

れる。

E. 結論

粘着式クリーナーによるダニ類調査法では、カーペットや寝具などの素材では、1回の採集だけでは、取り残しのあることが確認された。これを捕捉するためには同一素材について複数箇所からサンプリングを実施し、代表的な密度を得ることが必要であると判断された。本法は季節消長や分布調査などへの応用が可能であると判断されたが、まだこうした方法によるデータが存在しないため、今後の課題は本法によって様々なデータを蓄積することが必要と判断された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（健康科学総合研究事業）
分担研究報告書

屋内塵中のダニ類調査法の検討
ーダニ分離法と ELISA 法による調査結果の比較ー

主任研究者 田中生男 財団法人 日本環境衛生センター
研究協力者 橋本知幸 財団法人 日本環境衛生センター
武藤敦彦 財団法人 日本環境衛生センター
皆川恵子 財団法人 日本環境衛生センター

研究要旨 屋内塵中のダニ相とダニアレルゲン量を、1年間に渡り、4家屋5箇所から採取された屋内塵を用いて比較し、ダニ分離法と ELISA 法の有用性について検討した。屋内塵を調製して得た細塵についてダニ分離法によって得られたヒョウヒダニ数と、ELISA 法で測定した Der I および Der II 量は有意に相関 ($p < 0.05$) したが、家屋によっては相関が明確でないケースもあった。ダニ分離法では ELISA 法などで捕捉されないダニ類の生息実態が把握できること、ELISA 法では具体的にダニアレルゲンを測定できる点で有用性が確認されたが、課題として、最適なアレルゲン抽出条件の検討や、Der II 汚染基準の設定などが挙げられた。

A. 研究目的

ダニアレルゲンの測定は、アレルギーの原因物質の直接的な定量法として、いくつかの簡易法が普及しているが、精度の点では、ELISA 法のような具体的数値でアレルゲン量を評価する方法が優れている。一方、ダニ相調査は刺咬や吸血などの原因種を特定できるダニ分離法が、現時点ではもっとも汎用性が高いと言える。

しかし、アレルギー原因となるヒョウヒダニ類を除けば、ダニ相調査とアレルゲン測定は目的を異にするケースが多く、ダニ相調査では様々な種類の同定といった習熟技術を必要とすることから、同じサンプルを使って、同時に測定されることは少なかった。また、不特定多数の人が出入りするビルなどのスペースでは、一般住宅と違ってヒョウヒダニ類が少なく、アレルゲンに対する暴露の程度から見ても、そのリスクは低いと判断されるが、ダニアレルゲン量を調査した事例は少ない。

平成 16 年度、この研究班では種々のトラップを用いて、複数の建築物内で 1 年間に渡って昆虫類を調査したが、その際、各箇所ごとに屋内塵の採取も実施してきた。本研究で

はこの屋内塵を用いて、そのダニ相とダニアレルゲン量を、それぞれ、飽和食塩水浮遊法によるダニ分離法と ELISA 法により調査し、特にヒョウヒダニ数とアレルゲン量の関係と比較した。

B. 研究方法

1. 屋内塵採取および調整

本研究で用いた屋内塵の採取条件は、表 1 に示すとおりである。調査期間はいずれも 2003 年 10 月～2004 年 9 月とし、採取は居住者がそれぞれ実施した。なお、採取家屋は平成 16 年度に実施された「建築物内における昆虫等のトラップによる調査法の検討ならびに小バエ類および蚊類の発生動態調査」の対象家屋と同一である。採取した屋内塵を 9-200 メッシュで篩い分けし、200 メッシュ上に残った細塵からダニ分離とアレルゲン測定を行った。

表1 屋内塵の採取条件

採取家屋	家屋構造	所在地	採取場所 床材	毎月 採取回数
ビル内 A	コンクリートビル 地下1階	川崎市	Pタイル	1回
ビル内 B	同上4階 (収容飼育室)	〃	Pタイル	〃
民家A	木造住宅	神奈川県 大磯町	フローリング, カーペット, 畳	週7-14回 ×2週間
民家B	木造住宅	小田原市	フローリング, カーペット, タ イル	週2-5回 ×2週間
民家C	マンション9階	川崎市	フローリング, カーペット, 畳	週一回× 2週間

2. ダニ分離

細塵 100mg を三角コルベンに計り取り, 中性洗剤水, 飽和食塩水を順次加えて混和し, 15~30 分間静置した後に, 上清部をブフナー漏斗を用いてろ紙上に展開した. 次に, 実体顕微鏡下で, ろ紙上のダニを採取し, プレパラートを作成して, 同定した.

ヒョウヒダニ類については, 虫体が不完全でも胴体部の個数で1匹とカウントし, 発育ステージの区別はしなかった. 可能な限り, コナヒョウヒダニあるいはヤケヒョウヒダニまでの同定を行ったが, 種の同定が困難な場合にはヒョウヒダニ属として同定した.

なお参考データとして, ろ紙上のチャタテムシ頭部の個数もカウントした.

3. ヒョウヒダニアレルゲン測定

前記ダニ分離に供した細塵とは別に, 細塵 100mg を 15ml 容プラスチック管に計り取り, 0.05% tween20 含有燐酸緩衝液 (PBS-t) 10mL を加えて, 25°C で 4 時間混和した. 混和後の懸濁液 1 mL を 220×g で 20 分間遠沈し, 上清部中のヒョウヒダニ由来のアレルゲン (Der f I, Der p I, Der II) 量を, マウスモノクローナル抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法で測定した. 使用した抗体は Indoor biotechnologies 社 (英) 製で, 測定は添付手順書に従った.

C. 結果

1. ダニ相

各採取家屋におけるダニ分離結果およびダニアレルゲン測定結果を表 2~6 に示す. ダニ数およびチャタテムシ頭部数を示す数値は全て細塵 100mg 当たりの値で, Der f1, Der p1, Der2 の各アレルゲン量を示す数値は細塵 1 g 当たりの値である.

それぞれの採取場所のダニ相の特徴として, ビル内 A と民家 C は, 出現種類数が少ないこととダニ密度が年間を通じて 500 匹/g の少ないレベルで推移するという点で類似しており, 検出されたヒョウヒダニ類では, ヤケヒョウヒダニ (以下 Dp) が少なく, コナヒョウヒダニ (以下 Df) が多かった点も共通した. ビル内 B ではヒョウヒダニ優占率が低い上に, イエダニほぼが一年中検出されるなど, ヤドリダニ亜目の割合が高かった. 民家 A と B では, Df と Dp が拮抗的に出現している点が似ているが, 民家 A ではイヌミミヒゼンダニやハトフタオウモウダニなどのペットに由来すると見られる動物寄生性のダニ類が, 複数の月に渡って見つかること, 民家 B ではダニ密度が 1000 匹/g を超える月が 6 回もあることが特徴と言える.

平成 16 年度に実施された昆虫類調査では, ゴキブリ用, メイガ用, タバコシバンムシ用粘着トラップにタカラダニ科やヤドリダニ亜目のダニ類が捕獲されているが, 捕獲数は全般的に少なく, これらの方法に比べれば, 検出精度はダニ分離法のほうが高かった. しかしながら, 民家 C の 5 月にゴキブリ用粘着トラップでヤドリダニ類が 21 匹捕獲されているのに対し, 今回のダニ分離結果ではその時期にヤドリダニ類は検出されていない. またタカラダニ類もダニ分離結果では検出されなかった. 一方, ダニ分離の際, 補足的にカウントしたチャタテムシ類の頭部の数は, 昆虫類調査で最も効率よく捕獲されていたタバコシバンムシ用トラップよりも多い傾向があった.

