

吸血した蚊の血液から吸血後経過時間の推定を目的とした ヒト DNA 型判定の試み

名古屋大学大学院医学系研究科（研究科長 門松 健治）法医・生命倫理学研究室の廣重 優二（ひろしげ ゆうじ）研究生、山本 敏充（やまもと としみち）准教授、石井 晃（いしい あきら）教授の研究グループは、埼玉医大、岐阜大学、大阪医科大学及び大日本除蟲菊株式会社中央研究所との共同により、吸血した蚊からの DNA 分析による個人識別及び吸血後の経過時間推定がどの程度可能かについて明らかにしました。

犯罪現場、特に、夏場の屋内の犯罪現場で、しばしば見つけられる吸血した蚊、特に生きた蚊の血液には、犯人や犯罪に関係した人の血液が含まれている可能性が非常に高いといえます。研究グループは、これらの吸血した蚊から DNA を抽出し、犯人や犯罪に関係した人を特定することが可能か、また、個人識別が可能な経過時間がどの程度か、さらに、ヒト由来の DNA 定量値などから吸血した後の経過時間を推定することが可能かを調べることを目的とし、日本で頻繁に観察されるヒトスジシマカ及びアカイエカを用いて実験を行いました。

その結果、個人識別をするための STR 型判定は吸血後 2 日経過まで可能であること、また、得られた定量値、定量値比、型判定数、ピーク高比から総合的に判断して、吸血後、半日単位で経過時間推定が可能であることが示唆されました。本研究では、大日本除蟲菊株式会社中央研究所から専用飼育箱で飼育され感染歴のない蚊の提供を受けることにより、被験者の安全を確保して実験を行うことが可能となりました。また、吸血後の時間経過を比較的コントロールしやすい、系統的な実験方法を新たに考案しました。

今後は、例数を増やすことにより、また、血液消化が比較的緩やかに進むことで比較的 low molecular weight の DNA の定量方法を使用することにより、さらに精度の高い吸血後経過時間推定が可能になると期待されます。本研究で得られた結果は、犯罪現場では「蚊にも刺されてはいけない」といった DNA 鑑定への畏怖感を感じさせるという点で、犯罪抑止における社会貢献度は、非常に高いと考えられます。

本研究結果は、米国科学誌である PLOS ONE（米国東部時間 2017 年 6 月 15 日付けの電子版）に掲載されました。

吸血した蚊の血液から吸血後経過時間の推定を目的とした ヒト DNA 型判定の試み

ポイント

- 現在、個人識別のために世界で汎用されている STR 型判定用キットを使用
- 蚊の血液消化に伴う DNA の分解の程度を利用
- 被験者に侵襲が少なく、吸血後の経過時間をコントロールできる系統的な実験手法
- 半日単位というおおよその経過時間であるが、吸血後経過時間推定が可能

1. 背景

吸血蚊からヒト由来の DNA 型を判定できるかについては、国内では自身に蚊を吸血させて型判定を行った事例的研究が発表されており、国際的にも、蚊から DNA 型判定をした症例報告の学会発表が行われていますが、系統的な研究は未だみられていませんでした。その最大の原因は、感染歴のない蚊に統一的に吸血させる手法がなかったためです。そのような状況下で、本研究においては、殺虫剤などの開発のため比較的無菌的な蚊を飼育している大日本除虫菊（株）中央研究所との共同により、系統的に実験を行うことが可能となりました。

一方、血液による個人特定については、多色の蛍光標識プライマーを用いた多座位の STR (short tandem repeat) を同時増幅し、一度に型判定するマルチプレックス法が数種キット化され、個人識別に汎用されています。また、低分子化した DNA 試料にも対応できるキットも市販されています。それらのキットを使用することにより、対照となる試料やデータがあれば、一卵性双生児を除き、ほぼ 100% の確率で個人を特定することが可能になってきています。また、そのようなマルチプレックス法では、鋳型 DNA の低分子化の程度により、型判定される座位数が異なるため、型判定される座位数からある程度、経時変化を推察することが可能です。

さらに近年、増幅産物の大きさの異なる 2、3 種類のマーカーに対し一度に定量的 PCR を行い、各マーカーの定量値の比から、抽出 DNA の質（低分子化の程度）を数量化して調べる方法が利用されるようになってきました。

そこで、本研究では、これらの学術的背景を元に、吸血後の蚊の内部での人血の消化状態によるヒト DNA の低分子化状態の違いを利用して、吸血後経過時間のある程度の推定を行うと同時に、個人識別の可能性について検討しました。

