

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460885

研究課題名(和文) ヒトを吸血した蚊からの吸血後の経過時間推定及び個人識別

研究課題名(英文) Estimates of elapsed time and personal identification from human blood sucked by mosquitoes

研究代表者

原 正昭 (HARA, Masaaki)

埼玉医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50129160

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：犯罪現場で時々みられる吸血蚊から、個人特定が可能かどうか、また、吸血後の経過時間を推定可能かどうかを目的として行った。

2種類の蚊を、被検者計7名に吸血させ、一定時間経過後、殺虫した蚊からDNA抽出し、各抽出DNAを、3種類の増幅長の異なる増幅産物で定量を行った。また、15座位のSTR及びアメロゲニンの型判定を行った。その結果、型判定は吸血後2日経過まで可能で、ピーク高比などから総合的に半日単位の経過時間推定が可能であることが示唆された。17座位のY-STRの型判定結果も同様であった。

今後、改良すれば、より精度の高い吸血後経過時間推定が可能であると考えられた。成果の一部は、英文誌に受理された。

研究成果の概要(英文)：In warm and hot seasons, fed mosquitoes are often observed at crime scenes. This study attempted to estimate the time that elapsed since feeding from the degree of human DNA digestion in mosquito blood meals and also to identify the individual human sources of the DNA using genotyping in two species of mosquito: *Culex pipiens pallens* and *Aedes albopictus*.

The extracted DNA were quantified using a human DNA quantification and QC kit and were genotyped for 15 STRs and 17 Y-STRs using a commercial multiplexing kits. It took about 3 days for the complete digestion of a blood meal, and genotyping was possible until 2 days post-feeding. The relative peak heights of the 15 STRs and DNA concentrations were useful for estimating the post-feeding time to approximately half a day between 0 and 2 days.

We suggest that this study may be very useful for estimating the time since a mosquito fed from blood meal DNA, although further refinements are necessary to estimate the times more accurately.

研究分野：法医学

キーワード：蚊 STR Y-STR 個人識別 吸血経過時間推定 DNA定量

1. 研究開始当初の背景

現在、法医・鑑識科学分野で個人識別を行う方法、いわゆる「DNA(型)鑑定」法は、常染色体のSTR(short tandem repeat)やY染色体上のSTR(Y-STR)などをマーカーとして、クオリティ・コントロールされた市販のキットを用い、非常に正確な手法により、非常に高い確率で個人を特定することが可能になった。そのような手法は、対照とするDNA試料が存在する場合のみ、高い確率で特定可能である。現在の状況下で、この分野での研究は、対照が無くても個人を特定できるような手法を開発する研究、例えば、個人の形態学的特徴、毛髪、皮膚あるいは虹彩の色などを解析する、所謂FDP(forensic DNA phenotyping)に関する研究、あるいは、生物地理学的祖先を推定できるような手法の考案・開発などに移行してきている。そのようなゲノミクス的研究の他にも、プロテオミクスあるいはエピジェネテクスの手法を利用して、血痕の陳旧度や斑痕からの年齢推定などの研究も行われている。

十年ほど前、蚊からヒト由来のDNA型を判定できるかどうかを自分自身に蚊を吸血させて型判定を行ったような事例的研究発表があったが、系統的な研究は未だない。研究代表者らも、学部学生と研究をしたことがある。その際、系統の実験ができなかったため、学生と公園に行き、自分の腕にやぶ蚊を止まらせ、血を吸ったのを見計らって、ピンセットで、つまみ採取後、その吸血した蚊からDNAを抽出し、ドットハイブリダイズ法によるDQA1型判定した。当時のDNA型判定は、まだ、手法が一定でなく、精度もやや欠けるものだった。その数年後、国際法医遺伝学会で、蚊からDNA型判定をした症例報告があった。症例報告研究にとどまっている最大の原因は、統一かつ可能な限り均一に蚊に吸血させる手法がないことである。

そのような時、あるテレビ番組中、大日本除虫菊(株)中央研究所で殺虫剤などの開発のため、無菌的な蚊を飼育していることを知った。一方、現在、日本の警察の研究所では、市販の80塩基程度の増幅産物によるヒトDNA定量法ではなく、独自の200塩基程度の増幅産物を用いる手法を利用してヒトDNAを定量している。この2つの手法により、DNAの低分子化状態で異なる定量値が得られることを利用すれば、つまり吸血後の蚊内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すれば、吸血後の経過時間がある程度推定できる。これらのことから、「吸血後の時間経過に伴うヒト由来DNA定量値の変化」と合わせて「蚊からのヒトDNA型判定」に関する研究を、系統的に行う可能性が高くなった。さらに、同社中央研究所に研究の相談をしたところ、共同で研究を行うという約束を得た。

そのような背景及び犯罪現場での犯人や犯罪に関係した人の特定をしたり、犯行時間の

推定の一つの材料としての重要性を考慮し、本研究の考えに至った。

2. 研究の目的

犯罪現場、特に、夏場の屋内の犯罪現場で、吸血した蚊の死骸や吸血した生きた蚊を見つけることがままある。これらの吸血した蚊、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。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の特定することが可能かどうか、また、どのくらい経過するまで、個人識別が可能かどうか、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どうかを、日本でよく見かける数種(ヒトスジシマカ、アカイエカなど)の蚊を用いて調べることが目的として行った。

3. 研究の方法

(1) 倫理委員会の承認及び共同研究契約

本研究に関し、主たる研究機関である埼玉医科大学倫理委員会の承認を得た(申請番号765)。その後、岐阜大学医学部倫理委員会、名古屋大学医学部倫理委員会、大阪医科大学倫理委員会で承認を得た。