2. ダニアレルゲン量

屋内のメジャーアレルゲンとして知られる, ヒョウヒダニ類の糞に由来するグループ 1 アレルゲン (Der I) と, 虫体に由来する

グループIIアレルギー (Der II) を測定した結果、ビル内Bでは調査期間中はどのアレルギーも検出限界未満のレベルであった。ビル内Aも検出限界未満の月が多かったが、Der Iの結果では、ダニ分離結果と同様の $Df > Dp$ という傾向が見られた。民家A~Cではアレルギー量は多く、急性発作を引き起こすとされるWHOの基準 (Der I量 = $10 \mu\text{g/g}$) を上回るレベルが複数回あった。特に民家CではDer f IとDer p Iの比率はダニ分離結果と一致したが、Der f I量が $10 \mu\text{g/g}$ を上回る月が11回もあり、ダニ分離結果でヒョウヒダニ数が比較的少ないレベルで推移していたことと矛盾する結果であった。

得られた結果から、アレルギーが測定限界未満やダニ数 = 0のデータを除外し、各項目を対数変換して、ヒョウヒダニ数と各ダニアレルギー量の関係を図1~3に示した。

3者の関係はピアソン積率相関で $r=0.5910\sim 0.8670$ を示し、いずれも有意性 ($p < 0.05$) が認められた。各直線回帰式から、ヒョウヒダニ 100匹/gに相当するアレルギー量は、Der Iが $1.85 \mu\text{g/g}$ 、Der IIが $0.67 \mu\text{g/g}$ となった。また、Der I $10 \mu\text{g/g}$ に相当するDer II量は $2.41 \mu\text{g/g}$ となった。

D. 考察

建築物内のダニ類の調査法として種々の方法が考案されてきたが、本研究班でも2年間に渡って議論されてきたとおり、これらの方法にはそれぞれに特徴があり、目的、時間、コスト、オペレータの技術レベルに応じて使い分けることが必要である。建築物内におけるダニ調査の目的を集約すれば、ダニの種類や密度といったダニ相調査と、ダニアレルギー測定との2つに大別される。

原因不明の虫刺されやかゆみが発生した時、その原因がダニか否かを判断する場合には、様々な種類のダニ類、時にはノミやアリガタバチなどの刺咬性昆虫類などの情報が得られるダニ分離法は有効である。しかし、同一建築物でも屋内塵の採取場所によってダニ相は異なり、今回のダニ分離結果でも、平成16年度の昆虫類のトラップで捕獲されたダニ類が検出されないケースがあった。この一因として、今回のダニ分離法で検査に用

いた細塵量が、わずかに100mgであったことも考えられたが、ダニ分離では、調査対象場所を限定して屋内塵を採取し、それぞれの場所ごとにダニ相を調査するのが適切であると考えられる。また、ダニ分離法は操作に手間がかかり、速やかに行われるべき原因調査としてはやや難がある。そうした場合には粘着採集法などの簡易法との併用を考慮すべきであろう。なお、ダニ分離法はチャタテムシ類の密度調査への適用も考えられるが、生死の判別が困難であるため、トラップ法などの相関を検討することが課題であろう。

一方、ダニアレルギー測定の中でELISA法は、アレルギー量を具体的に数値化して示すことができる。ダニアレルギーとしては世界的に見て、ヒョウヒダニ類の重要性が高く、わが国でも九州以北では最も重要なダニアレルギーであることは広く認識されている。しかし、南西諸島ではヒョウヒダニ類以外に、アレルギー性ダニとして知られるネッタイタマニクダニが生息しており、また、日本の建築物内では、主に畳から、ケナガコナダニ、ニクダニ類、ホコリダニ類が大発生することもある。こうした屋内塵性ダニ類の医学的重要性や一般住宅以外での生息の実態は今後、検討されるべき課題である。

また今回、ダニアレルギー測定のための屋内塵調整は、ダニ分離用の細塵を基準にしており、200メッシュを通過した微細塵は使用していないため、単位重量当たりのアレルギー量を過小評価している可能性がある。さらに今回のアレルギー抽出のためのリン酸緩衝液 (PBS-t) 抽出倍率は細塵 : PBS-t = 1 : 100 (w/v) であったため、測定限界値がDer Iで0.781、Der IIで $0.391 \mu\text{g/g}$ とやや高かった。希釈倍率は低いほど高感度になるが、液量が少なく、攪拌・混和が難しくなるので、抽出時間などを含めて、これまで議論が少なかった適切な抽出方法について、今後も検討されるべきである。

これまでDer I量 $2 \mu\text{g/g}$ = ヒョウヒダニ数 100匹/g というWHOの基準 (感作の閾値) が知られていたが、今回の結果から算出された数値ではヒョウヒダニ 100匹に対するDer I量はこの基準値に近いものと判断された。しかし、前述のとおり、今回はDer Iが多く

蓄積していると考えられる微細塵を測定対象から外しているため、これらを合算すれば Der I 相当量はさらに高い値を示すことが予測される。また、Der II についてはダニ数との相関やアレルギー症状との関係も検討されていない。市販の複数のアレルギー簡易測定キットが Der II を測定していることを考慮すれば、Der II とダニ数の関係については早急に調査されるべきである。

ヨウヒダニ数がそれほど多くなくてもアレルギー量が高いケースも見られ、ヒョウヒダニ類については、直接的原因となるアレルギー測定を、刺咬性・吸血性のダニ類についてはダニ分離法等によるダニ同定によって、それぞれの密度を調査すべきであると判断された。なお、Der II 量の汚染基準、アレルギー抽出条件等の標準化に関して今後も検討が必要である。

E. 結論

同一箇所から採取された屋内塵について、ダニ分離法によるダニ相調査と ELISA 法によるヒョウヒダニアレルギー量測定を実施した結果、ダニ分離の結果得られたヒョウヒダニ数と Der II 量の相関は高く、ヒョウヒダニ数と Der I 量の相関は比較的低かった。ヒ