このような経過時間の推定や個人識別が手法的に確立されれば、犯罪現場での犯人や犯罪に関係した人の特定、犯行時間の推定の一つの材料としての重要性が高まり、犯罪抑止という点でも社会的な貢献度は非常に高いと考えられます。

2. 研究成果

(1) 吸血蚊の採取及び顕微鏡的検査

被検者計 7 名について、卵から専用飼育箱にて飼育された蚊（アカイエカ：*Culex pipiens pallens* 及びヒトスジシマカ：*Aedes albopictus*）を一匹ずつ、透明な直径約 7 cm、高さ約 4 cm の円形プラスチックカップに入れ、開放部を薄手のパンティストッキングで覆い、パンスト部分を各被験者の腕に当て、蚊がパンストを通して十分吸血した段階で、腕からそのカップを離しました。そのままパンスト部を、パットに置かれたショ糖溶液で湿らせたガーゼ片にかぶせ、設定された経過時間（0、

1、2、3、4、6、8、12、18、24、36、48、72時間)後に、そのカップをジエチルエーテルで飽和したビニール袋内に入れ殺虫しました。

その後、直ちに実体顕微鏡写真を撮影し、後述のDNA抽出キットのATL緩衝液の入った1.5 mLチューブに入れ、各チューブをドライアイスボックスに入れ凍結し、DNA抽出まで、マイナス30°Cに保存しました。

各経過時間における殺虫直後の実体顕微鏡像の代表例は図1のとおりです。

2種の蚊とも、時間経過と共に腹部の吸われた血液が次第になくなり、腹部の先端から徐々に卵巣(白い部分)が成熟していきました。72時間経過では、ほぼ全て血液が消化され、腹部が卵巣に占められていることがわかります。

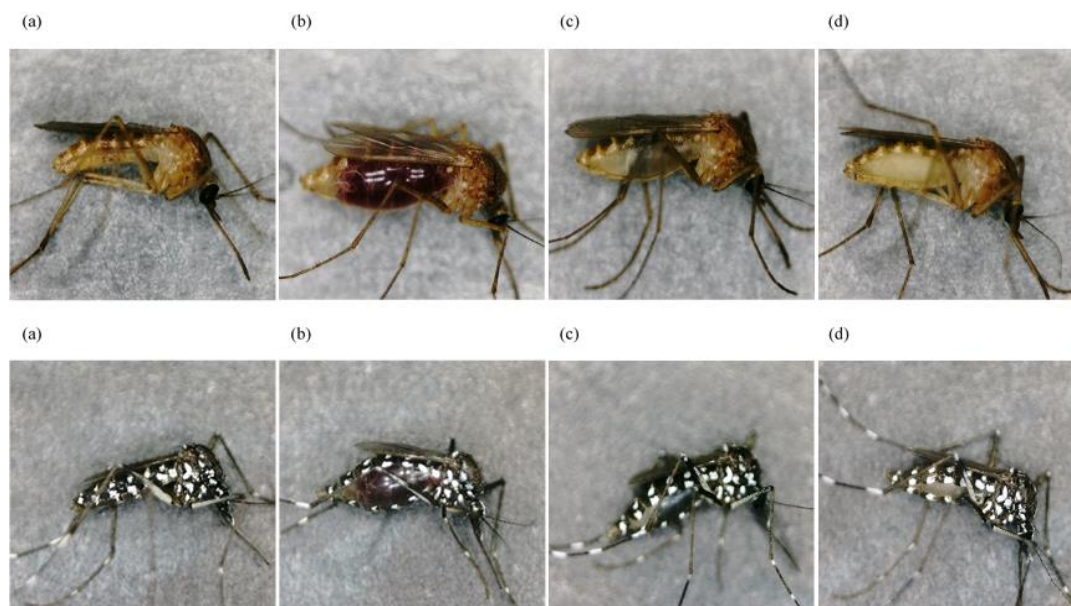


図1. 各吸血後経過時間の実体顕微鏡像例

上段がアカイエカ、下段がヒトスジシマカ(倍率約20倍)

(a)無吸血、(b)0時間(吸血終了直後)、(c)吸血後24時間経過、(d)吸血後72時間経過

(2) DNA定量

各吸血蚊をQIAamp DNA Microキットに付属のATL緩衝液内で、ピペットのチップの先でよく破壊した後、キットのプロトコールに従ってDNA抽出を行いました。溶出液は20 μL のlow TE緩衝液で、2回行いました。

