミ、ヒメネズミなどが混在する場合は、種の同定に染色体検査を取り入れるなど、注意を払う必要がある。

(5) エゾヒメネズミ

北海道新千歳空港のエゾヒメネズミの特徴は、尾長が頭胴長に比べ長く（尾率 128.4 ± 5.3 ）、表6-2のとおりであった。

(6) エゾヤチネズミ

北海道新千歳空港のエゾヤチネズミの特徴は、尾長が頭胴長に比べ短く（尾率 45.3 ± 5.0 ）、表6-2のとおりで釧路港のネズミも同じであった。

4. 検疫感染症等の病原体保有実態

全国の港湾区域等において捕獲されたネズミ類の細菌（ペスト菌）、ウイルス（ハンタウイルス）及び内外寄生虫の汚染実態調査を行った。

(1) ペスト抗体の保有調査

歴史的に最も重要な感染症のペストは、本来齧歯類の感染症で、我が国では1899年神戸に初の患者が発生以来、大阪等の26都府県にまん延したが、幸いその後1930年の大阪でのペスト保菌ネズミ発見以降、今日までペスト発生は見られない。

しかし、Suzuki(1974)は1970年代に港湾区域生息ネズミについて、その寄生ノミの調査と保菌検査に併せて血清学的調査を実施し、検査ネズミの内に少数ながら特異的ペスト抗体の保有を認め、港湾におけるペスト監視強化の必要性を指摘した（表10）。また、世界には未だにペスト汚染地域が多数存在し、1997年には1年間でWHOに報告された世界のペスト患者は、15カ国5,419人に達し、1986年から1990年の5年間での年平均患者数1,087人の5倍を超えていた。また、1991年以降のペスト患者数は明らかに増加しており、過去15～30年間ヒト及び齧歯類にペストの発生が報告されていなかった国々にも発生している状況であって、ペスト侵入の危険は常にある。特に1

994年9月インドにおいてペスト流行事件が発生、世界中の防疫機関が緊張し、一部の国では、インドからの航空機の乗り入れを禁止するなど強い措置がとられた。

また、世界のペスト輸入例を調べてみると、ペストネズミの輸入例は報告されていないが、1966年ベトナムから米国への帰国者、1970年インドからフランスへの入国者と1990年ボリビアから米国への帰国者の3件と稀にある。

検疫所では、港湾区域等の衛生対策の一環としてネズミの捕獲調査を実施しているが、ペストの診断上重要なペスト抗体保有調査は一部の検疫所で行われているに過ぎなかったものを、1994年9月に発生したインドにおけるペスト流行事件を契機に日本へのペスト侵淫状況を把握するため、全国の検疫所の協力を得て、港湾区域等に生息するネズミの血清中のペスト抗体保有調査をした。ペスト抗体価は、検査に供されたネズミのすべてが陰性であった（表10）。

今回、1999年から2001年の間、全国の港湾区域等計34カ所において捕獲されたネズミ（外来種のオセアニア型クマネズミ、キャストネウス、ドメスティカスを含め）2,288頭（ドブネズミ1,812頭、クマネズミ115頭、ハツカネズミ229頭、アカネズミ107頭、ヤチネズミ24頭、ハタネズミ1頭）についてラテックス凝集試験又はELISA法により抗体価の測定を試みたところ、いずれの検体にも特異的なペスト抗体を認めなかった（表11）。したがって、全国港湾区域等のネズミはペストに侵淫されていないことが明らかになった。しかし、次に述べる他の再興感染症を例に上げてみると、我が国におけるペストサーベイランスは、検疫所が唯一行っている機関であって、今後も継続した調査が必要である。