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

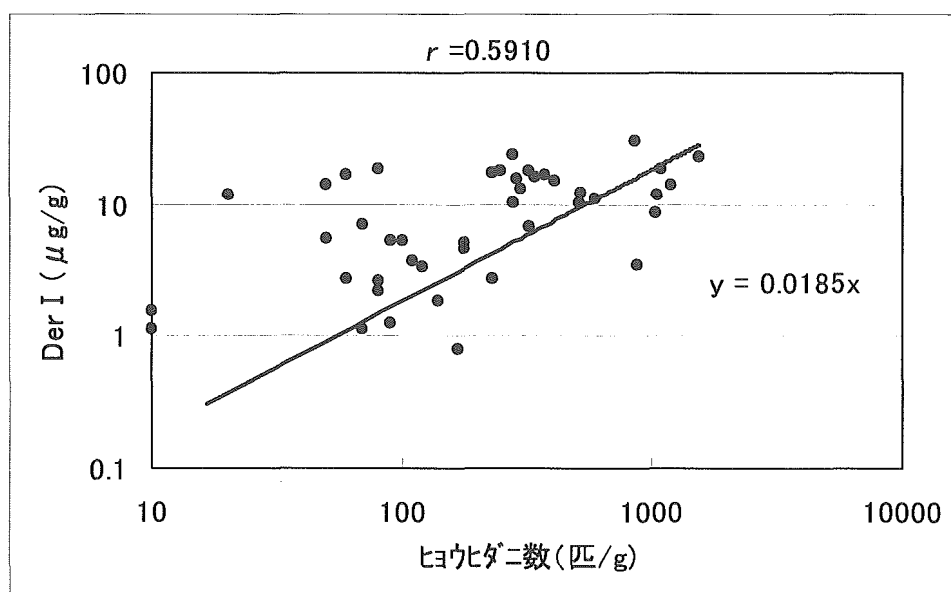


図1 ヒョウヒダニ数と Der I 量の相関

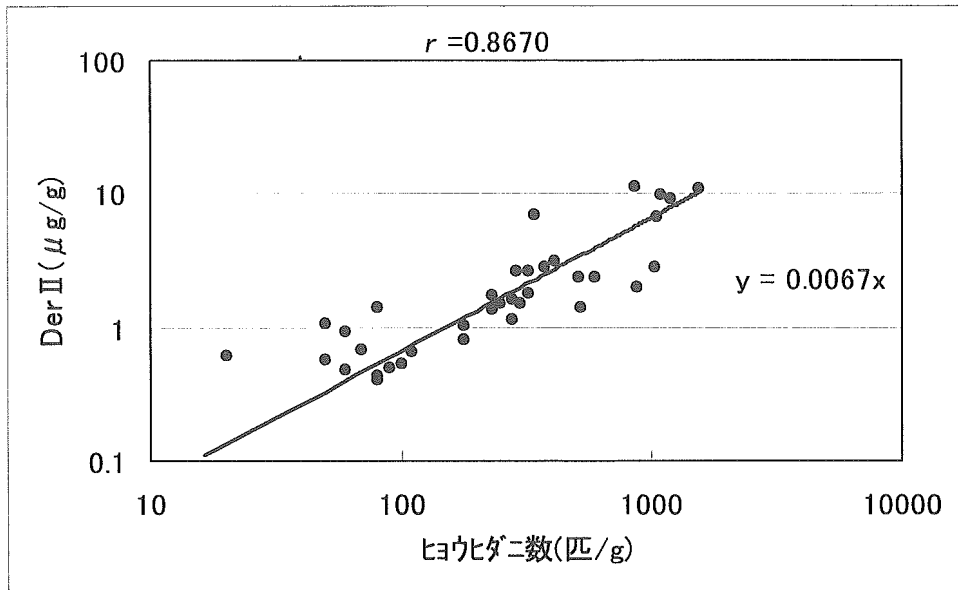


図2 ヒョウヒダニ数と Der II 量の相関

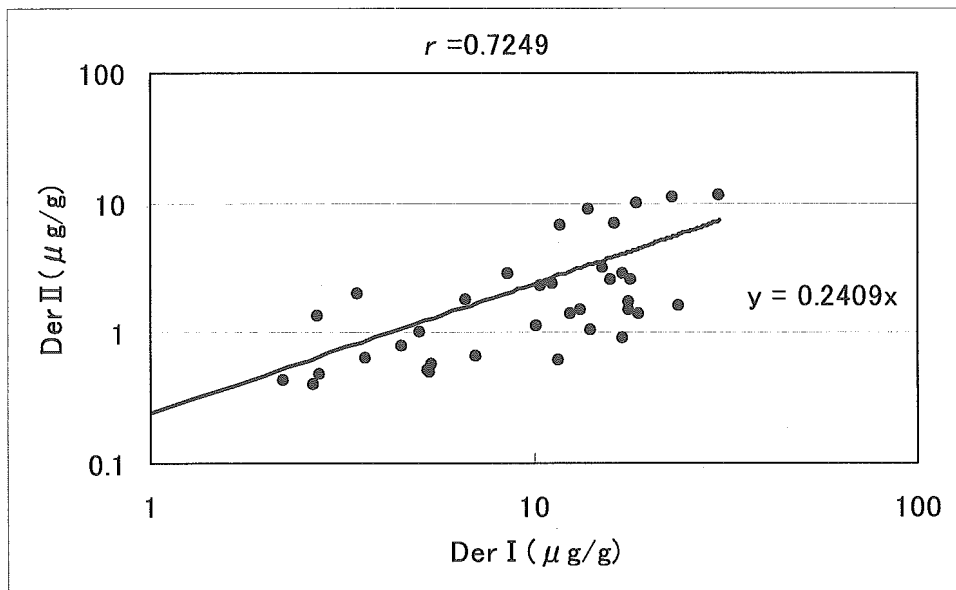


図3 Der I 量と Der II 量の相関

表2 ビル内Aのダニ相およびアレルゲン量の推移

ビル内A	2003年					2004年						
	10月	11月	12月	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月
コナヒョウヒダニ	12	7	15	19				4	1	4	1	8
ヤケヒョウヒダニ	1						1		2			
ヒョウヒダニ属未同定	1		2	2	1							1
ケナカコナダニ			1	1								
イエマルニクダニ	1									1		
ハイチヒケダニ												1
コナダニ亜目未同定									1			
ヤドリダニ亜目未同定			1			1						
ツメダニ科									1			1
ホコリダニ科		1	1	3								
カザリヒワダニ								1				
ササラダニ亜目未同定			1	1	1	3	3		2		1	1
合計	15	8	21	26	2	4	9	1	10	2	12	1
ヒョウヒダニ数計	14	7	17	21	1	0	5	1	6	1	9	0
Der f1(μg/g)	1.84	1.12	0.801	<0.781	<0.781	<0.781	<0.781	1.13	2.74	1.53	1.24	0.783
Der p1(μg/g)	<0.781	<0.781	<0.781	<0.781	<0.781	<0.781	<0.781	<0.781	<0.781	<0.781	<0.781	<0.781
Der 2(μg/g)	<0.391	<0.391	<0.391	<0.391	<0.391	<0.391	<0.391	<0.391	0.472	<0.391	<0.391	<0.391
チャタテムシ頭部(個)			5	7	5	3	8	1	6	6	35	7

表3 ビル内Bのダニ相およびアレルゲン量の推移

ビル内B	2003年					2004年						
	10月	11月	12月	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月
コナヒョウヒダニ	1		1						1			
ヤケヒョウヒダニ									1			
ケナカコナダニ	5	1	1		1	7	21	3	4	9	4	
イエマルニクダニ			1									
イエニクダニ		1										
ハイチヒケダニ	4											
コナダニ亜目未同定	1					1				1		
イエダニ	1	6	2		8	3	1	1	2	3	2	1
マヨイダニ科	7	1	1	2	1		2	3	1	4		
トケダニ科							1	2		2		
ヤドリダニ亜目未同定	1	2	5	2	2	8	4	3	2	10	10	5
ツメダニ科	1	2	1				1				1	
ホコリダニ科					1					2		
ハダニ科												1
イエササラダニ			2	1		2	2	1				
合計	21	13	14	5	13	22	33	11	11	31	17	7
ヒョウヒダニ数計	1	0	1	0	0	0	0	0	2	0	0	0
Der f1(μg/g)	<0.781	<0.781	<0.781	<0.781	<0.781	<0.781	<0.781	<0.781	<0.781	<0.781	<0.781	<0.781
Der p1(μg/g)	<0.781	<0.781	<0.781	<0.781	<0.781	<0.781	<0.781	<0.781	<0.781	<0.781	<0.781	<0.781
Der 2(μg/g)	<0.391	<0.391	<0.391	<0.391	<0.391	<0.391	<0.391	<0.391	<0.391	<0.391	<0.391	<0.391
チャタテムシ頭部(個)	30	9	36	11	22	28	16	16	27	31	27	28

表4 民家Aのダニ相およびアレルゲン量の推移

民家A	2003年					2004年						
	10月	11月	12月	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月
コナヒョウヒダニ	2	4	2	2	6	4	9	3	14	19	37	12
ヤケヒョウヒダニ	13	4	5	3	2	4	3	7	10	8	9	5
ヒョウヒダニ属未同定	3	3	2						4	3	6	1
イヌミヒゼンダニ				1	1	1	1		1	1		1
ハトフタオウモウダニ			1									
ケナガコナダニ	4	2	2	1	1					3	3	1
アシフトコナダニ			1									
ヒゲダニ科											2	
コナダニ亜目未同定									1			
マヨイダニ科	2										3	1
ホコリダニ科	1	1		1	1		1		7		1	
ハダニ科							1					
ヒメハダニ科			1							2		
イエササラダニ												1
カザリヒワダニ												1
ササラダニ亜目未同定										1		
合計	25	14	14	8	11	9	15	10	37	37	63	21
ヒョウヒダニ数計	18	11	9	5	8	8	12	10	28	30	52	18
Der f1(μg/g)	3.13	2.06	2.55	3.56	1.62	1.35	2.16	4.07	7.86	10.4	10.7	4.54
Der p1(μg/g)	1.87	1.58	2.79	1.87	1.03	0.854	1.16	1.19	2.30	2.86	1.614	<0.781
Der 2(μg/g)	1.02	0.644	0.490	0.573	0.401	0.425	<0.391	0.520	1.13	1.51	1.39	0.801
チャタテムシ頭部(個)	1	2	4	5	3		3	2	1	1	16	6