吸血後の各経過時間における各増幅産物の濃度(Q41、Q129及びQ305)($\text{pg}/\mu\text{L}$)の平均の対数値は図2のとおりです。アカイエカでは、吸血直後のQ41、Q129及びQ305は、それぞれ3.24(1,750 $\text{pg}/\mu\text{L}$)、3.14(1,370 $\text{pg}/\mu\text{L}$)及び3.09(1,230 $\text{pg}/\mu\text{L}$)と次第に減少し、72時間後には、検出されませんでした。また、それぞれの二次回帰曲線が図2のように得られ、その決定係数(R^2)は、0.92、0.93及び0.89でした。一方、ヒトスジシマカでは、吸血直後のQ41、Q129及びQ305は、それぞれ3.03(1,070 $\text{pg}/\mu\text{L}$)、3.05(1,110 $\text{pg}/\mu\text{L}$)及び3.03(1,070 $\text{pg}/\mu\text{L}$)で、アカイエカと同様に次第に減少し72時間後には、検出されませんでした。また、それぞれの二次回帰曲線が図2のように得られ、その決定係数(R^2)は、いずれも0.97と高く、強い相関が見られました。

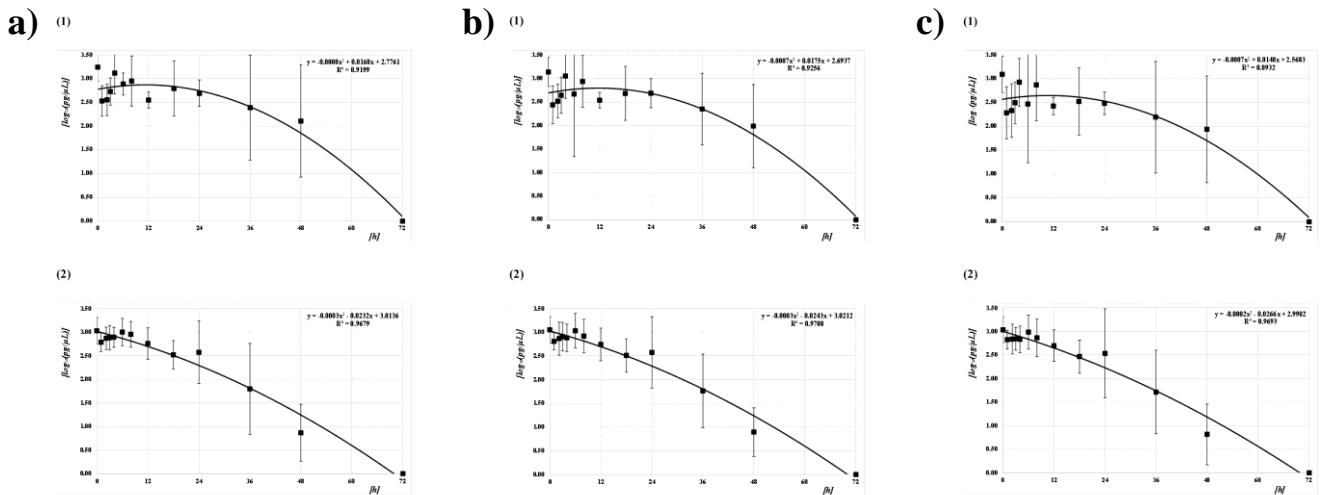


図2. 吸血後の各経過時間における各増幅産物 (a:41 bp、b:129 bp、c:305 bp) の定量値 (pg/μL) の平均の対数値。上段がアカイエカ、下段がヒトスジシマカ

これらの定量値から、図3のように各定量値比 (Q129/Q41、Q305/Q41、Q305/Q129) が算出され、二次回帰曲線が得られました。アカイエカでは、定量値比 Q129/Q41 は、48 時間まで約 1.0 とほぼ一定であったのに対し、定量値比 Q305/Q41 及び Q305/Q129 は約 0.7 でした。一方、ヒトスジシマカでは、アカイエカと同様 48 時間まで約 1.0 とほぼ一定であったのに対し、定量値比 Q305/Q41 及び Q305/Q129 は 36 時間経過において 1.0 から 0.7 及び 1.0 から 0.8 にそれぞれ次第に減少しました。各定量値比は 48 時間経過後には、いずれも約 0.4 となりました。各定量値比 (Q129/Q41、Q305/Q41 及び Q305/Q129) で得られた二次回帰曲線の決定係数 (R^2) は、アカイエカで、0.88、0.69 及び 0.77、ヒトスジシマカで 0.84、0.92 及び 0.96 となり、ヒトスジシマカで強い相関が見られました。吸血直後から 6 時間経過まで、アカイエカでは変動が大きく、ヒトスジシマカでは、比較的安定した定量値が得られました。