即ち、偶蹄類動物が感染する口蹄疫は、19世紀末までにヨーロッパ、アジア、アフリカなど全世界的な発生が見られていたが、その後は減少、長年発生のない国が、日本、韓国

オーストラリアなど数カ国程度であった。最近、台湾では1997年に70年ぶりに大規模な発生があり、また、2000年に100年ぶりに日本でも発生が認められ大規模な蔓延防止対策がとられた経緯がある。この様にひとたび侵入した感染症を根絶することは経済的な打撃を受けるだけでなく非常に困難を伴うものである

(2) ハンタウイルス抗体の保有調査

HFRSは、ハンタウイルスによって起こる急性感染症の総称で、高熱、出血傾向と腎機能障害を伴う疾病で、極東地域からロシア、東欧、スカンジナビア半島にまで存在する。日本では、1960年代から1970年代に大阪市の梅田でネズミが感染源と疑われたHFRSの発生がみられた。その後、1980年代前半から世界の野そや港湾区域の野生ネズミから抗体・ウイルスが検出されてきた。また、日本の医生物学系実験室では、実験系ラットなどからウイルスが分離され、ラットを扱うヒトに感染者や死者が多発した。HFRSの病原体であるハンタウイルスの侵入経路として、ネズミの移動に伴い中国大陸、朝鮮半島などを経て船舶により我が国の港湾区域に入り込んできた可能性が考えられた。

1975年から1998年の間、多くの研究者によって行われた我が国の主要港におけるドブネズミのハンタウイルス抗体保有調査の結果をまとめた(表12)。陽性率は、11.6%~15.3%と高率を示しており、港別(1975年~1995年)で、陽性率15%以上を認める港は、東京港、新潟港、清水港、名古屋港、大阪港、神戸港及び那覇港の7港であって、陽性ネズミを認めた港は調査を行った港の82~90%と高いことが確認された。さらに1996年から1998年についてみると、陽性率15%以上を認める港は新たに門司港と博多港が加わり、全国の港湾区域等に生息するネズミのハンタウイルス汚染の広がりが確認された。

1999年から2001年の間、ネズミ2,288頭(ドブネズミ1,812頭、クマネズミ115頭、ハツカ

ネズミ229頭、アカネズミ107頭、ヤチネズミ24頭、ハタネズミ1頭)のうち、ドブネズミ61頭(3.4%)、ヤチネズミ1頭(4.2%)から抗体陽性を認めた。その内訳は、強陽性(512倍以上)14頭、中程度陽性(64倍から256倍)30頭、弱陽性(32倍)18頭であった(表13)。2種以外、他のネズミにはハンタウイルス抗体を認めなかった。

陽性ネズミが認められた港と陽性率は、新千歳空港(5.9%)、東京港(5.3%)、横浜港(0.9%)、名古屋港(3.3%)、大阪港(1.5%)、神戸港(10.7%)、松山港(4.3%)、博多港(13.6%)、那覇港(1.4%)、及び那覇空港(6.7%)の計10カ所であった(表13)。全国平均の陽性率は、2.7%と過去の結果と比較して有意に低下を示した。高い陽性率を認めた港は13.6%の博多港のみであり、また、陽性を認めた港は29.4%と急減した。即ち、今回行った調査では、陽性率が15%以上の港は皆無となり、唯一博多港が10%を超えたのみであった。高い抗体価(強陽性)を認めた港も名古屋港、神戸港、博多港と数少なく、ハンタウイルス汚染での問題が減少していた。

感染症汚染の面から改善がみられた要因を主な港について調べてみると、東京港は、ハンタウイルス汚染ネズミがみられた埠頭が本来の施設として利用されたため、ネズミの捕獲頭数と捕そ率が減少したことにより、汚染ネズミが減少したものと考えられた。名古屋港は問題のあった埠頭の整備、神戸港はねずみ駆除指導、博多港は岸壁の修理、那覇港は捕獲調査の強化などにより、各々の港で改善が図られたものと考えられた。