表5 民家Bのダニ相およびアレルゲン量の推移

民家B	2003年					2004年						
	10月	11月	12月	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月
コナヒョウヒダニ	12	9	14	12	10	8	8	32	30	33	5	70
ヤケヒョウヒダニ	96	25	84	47	75	23	43	62	43	40	10	52
ヒョウヒダニ属未同定	12		7		2	1		16	12	30	8	33
ケナガコナダニ	4		1	1					3		2	
マヨイダニ科	3	1	4	3	1	3		2	2	3		3
ヤドリダニ亜目未同定												2
ホコリダニ科	6	1	3	2	4	3	4	1	10	27	10	2
ヒメハダニ科												1
イエササラダニ			2					1	4	1		2
ツブダニ科						1						
ササラダニ亜目未同定									1			
合計	133	36	115	65	92	39	55	114	105	134	35	165
ヒョウヒダニ数計	120	34	105	59	87	32	51	110	85	103	23	155
Der f1(μg/g)	4.98	6.30	3.17	4.34	<0.781	1.73	4.00	10.8	21.0	4.60	1.70	15.4
Der p1(μg/g)	8.86	9.97	8.54	6.82	3.47	4.92	6.34	7.55	9.31	3.97	1.03	7.59
Der 2(μg/g)	9.03	6.97	6.60	2.39	2.01	1.81	2.33	9.79	11.2	2.83	1.33	10.9
チャタテムシ頭部(個)	4	1	5	3	2	2	2		2	5	1	12

表6 民家Cのダニ相およびアレルゲン量の推移

民家C	2003年			2004年								
	10月	11月	12月	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月
コナヒョウヒダニ	26	7	4	7	1	6	19	21	25	24	36	36
ヤケヒョウヒダニ										1	1	
ヒョウヒダニ属未同定	2	1	1		1			4	4	7	4	4
ケナガコナダニ												3
イエマルニクダニ								1			1	
イエニクダニ			1									
トゲダニ科	1											1
ヤトリダニ亜目未同定												1
ハダニ科				1								
ヒメハダニ科												1
合計	29	8	7	7	2	6	24	25	32	30	47	37
ヒョウヒダニ数計	28	8	5	7	2	6	23	25	32	29	41	37
Der f1(μg/g)	23.7	18.6	14.0	7.03	11.6	16.9	17.5	17.7	17.8	15.8	15.1	17.0
Der p1(μg/g)	<0.781	<0.781	<0.781	<0.781	<0.781	<0.781	<0.781	<0.781	<0.781	<0.781	<0.781	<0.781
Der 2(μg/g)	1.63	1.41	1.05	0.670	0.611	0.921	1.70	1.50	2.58	2.58	3.14	2.83
チャタテムシ頭部(個)	4	2	7	1		1				1		8

厚生労働科学研究費補助金（健康科学総合研究事業）
分担研究報告書

ねずみの生息実態と調査法
—ビル内における点検口上のネズミの生息痕跡と店舗内での捕獲数の関係
(2005年度年告その2)—

分担研究者 谷川 力 イカリ消毒株式会社技術研究所
研究協力者 池尻幸雄 イカリ消毒株式会社技術研究所
研究協力者 春成常仁 イカリ消毒株式会社技術研究所
研究協力者 謝 林 イカリ消毒株式会社技術開発部

研究要旨 ビルのネズミ調査方法の確立にあたり、密度指数法を利用し、点検口上の糞数、配置した紙に残る足跡、配置した紙の食害跡とその点検口下のレストラン内の捕獲数との相関を調べ、点検口上のネズミの生息痕跡が新たなネズミの指標となりうるかどうかを検討した。

その結果、点検口上の糞数、調査紙上の足跡、調査紙の食害とその下のレストラン内での粘着トラップによる捕獲数に正の相関が認められ、生息密度を判断する一つの手段となりうる事が明らかとなった。すなわち、点検口上の生息痕跡から、ネズミの生息密度を測る指標として利用でき、客観的数値が出しやすい糞数が最も利用しやすく、それに足跡と食害を加えると精度が高くなると考えられた。

A.研究目的

ビルのネズミ調査方法の確立にあたり、ネズミの種類や活動範囲、生息数の推定、糞や足跡など証跡を調査し、防除作業の資料とすることは重要である（日本ペストコントロール協会,2003）。この中で生息数を把握するための方法には、区画法、標識再捕獲法（記号放逐法）、除去法（連続単位捕獲法）、密度指数法の方法が知られている（藤戸,1960；田中,1967；真喜屋,1990）。しかしながら、個体数の推定方法を把握するための、区画法、標識再捕獲法、除去法はビルのクマネズミ *Rattus rattus* では難しく（田中,1967；田中,1992；谷川,1994；谷川・内田 2000；谷川ら未発表）、簡易な密度指数法を確立することが重要である。

ビル等ではゴキブリ、蚊・コバエ類のような昆虫類と異なり、ネズミは元々生息密度が低い。また、その評価方法についても、例えば「建築物における IPM 仕様書 ネズ

ミ・害虫等の調査と防除基準（日本ペストコントロール協会、2003）」でもネズミは防除基準として「ネズミが目撃されないか、被害のないレベルを維持する」と曖昧な表現をせざるを得なくなっている。

そこで今回、密度指数法を利用し、点検口上の糞数、配置した紙に残る足跡、配置した紙の食害跡とその点検口下のレストラン内の捕獲数との相関を調べ、点検口上のネズミの生息痕跡が新たなネズミの指標となりうるかどうかを検討した。

B.研究方法

調査場所は、東京都内の大型ビル飲食店の5店舗を2005年5月26日から9月28日まで、計5回、大阪市内大型地下街飲食店の8店舗を2005年4月20日から8月17日まで、計5回それぞれ毎月、飲食店の閉店後の夜間に調査した。調査方法は各月ごとに調査前に店舗内の点検口の上を清掃

し、毎回新しい A4 版の紙（調査紙とする）を置いた。その後毎月糞数を数え、また調査紙上の足跡、調査紙の食害跡を記録した。それぞれの調査のため、糞はそのまま点検口上の新しい糞数を計測し、足跡と食害については指数化した（表 1）。この中で足跡については、四肢それぞれを一つとして計測した。さらに足跡については紙の色を白色と黒色で比較検討した。また、紙の食害を調査項目に入れた理由は、今回の調査時にネズミによる紙の食害が多く、それらについて指数化した。指数の数値階級については、対数的に段階分けし、最上位の 5 についてはそれ以上が読み取りにくい 50% 以上を基準とした。この条件で調査時に、粘着トラップでの捕獲を夜間配置し、翌日回収し捕獲数を記録した。

調査期間内に得られた数値については、それぞれ平均化し相関関係を各店舗ごとに求めた。

表 1 調査紙上の生息痕跡と指数

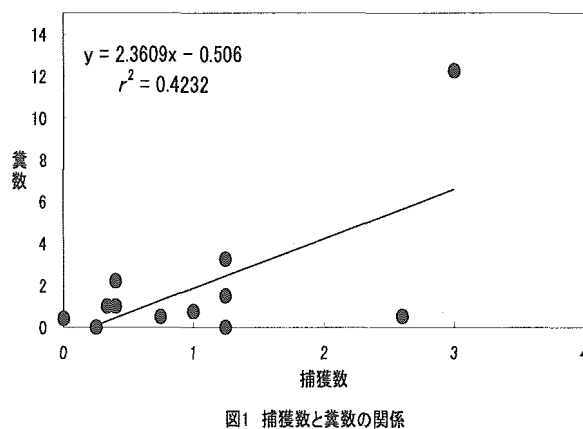
指数	足跡	食害
5	面積の 51% 以上面積の 51% 以上が食に足跡	害
4	面積の 26~50% に足跡	5ヶ所の食害 または面積 11~50% の食害
3	16~30 個の足跡 または面積の 11% に足跡	3、4ヶ所の食害 または面積 10% の食害
2	5~15 個の足跡 または面積の 3% に足跡	2ヶ所の食害 または面積 5% の食害
1	4 個以下の足跡	1ヶ所の食害
0	なし	なし