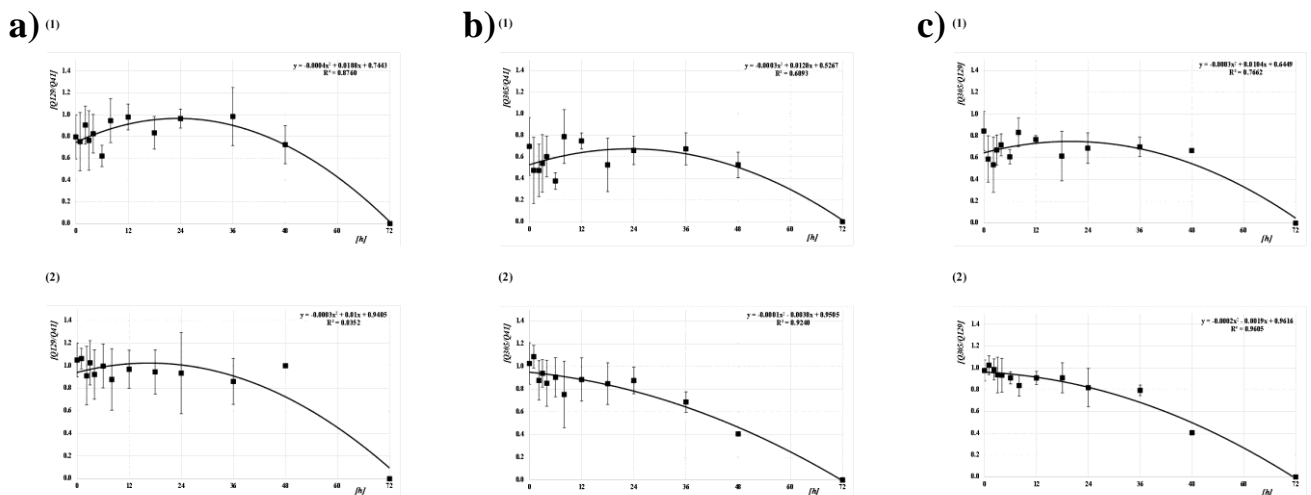


図3. 吸血後の各経過時間における各増幅産物の定量値比 (a:Q129/Q41、b:Q305/Q41、c:Q305/Q129) の平均の対数値。上段がアカイエカ、下段がヒトスジシマカ

(3) STR 型判定

現在、日本の犯罪捜査で主に用いられている AmpF Φ STR[®] Identifiler[®] Plus PCR Amplification

Kit (ライフテクノロジーズ社) を用い、各 DNA 抽出液 1 μL を鋳型として、プロトコールに従って、PCR を増幅し、Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer でキャピラリー電気泳動後、GeneMapper ID ソフトウェアにより自動的に型判定を行いました。閾値には、50 RFU (蛍光強度) を用いました。

各吸血後の経過時間で、平均して図 4 (a) のようにアレル数が検出され、シグモイド回帰曲線が得られました。また、それぞれの平均ピーク高の対数値 (図 4 (b)) 及び、X ピークを 1 とした各ピークの高の平均相対ピーク高が算出され、それぞれについて二次回帰曲線が得られました。一般的に、ヒトスジシマカで特に平均ピーク高で強い相関が得られました。