しかし、今回調査に用いた抗原は、ラットタイプのソウルタイプのみであったことから、ハンタウイルス汚染のすべての実態を明らかにしたことにはならない。また、日本にHPSの保菌獣として知られているペロミスカスが侵入していたことから、今後はMuerto canyon型、Hantaan型、Puumala型などの抗原を加え

た調査を行い、さらなる実態把握に努める必要がある。

(3) リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCM)の保有調査

髄膜炎を引き起こすLCMは、ラッサ熱と同じアレナウイルス群に分類され、ヨーロッパや米国で患者がでている。1985年から1990年の間、横浜港と大阪港で行われたMoritaら(1991)の調査では、陽性率が、前者16.4%~0%、後者51.4%であった(表14)。

今回、1998年から2001年の間、全国の港湾区域を調査対象に増やした。LCM抗体は、143頭中5頭から陽性ハツカネズミを確認した。陽性ハツカネズミが確認された港は、名古屋港3頭、神戸港2頭であった(表15)。これまでにLCM陽性ネズミが認められた港は、すべて外来種のハツカネズミが生息しており、これら外来ネズミとともにLCMが侵入したものと考えられた。遺伝子分析により外来ハツカネズミが確認された東京港などにも、LCM汚染が存在するか否かを今後の継続した調査により明らかにする必要がある。

(4) 広東住血線虫の保有調査

ヒトとネズミにおける広東住血線虫の分布は、南北回帰線には含まれた太平洋諸島や東南アジアなど、熱帯、亜熱帯地域を始め、日本、台湾、中国、ハワイなど、その分布はさらに広がりつつある。その広東住血線虫の分布拡大原因については、アフリカマイマイのほか、広東住血線虫に感染したネズミが運ばれた結果であると推定されている。

本線虫が日本の港湾区域で初めて認められたのは、川崎港、横浜港で、次いで東京、羽田空港であった。1967年から1995年までの間、多くの研究者によってまとめられた全国の主な港におけるネズミの広東住血線虫保有率の推移を1967年から1979年、1980年から1990年と、1991年から1995年に分けてみると、平均の陽性率は各々6.0%, 4.4%, 6.4%であって、高い陽性率を示した港は、新潟港の31.0%、名古屋

港の32.4%であって、港別では調査港数に対して各々、80%, 75%, 62%と多くの港から広東住血線虫の保有が確認され、汚染の拡大が明らかとなっていた(表16)。

今回、1996年から2000年の調査結果をまとめた。検体数4,854頭中、陽性数240頭(陽性率4.9%)であって、34港のうち6港(19.4%)から陽性ネズミを認め、新たに大阪港が加わった(表16)。

以上から、港湾区域等には外来ネズミが多数存在し、同時に港湾ネズミにハンタウイルス、LCM、広東住血線虫汚染が確認された。この事実は海外から感染症が侵入した可能性が高いことを示すことであって、ベクターによってペスト、HPS、ラッサ熱等が侵入する可能性も否定できない。したがって、ベクターサーベイランスを継続強化することは、感染症汚染を初期に発見、大規模な流行を引き起こす前に効果的な蔓延防止対策として措置が可能となり、衛生行政上重要な施策である。

E. 結論

1. 日本の港湾区域等におけるネズミ及びノミの種類と推移

1971年から2000年の30年間における港湾区域等のネズミは、ドブネズミが最も多く、次いでハツカネズミ、クマネズミ、アカネズミ等の順で、ペロミスカスも捕獲されていた。最近では、ドブネズミが減少傾向でハツカネズミが増加していた。

船舶内ネズミは、クマネズミが最も多く、次いでドブネズミ、ハツカネズミ等の順であって、最近の捕獲ネズミは極めて少ない。

航空機内では、ネズミが機内に紛れて侵入していた。

採取ノミの構成をみると、港湾区域ではヨーロッパネズミノミが最も多く、次いでケオプスネズミノミ、ヤマトネズミノミ、「その他」、メクラネズミノミの順であった。地理的分布は、ヨーロッパネズミノミ、ヤマトネ