C. 研究結果

1. 糞数と捕獲数

毎回調査した 13 店舗の点検口数を合計した 49 ヲ所の点検口中、糞の認められた点検口数は 25 ヲ所で約半数の点検口に糞が認められた。この中で最も糞の糞数は多いところで 30 個、少ないところでは 0 で、平均 2.0 個が確認された。一方、その下のレストランでのネズミ捕獲数は最大 6、最小では捕獲されず、平均では 1.1 個体の捕獲結果が得られた。

これらの結果を基に調査期間内に得られた数値を店舗ごとにそれぞれ平均化し、縦軸に平均糞数、横軸に平均捕獲数とした図 1 を作成した（図 1）。この結果、平均糞数と平均捕獲数の関係は中程度の相関が認められた ($r^2=0.42$)。



2. 調査紙上の足跡と捕獲数

紙の色については、ネズミの四肢に天井裏の埃が付着し、それが新しい紙上に残る。白色と黒色の紙では埃の色にもよるが、今回の結果からは黒色が見やすかった。

毎回調査した 13 店舗の点検口数を合計した 41 ヲ所の点検口中、足跡の認められた点検口数は 30 ヲ所に足跡が認められた。この中で最も足跡の多いところで紙面積の 51%（指数 5）に足跡が認められ、少ないところでは 0（指数 0）で、平均指数では 1.8 であった。なお、糞数と足跡調査の点

検口数の違いは、調査紙が紛失し、その理由がネズミによるものか、ヒトによるものか不明確であったためである。

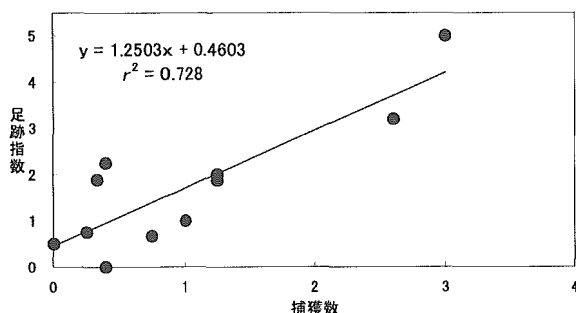


図2 捕獲数と足跡指数の関係

これらの結果を基に調査期間内に得られた数値を店舗ごとにそれぞれ平均化し、縦軸に平均足跡指数、横軸に平均捕獲数とした図2を作成した(図2)。この結果、平均足跡数と平均捕獲数の関係は正の高い相関が認められた($r^2=0.73$)。

3. 調査紙の食害と捕獲数

調査紙には明らかなネズミの食害跡が認められ、これらはネズミによる可能性が高かった。毎回調査した13店舗の点検口数を合計した41カ所の点検口中、食害が認められた点検口数は18カ所に食害が認められた。この中で最も食害量の多いところで紙面積の51%以上(指数5)、少ないところでは0(指数0)で、平均指数では1.0であった。

これらの結果を基に調査期間内に得られ

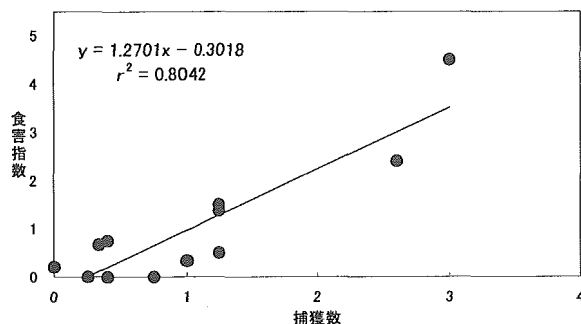


図3 捕獲数と食害指数の関係

た数値を店舗ごとにそれぞれ平均化し、縦軸に平均食害指数、横軸に平均捕獲数とした図3を作成した(図3)。この結果、食害量と捕獲数の関係は正の高い相関が認められた($r^2=0.80$)。

D. 考察

哺乳類の生息密度推定には、糞粒を利用した方法が比較的大型のノウサギ類やシカなどで知られている(矢竹ら,2002;池田・岩本,2004)。しかしながら、小型のネズミ類では糞、足跡や食害での生息密度の推定の報告はない。

ネズミの種類や活動範囲、生息数の推定、糞や足跡など証跡を調査し、防除作業の資料とすることは重要であると考え(日本ペストコントロール協会,2003)。しかしながら、一般に生息数推定を算出にはいくつかの方法が知られているが、この方法の中で区画法は対象全域を多数の区画に分け、その中のいくつかを調べて全数を知る方法であり、標識再捕獲法は捕獲した個体を標識して放し、再捕獲した標識個体の割合から全数を知る方法である。双方とも実際の建築物等の現場では難しく、特にビルなど建築物内でのクマネズミ *Rattus rattus* の全数捕獲や再捕獲は難しいと考える(田中,1967;田中,1992;谷川,1994;奥富ら,1999;谷川・内田,2000;谷川ら,未発表)。さらに除去法は、一定の捕獲率で捕獲除去し続け、捕獲数の減少の程度からもとの個体数を知る方法(Zippin,1956)で、最も建築物内で実施しやすい(真喜屋,1990;谷川ら,未発表)が、労力(人数)・時間(粘着トラップの連続した配置と回収)や経費がかかる。

一方、密度指数法は、捕獲が難しい場合などに、推定生息数に代わる指数を調べる方法で数値的な推測推定数は出せない(真喜屋,1990;谷川ら,2005)。現在、ビル内に生息するネズミの密度は、捕獲数のみが指

標として利用されている。しかし、捕獲数だけでは、生息密度の低いビルで捕獲数が無く「生息なし」と評価されても、実際には物音がする、食害がある、糞等の生息痕跡がある、ネズミを見かけるなど、ネズミの生息についての苦情を言われるケースも多く認められる(谷川ら,2005)。

点検口は様々なビルの天井裏の設備点検に利用されている開口部で、清掃されることが少なく、点検口の面積は比較的一定である。しかも天井裏は高所を移動するクマネズミの移動経路となることが多い。したがって、点検口上の一定の面積を利用すると客観的判断が下しやすく、様々な建築物での比較検討もしやすいと考えられる。今回の結果から、点検口上の糞数、調査紙上の足跡、調査紙の食害とその下のレストラン内の粘着トラップによる捕獲数に正の相関が認められ、生息密度を判断する一つの手段となりうるということが明らかとなった。すなわち、点検口上の調査紙上の生息痕跡から、ネズミの生息密度を測る指標として利用でき、客観的数値が出しやすい糞数が最も利用しやすく、それに調査紙の足跡数と食害を加えると精度が高くなると考えられた。

特に糞数は点検口という一定の面積上に落下したものを計測しやすく、調査者による差も少ない。ビル内は野外と異なり点検口上の糞は清掃されにくく、分解もされない。さらに、点検口がなくても、調査法さえ一定であれば点検口が無くても、例えば給排気用ダクト上でも比較検討しやすい。しかしながら、図1~3で示すy軸上の糞数や指数が1以上でありながら捕獲されていない場合、またそれと逆にx軸上の捕獲数が1以上でありながら糞数や指数が0である場合など今後もこの関係を調べ検討する必要はあろう。さらに、今回の値は店舗ごとに平均化されており、数値の精度を上げるためにも多くの店舗での追加データや調

査区域内でのサンプル面積、調査期間、捕獲トラップ数を統一させる必要がある。

今後、売り場面積を調査点検口との割合を一定にして精度を上げてさらに糞数とネズミ生息数の関係を調べ、落下糞数などの生息痕跡から推定生息数や推定捕獲数が算出できることも可能ではないかと考える。また、そのためには各個体の一日に排泄される糞数など基礎的な情報があると精度が上がると考えられる(矢竹ら,2002;池田・岩本,2004)。一方、黒澤ら(1998)の報告によるセンサーを利用する方法も利用し、粘着トラップによる捕獲作業が無くても、ネズミの生息の有無、密度が把握できると考えられる。なお、表1に表現した指数は0から5までの6段階であるが、これを例えば10段階等の詳細に分類すると高い相関係数を得ることは可能だが、現場で使用するには実用的ではないと考えている。

クマネズミが調査紙上を通過することに対する警戒心は、足跡が紙上で引き返したような形跡や躊躇した形跡がないことから、忌避している様子は無いものと思われた。また、紙の色については、今回の結果からは黒色が見やすかったが、埃の種類や埃以外の油等の汚れた足跡も考えられることから、今後も検討する必要があると思われた。

E. 結論

ビルの点検口上の糞数、調査紙上の足跡、調査紙の食害とその下のレストラン内の粘着トラップによる捕獲数に正の相関が認められ、生息密度を判断する一つの手段となりうるということが明らかとなった。

(引用文献)

- 藤戸貞男(1960)家鼠個体群ダイナミックスの研究.京都府医大誌.67:555-577.
池田浩一,岩本俊孝(2004)糞粒法を利用したシカ個体数推定の現状と問題点.哺乳類科学,44:81-86.