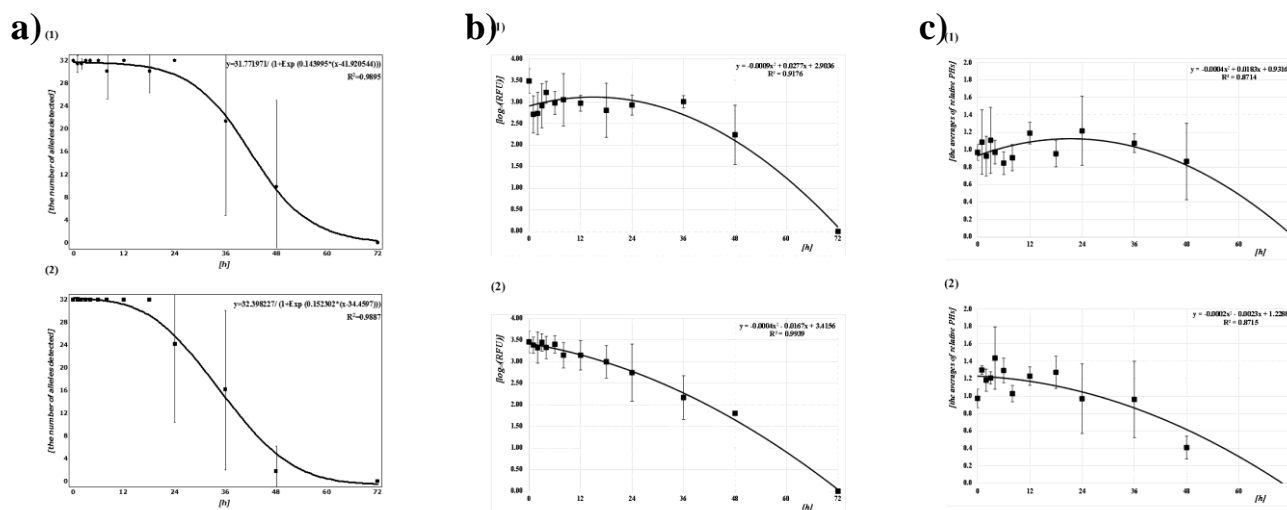


図 4. 吸血後の各経過時間における STR 型の平均アレル検出数 (a)、平均ピーク高 (b) の対数値、平均相対ピーク高 (c). 上段がアカイエカ、下段がヒトスジシマカ

(4) まとめ

以上の結果から、個人識別をするための STR 型判定は吸血後 2 日経過まで可能であること、また、得られた定量値、定量値比、型判定数、ピーク高比から総合的に判断して、吸血後、半日単位で経過時間推定が可能であることが示唆されました。

3. 今後の展開

現在、蚊が男女一人ずつから吸血した場合を考え、Y 染色体上の STR 型についても同様の実験を重ねています。今後は、例数を増やして精度を上げると共に、あまり低分子化が進んでいない状態における DNA の分解の程度 (クオリティ) がわかる定量方法を考案し、数時間単位で吸血後の時間経過が推定できる方法の確立に努めたいと考えています。

4. 用語説明

STR 型 : short tandem repeat 型

短鎖反復配列型といい、2 ~ 数塩基 (例えば、AGCT) が一つの反復単位となり、個人により異なる反復数を型として、個人識別を行う。日本では、15 個 (座位) の STR 型マーカーを同時に増幅・型判定する市販のキットを用いて、型判定がなされ、指紋のデータベースと同様に、犯罪者用のデータベースが構築されている。

増幅産物：PCR (Polymerase Chain Reaction) によって、DNA のある特定領域を増幅したものの本実験では、定量的 PCR 法により、同じ DNA のある部分を、異なる長さ (41 塩基、129 塩基、305 塩基) を PCR 増幅してできたもの。より低分子化した DNA では、長さの短いものがより多く増幅しやすいことを利用して、抽出 DNA の低分子化の程度を推定しようとするもの。

アレル数：両親から一つずつ受け継ぐ型の数

通常、1つの DNA マーカー (座位) で両親から同じアレルを受け継いだ場合をホモ接合体 (例えば、STR 型 14-14 型) と呼び、アレル数は1つであり、異なるアレルを受け継いだ場合をヘテロ接合体 (例えば、STR 型 12-13 型) と呼び、アレル数は2つである。本実験では、ホモ接合体の場合も同じアレルが2つあると考えた。その場合アレル数は2となり、本キットには16座位のマーカーが含まれるため、ホモ・ヘテロ接合体に関わらず、全てのマーカーで型判定された場合は、検出されたアレル数は32となる。

シグモイド回帰曲線：S字型に回帰した曲線

通常、ある地点で極端に増加したり、減少したりする変化を示す曲線で、本実験では、ある時点で極端にアレル数が検出されなかったため、この曲線に回帰されている。

5. 発表雑誌

Yuuji Hiroshige¹, Masaaki Hara², Atsushi Nagai³, Tomoyuki Hikitsuchi⁴,
Mitsuo Umeda⁴, Yumi Kawajiri⁴, Koji Nakayama⁴, Koichi Suzuki⁵, Aya Takada²,
Akira Ishii¹, Toshimichi Yamamoto¹

¹ Department of Legal Medicine and Bioethics, Graduate School of Medicine, Nagoya University

² Department of Forensic Medicine, Saitama Medical University

³ Department of Legal Medicine, Graduate School of Medicine, Gifu University

⁴ Research & Development Laboratory, Dainihon Jochugiku Co., Ltd.,

⁵ Department of Legal Medicine, Osaka Medical College

" A Human Genotyping Trial to Estimate the Post-Feeding Time from Mosquito Blood Meals."
PLOS ONE (米国東部時間 2017年6月 15 日付けの電子版に掲載)

DOI: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0179319>

English ver.

https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_E/research/pdf/PLOSONE_20170616en.pdf