黒澤秀行,谷川 力,謝 林,叶 玉喜,石坂悟,日佐和夫,中村寛志,岡本秀俊(1998)センサーを用いたクマネズミの生息数推定に関する室内試験.環動昆,9:140-147.

真喜屋 清(1990)ネズミは家の中に何匹いたらいけないか?.ネズミ情報 41:33-45.

日本ペストコントロール協会(2003)建築物における IPM 仕様書.pp40.

奥富 渉,谷川 力,川上 泰,内田明彦,村田義彦(1999)横浜市内のビルで捕獲されたクマネズミの齢構成の季節的変動.ペストロジー学会誌,14:17-20.

田中生男(1992)ネズミとその駆除. p p 120.

田中 亮(1967)ネズミの生態.古今書院.pp169.

谷川 力(1994)ビルにおけるクマネズミの個体数と齢構成の季節的変動.衛生動物,45:293-295.

谷川 力,内田明彦(2000)都市ビルでの粘着トラップによるクマネズミの捕獲数と齢構成の変化.ペストロジー学会誌,15:1-4.

谷川 力,池尻幸雄,春成常仁(2005)ビル内における点検口内のネズミ生息痕跡と店舗内での捕獲数の関係.第 21 回ペストロジー学会大会講演要旨,57.

矢竹一穂,梨本 真,島野光司,松本吏弓,白木彩子 (2002)ノウサギの生息密度推定法の現状と課題. 哺乳類科学,42:23-34.

Zippin,C(1956)An evaluation of the removal method of estimating animal populations. *Biometrics*,12:163-189.

F.健康危惧情報

なし

G.研究発表

学会発表

谷川 力,池尻幸雄,春成常仁(2005)ビル内における点検口内のネズミ生息痕跡と店舗内での捕獲数の関係.第 21 回ペストロジー学会大会講演要旨,57.

H.知的財産の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（健康科学総合研究事業）
分担研究報告書

ねずみの生息実態と調査法
—建築物におけるねずみの無毒餌による駆除率の算出（2005年度年告）—

分担研究者 谷川 力 イカリ消毒株式会社技術研究所

研究要旨 ビルに生息するネズミの生息の有無の確認および駆除率の算出を無毒餌によって実施した。その結果、無毒餌での生息の確認は容易であった。また、事前無毒餌と事後無毒餌の間に粘着トラップだけの駆除を実施したが、駆除率は低く算出され、粘着トラップだけの駆除は難しいことが明らかとなった。

A.研究目的

ビルのネズミの無毒餌による調査方法の確立

ネズミの防除では、無毒餌による生息の有無の確認は防除範囲を集中させるため、また毒餌使用時には餌ならしとしても重要である。さらに、事前調査時にその無毒餌を用いて、その後のネズミ駆除作業実施の後に、事後調査時に再度無毒餌を用い、事前と事後の無毒餌の消失量から駆除率を算出する方法がある。しかし、これらの方法は時間と労力がかかり、あまり実施されることがない。今回、事前と事後の無毒餌の間の駆除に、粘着トラップのみでの駆除を実施し、その効果判定を試みた。

B.研究方法

無毒餌には小麦粉を用いた。小麦粉を用いた理由は殺鼠剤にもよく利用され、クマネズミの嗜好性が高く、計測時に餌皿からこぼれにくく、安価である。また種子のように殻が分散することがないためである。

事前調査時では、この小麦粉をビルの各点検口内に一つの点検口あたり 500～800 g ほど容器に入れて1ヶ月間配置した。また、事後調査でも同様に配置し、事前と事後の摂食量の差から下式によって駆除率を算出した。

$$\text{駆除率 (\%)} = \left(1 - \frac{T}{C}\right) \times 100$$

T：駆除後の無毒餌の摂食量、C：駆除前の

無毒餌の摂食量

以上の方法にて粘着トラップのみの駆除を実施した。

C.研究結果

具体的な実施例（Aビルにおける結果）

3-1. 実施場所：都市ビル（駅に隣接したAビルの全域）

3-2. 施行日時：2005年8月～11月

3-3. 配置無毒(小麦粉)量：事前 117,666 g(8月)、事後 112,225 g(11月)点検口約300カ所に1ヶ月間配置した。

3-4. 粘着トラップ：2000枚を9月、10月に毎週配置した。

3-5. 捕獲結果：全てクマネズミ *Rattus rattus* であった。

3-6. 無毒餌摂食量

結果は表1のように合計された。なお、階層別のデータも存在するが、階層が分かると当ビルが分かる恐れがあるため、総合計のみの報告とする。なお、上述した生息の有無の調査ではネズミの生息は飲食店、食品売り場、ゴミ集積場等に集中し、衣料等物販フロアにはほとんど摂食が認められなかった。

3-7. 粘着トラップによる捕獲数

捕獲結果は表2のように合計された。なお、場所のデータも存在するが、階層と場所が分かると当ビルが分かる恐れがあるため、総合

計の捕獲数の報告とする。

<表 1>配置した無毒餌の量 (g)

	配置時の 合計量：A	回収時の 合計量：B	摂食量： A-B
事前調査時 の摂食量	117,666 g	101,412 g	16,254 g
事後調査時 の摂食量	112,225 g	100,193 g	12,032 g

<表 2>粘着トラップでの捕獲数(匹)

	高層階	低層階	ゴミ 集積場	合計
9月の 捕獲数	79	33	36	148
10月の捕 獲数	113	20	16	149

D. 考察

結果の表 1 より駆除率を算出したところ、駆除率は 26.0%と算出された。次に表 2 より 9月に 148 匹、10月に 149 匹のクマネズミを集中的に毎週捕獲し、合計 297 匹を捕獲したにもかかわらず、駆除率が低く算出された。この低い駆除率は、2ヶ月間という短期間に集中した捕獲によってもネズミが減数せず、その数が復元している可能性が高いと考えられる(谷川,1994;奥富ら,1999)。しかしながら、今回の短期集中捕獲は 26%のネズミの減数がデータとして示せたことは資料として価値ある結果と考えている。

以上の結果から、ビルにおけるネズミの 2ヶ月におよぶ集中した捕獲によって、駆除率 26%が得られ、おおよそこのビルに生息する 26%のクマネズミが減少したと算出された。

一方、無毒餌による生息の有無の確認では、詳細に生息の有無を確認できることが確認され、その結果、ネズミの生息は飲食店、食品売り場、ゴミ集積場等に集中しており、衣料等物販フロアにはほとんど摂食が認められないことが明らかとなった。しかしながら、例えばある飲食店舗の点検口では、事前と事後で摂食の多い無毒餌ポイントが移動していることも認められた。したがって、無毒餌に

よる生息の有無の確認は防除範囲を集中させるためにも、また毒餌使用時には餌ならしとしても無毒餌による生息調査は重要であると考えられる。

E. 結論

ビルにおけるネズミの 2ヶ月におよぶ集中した捕獲によって、駆除率 26%が得られた。したがって、おおよそこのビルに生息する 26%のクマネズミが減少したと考えられる。この結果は、事前と事後の無毒餌の摂食量の減少率によって算出された。また、無毒餌を使用した生息の有無の確認は、防除範囲を集中させるためにも重要である。

(引用文献)

奥富 渉,谷川 力,川上 泰,内田明彦,村田義彦(1999):横浜市内のビルで捕獲されたクマネズミの年齢構成の季節的変動.ペストロジ学会誌,14:17-20.

谷川 力(1994):ビルにおけるクマネズミの個体数と年齢構成の季節的変動.衛生動物,45:293-295.

F. 健康危惧情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（健康科学総合研究事業）
分担研究報告書

蚊・ゴキブリ類に関する殺虫剤抵抗性分子診断法の確立

分担研究者：富田 隆史（国立感染症研究所）

協力研究者：小原 秩美（国立感染症研究所）

駒形 修（国立感染症研究所）

葛西 真治（国立感染症研究所）

津田 良夫（国立感染症研究所）

研究要旨 アカイエカ種群蚊の殺虫剤作用点に認められている殺虫剤抵抗性に関連するアミノ酸置換座位の遺伝子型決定，ならびに国内に分布する3つの蚊亜種についての分子分類を同時に行うことができる分子判別方法を確立した。標的とした抵抗性に関連する置換は，ナトリウムチャンネル(SC)のL999FまたはLeu999Ser，Val1001Gly，アセチルコリンエステラーゼ2(AChE2)のGly119Ser，亜種分類の標的とした塩基配列はアセチルコリンエステラーゼ1(AChE1)のイントロン2である。予め亜種の判別と標的座位の配列が明らかである個体を用い，これらの座位の遺伝子型をSNaPshot法に基づき推定し，本法により正しく遺伝子型判別がなされていることを確認した。次いで，本法を野外で捕獲した蚊の遺伝子型決定に適用した。SCの抵抗性型変異としては，チカイエカからはPhe999のみが，アカイエカからはSer999のみが検出され，ネッタイエカからはアカイエカと同じSer999置換が検出された。国内では調べられることのなかったAChE2の抵抗性型変異については，今回の調査では検出されなかった。分子分類の結果は個眼数や翅脈に基づく形態分類と概ね一致したが，石垣島で採集された1個体が，これまでに沖縄地方で生息が確認されていなかったチカイエカ型と判定された。

A. 研究目的

殺虫剤の有効性は殺虫試験により評価するのが通例であり，殺虫剤処理薬量に依存した生死で示される殺虫剤感受性を評価するには殺虫試験に代わるものはないといえる。殺虫試験を行うためには，予め，新たに野外で採取した個体群を室内で継代飼育し，発育ステージの揃った多数の虫を用意する必要がある。蚊種によっては，室内飼育環境に順化して生殖・発育が行えるようになるには多くの世代数を要するものがある。その過程で，野外で採集した個体群に当初含まれていた遺伝的多様性が，実際のどの程度まで供試虫の世代に残されているか不明であるという欠点もある。こういった観点から，殺虫試験によるバイオアッセイ法は，数

多くの野外コロニーを同時に標的として感受性を調査するには，難のある方法といえる。殺虫試験にかかるコストと元来の遺伝的構成に関する情報の劣化という問題を解決するための手段として，殺虫剤抵抗性遺伝子の遺伝子型決定がある。

チカイエカとアカイエカは，無吸血産卵性や越冬性の有無，発生源において違いがあり，吸血嗜好性，行動の光周期依存性，亜種間の交雑性についても未解明な点が多い。害虫の化学的防除上もっとも重要な観点は，チカイエカとアカイエカの交雑性にあるといえる。旧ビル管理法では定期的に建築物内の害虫を駆除するように定められていたが，その結果，地下の水溜まりにおいておもに生息し，害虫駆除業者などにより永きにわたり防除の標的となっていた

チカイエカでは、殺虫剤散布による選択圧がアカイエカに比べ大きく働いていたと考えられる。ウエストナイル熱のような蚊媒介性疾病がわが国に流行する際は、主たる媒介蚊であるアカイエカ種群蚊が化学的防除の標的となる。チカイエカ集団内で出現した抵抗性遺伝子が亜種交雑によりアカイエカ集団に移入すると、より集団のサイズが大きいアカイエカの防除を瞬く間に困難にしてしまう恐れがある。こうした問題に因應べく、従来は無吸血産卵性や微小な形態学的特徴に基づき分別されてきた両亜種について、分子分類に基づきより簡便な分別を可能にする必要がある。

昨年度までの研究では、殺虫剤抵抗性の室内飼育コロニーに含まれる主要な抵抗性要因と交差抵抗性を解析し、DNAシーケンシングにより、ピレスロイド系殺虫剤とDDTの作用点であるナトリウムチャンネル(SC)に、殺虫剤感受性低下の主要因の一つとみなされる2アミノ酸座位の置換変異、Leu99Phe/SerとVal1001Gly, を検出した。また、対立遺伝子特異的PCR法(AS-PCR)により、アセチルコリンエステラーゼ1(AChE1)のイントロン2配列の変異を判別の標的にすると、日本産アカイエカ種群に含まれる3つの亜種が分子分類可能であることを明らかにした。今年度の研究では、プライマー伸長法の原理に基づくSNaPshot法を適用し、殺虫剤作用点遺伝子上で殺虫剤感受性に係わる一塩基多型(SNP)部位の遺伝子型と日本産の3亜種について同時に分子判別する方法を確立し、その方法を用いて、亜種ごとに野外集団における抵抗性遺伝子の頻度分布を調査することを目的とした。有機りん系とカーバメイト系殺虫剤の作用点であるアセチルコリンエステラーゼ2(AChE2)に生じた感受性低下変異 Gly119Serは、国内では未発見であるが、この座位も遺伝子型決定の標的に加えた。

B. 研究方法

昆虫：アカイエカ(*Culex pipiens pallens*), チカイエカ(*Cx. p. molestus*), ネットアイエ

カ(*Cx. quinquefasciatus*)の室内系統またはコロニーを用いて行った。それらの名称と殺虫剤感受性については研究結果の項に後述する。蚊は18L:6D, 25°C, 湿度60%の室内で飼育した。幼虫には昆虫用試料(オリエンタル酵母)を、成虫には2%砂糖水を与えた。アカイエカおよびネットアイエカの吸血にはマウスを用いた。

DNA抽出：全虫体を使った場合には、ペッセル(Pellette Mixer, Treff)とエッペンドルフチューブを使って一頭ごとに蚊をホモジナイズし、IsoQuick Nucleic Acid Extraction Kit(ORCA Research)を用いDNAを抽出した。抽出したDNAは共沈剤(Ethachinmate, ニッポンジーン)と共に沈殿させ、沈殿物は20 μ LのTE(10mM Tris-1mM EDTA)に溶解した。ウイルス分離や個眼数の測定など用途から虫体全体を利用できなかった場合には、より抽出効率の高いREDEExtract-N-Amp Tissue PCR Kitを用い、1頭分の脚6本からDNAを抽出した。抽出方法はそれぞれのキットのプロトコールに従った。

Multiplex PCR：AChE1遺伝子、AChE2遺伝子、および、SC遺伝子を増幅するために使ったプライマー配列を表1に、それらを同時に用いたMultiplex PCR反応液の組成を表2に示す。DNAポリメラーゼはExTaq(タカラバイオ)を用いた。増幅反応はサーマルサイクラー(MyCycler, 日本バイオ・ラッドラボラトリーズ)を用いた。サイクリング条件は次の通りである。94°C 2 min > [94°C 30 sec > 60°C 1 min > 68°C 1 min] X5 > [94°C 30 sec > 60°C 30 sec > 68°C 1 min] X30 > 72°C 5 minのサイクルで反応させた。反応後、反応液中のプライマーとdNTPを分解するために、ExoSAP-IT(アマシャムバイオサイエンス)で反応液を処理した。操作手順は、プロトコールに従い、PCR産物 5 μ LにExoSAP-IT 2 μ Lを加え、37°Cで15分間反応後、80°C 15minで酵素を失活させた。

プライマー伸長反応：ABI PRISM SNaPshot Multiplex Kit(アプライドバイオシステムズ)を用いて行った。操作方法はキットのプロトコールに従った。使用したプライマー配列は表3に、

反応液の組成は表4に示す。ラベリング反応はサーマルサイクラー (PC707, アステック) を用い、96°C 45 sec > [96°C 10 sec > 50°C 5 sec > 60°C 30 sec] X25のサイクルで行った。反応後、未反応の蛍光標識ddNTPをshrimp alkaline phosphatase (SAP) (アマシャムバイオサイエンス) により脱リン酸化した。操作はプロトコールに従い、SNaPshotの反応液にSAP 1 μ L (1 unit)を添加し、37°Cで1時間反応させた後、75°Cで15分間、SAPを不活化した。次に、0.5 μ LのSNaPshot産物に9 μ LのHi-Di formamideと0.5 μ LのGeneScan-120 LIZ size standard (アプライドバイオシステムズ) を添加した後、サーマルサイクラーを用いて、95°Cで5分間させ、解析まで4°Cに保持した。

塩基置換多型解析：伸長プライマーの分離と蛍光検出はABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (アプライドバイオシステム) を用いたキャピラリー電気泳動により行った。36 cmキャピラリーとPOP-7ポリマーを分離に使用した。結果はGeneMapperソフトウェアv3.0 (アプライドバイオシステムズ) を用いて解析した。

C. 研究結果

SNaPshot法の確立：室内で長期間継代飼育し、亜種の判別と殺虫剤感受性レベルについて既知である、アカイエカ、チカイエカ、ネッタイエカの4系統を用いて、抵抗性遺伝子型判別の標的部位についてはダイレクトシーケンシングにより、また、分子分類の標的部位についてはPCR産物のクローニングにより、塩基配列を決定した (表5)。これらの系統には、総合すると、抵抗性遺伝子型判別の標的としたSCのLeu999Phe置換およびSerへの置換、Val1001Gly置換が感受性型のアミノ酸と共に含まれていることを確かめた。また、チカイエカとアカイエカのそれぞれには分子分類の標的としたAChE1 intron 2の亜種特異的配列が含まれているが、ネッタイエカにはそのいずれにも適合する配列がないことを確かめた。これらの系統の蚊を個別に使い、3つの遺伝子断

片 (AChE1, AChE2, SC) を同時に一つの反応液中で増幅するMultiplex PCRを行い、3つの遺伝子断片の増幅産物量が適正なレベルになるように反応温度サイクリングと各プライマー濃度の条件を決定した (表1と2)。その一例として、Shibuya-efp系統の蚊を用いたPCR産物の電気泳動像を図1に示す。SC遺伝子はLeu999とV1001座位に相当する塩基座位の間にサイズ長の変異に富むイントロン配列が含まれているため、増幅されたSC遺伝子断片のサイズは用いた個体により異なったが、AChE1とAChE2の遺伝子増幅断片のサイズは一樣であった (表示なし)。これらの系統の蚊を使って得たMultiplex PCR産物をそのまま鋳型に用いて、あるいは擬似的に標的座位のヘテロ接合体に匹敵するように混合して鋳型に用いて、SNaPshot解析の際に各標的座位における変異を表すシグナル強度が適正となるように、プライマー伸長反応における各プライマーの濃度比を決定した (表3と4)。用いた系統に含まれていないAChE2のGly119Ser置換変異については、Ser119を含むAChE2遺伝子断片をPCRにより人工的に合成し、その他の標的遺伝子断片と混合してプライマー伸長反応の鋳型として用い、この変異を対象としてもSNaPshot解析が適切に行えることを確認した (表示なし)。予め既知の遺伝子配列を元にして設計したプライマーは、これら4つの室内系統の蚊に関してはいずれも標的遺伝子配列に特異的に相補対を形成し、適切なPCRとプライマー伸長反応が行えることを確認した。

分子分類の標的としたAChE1遺伝子intron 2は、アミノ酸をコードしておらず、自然選択の制約を受けにくいいため、未知の塩基配列多型が亜種内に存在する可能性が一般的に考えられる。分子分類用に設計したプライマー伸長用プライマー (表3) のそれぞれが、鋳型とする遺伝子配列に亜種特異的に相補対を形成することをさらに確かめるために、次の予備実験を行った。2003年と2004年に本州と九州で捕獲し室内でコロニー化した、無吸血産卵性を示しチカ

イエカと判定された12のコロニー、および非無吸血産卵性を示すアカイエカと判定された7つのコロニー、それぞれ、合わせて50個体と27個体を使いMultiplex PCR産物に基づくSNaPshot解析を行った。AChE1遺伝子を標的にした分子分類の結果は、無吸血産卵性を示す大阪市中央区での採集に由来するコロニーの1個体を除き、無吸血産卵性の有無による生理学的亜種分類の結果と一致した。この例外的な1つの個体はチカイエカとアカイエカの雑種と判定された。昨年度は、今回用いたプライマー伸長用プライマーの配列 (Acepall2SSとAcepip2SS2; 表3) からテール部を除いたものと配列が一致する亜種特異的プライマーを用い、今回と同じ個体より抽出したDNA溶液を鋳型に用いてAS-PCR法による解析を行っていた。昨年度と今回の分子分類の結果は完全に一致した (2004年度報告書参照)。殺虫剤抵抗性遺伝子の検出に関しては、SCのLeu999座位に、チカイエカからPhe999 (TTT) の変異のみが、またアカイエカからはSer999 (TCA) の変異のみが検出され、ネッタイエカJpal-per B系統にのみ検出されていたVal11001Gly置換 (表5) とAChE2遺伝子は検出されなかった。また、海外で有機リン系とカーバメイト系殺虫剤に対する感受性低下要因として知られているAChE2のGly119Ser置換は検出されなかった。Etofenproxに対して強い抵抗性 (幼虫が5.7 ppmで生存する) を示したアカイエカとチカイエカの中で、SCのLeu999座位が感受性型であるLeuであった個体が、東京都目黒区由来のアカイエカと判定されたコロニーの中に存在した。このような個体では、作用点の感受性低下によらず、解毒機構の増強などによってピレスロイド抵抗性を表しているものと考えられる。以上の予備実験の結果に基づき、SNaPshot法による分子診断は概ね的確に行われたとみなされる。

野外採集蚊の分子診断：個眼の数による形態分類が予め行われた試料は、春日部市、東京都新宿区戸山、同区落合で捕獲した雌成虫である (表7)。分子分類と形態分類の結果をこれら

の試料と比較すると、分類の結果が一致しない個体が存在した。1つの個体は形態分類でチカイエカと判定されていたが形態分類でアカイエカと判定され、別の1個体はその逆に判定された。前者は、これまでの試験でピレスロイド抵抗性アカイエカからほとんど見出されていたSC遺伝子のSer999をホモ接合で有する個体であった。この抵抗性遺伝子型判別の結果は、分子分類の結果に沿うものとなっている。新宿区落合ではチカイエカが多く捕獲され、分子分類によりチカイエカと判定された40個体に関するピレスロイド低感受性SC遺伝子 (すべてPhe999) の頻度は36%であった。新宿区戸山と春日部ではアカイエカが多く捕獲され、SCの感受性低下型変異を保有する個体の割合は低かった。新宿区戸山で捕獲された蚊のうち、分子分類と形態分類で一致してアカイエカと判別されたがSCのLeu999座位がLeu/Pheのヘテロ接合体であった個体が1つ存在した。これまでの調査でアカイエカがPhe999変異を保有した例はないことから、分子分類とSC遺伝子型決定の標的部位の配列について、残されたDNA抽出液に基づき通常塩基配列決定法によって判定の確度を再検討する必要がある。

翅脈による形態分類が予め行われた試料は、石垣市で捕獲した雌成虫である (表7)。形態分類により試験した11個体がすべてネッタイエカと判定されたが、分子分類のうち、分類の結果が一致しない個体が存在した。1つの個体は形態分類でチカイエカと判定されていたが分子分類でチカイエカと判定された個体が1つ存在した。沖縄地方にはチカイエカは生息しないとこれまで考えられていたことから、この個体についても、他の手法によるさらなる確認が必要である。1頭のネッタイエカはSC遺伝子のLeu999座位にSerをヘテロ接合で保有していた。ネッタイエカにSer999変異が見いだされたのは初めての知見となる。室内コロニーと野外採集蚊を用いた抵抗性遺伝子型決定を通じ、SC遺伝子のLeu999座位には、コドンとしてTTA (Leu), TTT (Phe), TTC (Ser) のみが見いださ