また、大日本除虫菊(株)中央研究所と、埼玉医科大学、名古屋大学及び大阪医科大学との間で、共同研究契約を締結した。

(2) 研究試料

大阪医科大学助教田村明敬(期間内に中途退職)がポスターで公募するとともに、知り合いの同大学関係者(教職員・法医学の単位の既得学生など)にも知らせ、応募者及び研究の被験者賛同者に研究内容を説明し、今までの自身の経験の中で、蚊に吸血された際、過敏な反応やアレルギー反応が生じなかったことを質問票などで確認した後、さらに、パワー・ハラメントあるいはアカデミック・ハラメントにならないよう、被験者の任意性を十分考慮して、最終的に被験者7名を選抜した。人工飼育された蚊(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7cm、高さ約4cm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った。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、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た。

その後、直ちに実体顕微鏡写真を撮影し、1.5mLチューブに入れ、各採取チューブをドライアイスボックスに入れ凍結する方法で、被験者数、予備実験2名、本実験5名の計7名で行った。

(3) DNA 抽出及び定量

DNA 抽出には、QIAamp DNA Micro Kit (QIAGEN) を用いた。抽出操作は基本的にはプロトコールに沿って行ったが、溶出操作においてデットボリュームが最大 5 μL 生じること、さらに高濃度の EDTA は PCR を阻害することから、溶出は、QIAamp DNA Investigator Kit (QIAGEN) に付属の ATE バッファー (low TE buffer) で 2 回行い、計 40 μL の溶出液を作成した。なお、蚊の体表は堅い外骨格で覆われており、本抽出キットの抽出操作の際に溶解しないため、ATL 溶液内で蚊の腹部の内容物が溶出するよう、チップの先端で十分破碎した。

DNA 定量には、リアルタイム PCR 法 (インターカレーター法) を原理とした KAPA Human Genomic DNA Quantification and QC Kit (NIPPON Genetics) (以下 KAPA kit) を用い、測定には StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems (life technologies) を用いた。従来のマニュアルによると、Ct 値の算出方法には「crossing point 法 (Baseline Threshold 法)」が用いられているが、life technologies 社のクラウドシステムを用いてより測定誤差の少ない「2nd Derivative Maximum 法 (relative threshold cycle 法または CRT 法)」で Ct 値を求めた。本キットは、同一部位の長さが異なる 41 bp、129 bp、305 bp をそれぞれ定量することで DNA の定量および DNA の品質 (DNA の分解の程度) を推定することを可能にしたキットである。分解していない DNA を定量した場合には各定量値比が 1 に近い値をとり、分解した DNA を定量した場合には各定量値比が 1 より低い値をとるので、本キットを用いて、それぞれの長さにおける定量値 (Q41、Q129、Q305) を求め、それぞれの定量値の比 (Q129/Q41、Q305/Q41、Q305/Q129) を算出した。

(4) STR 型及び Y-STR 型判定

各溶出液 1 μL について、AmpF Φ STR® Identifiler® Plus PCR Amplification Kit 及び Yfiler PCR Amplification Kit (life technologies) (以下 IDPlus kit 及び Yf kit) を用いて、プロトコールに従い 28 サイクルで PCR 増幅を行った。得られた PCR 増幅産物について、Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer (life technologies) および GeneMapper ID software v.3.2.1 (life technologies) を用いて解析し、型検出を行い、被検者の口腔内細胞からの STR 型及び Y-STR 型と比較した。なお、型判定における最小ピーク高は 150 RFU とした。

4. 研究成果

(1) 顕微鏡的検査

アカイエカ及びヒトスジシマカ腹部の膨らみを顕微鏡写真から観察したところ、消化途中の血液をほとんど放血してしまい、腹部の膨らみがほとんどなくなっている試料が、吸血後半日までの、特に、アカイエカが観察さ

れた。顕微鏡写真撮影直前には、肉眼的に明らかに血液が残存していたにもかかわらず、撮影後に、ほとんどなくなっていたので、殺虫時の急激なショックによる予期しない突然の放血が疑われた。

蚊は一般的に吸血後消化途中の血液を一部もしくは全部排泄 (放血) することが知られており、今回の実験においても一部の試料で飼育に用いたガーゼ片に排泄物が付着しており、吸血後経過時間が長いほど排泄物の量は多く観察された。

(2) DNA 定量

明らかに放血した形跡がないアカイエカおよびヒトスジシマカの定量値 (Q41、Q129、Q305) の各時系列における平均値を求め、その対数値をプロットした。その代表例として Q41 の定量値の時系列変化を図 1 に示す。

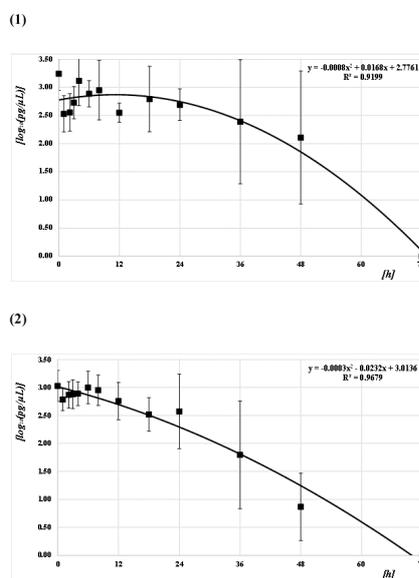


図 1 . 定量値 (Q41) の対数値の変化
(1) アカイエカ、(2) ヒトスジシマカ

アカイエカにおいて、どのサイズの定量値も吸血直後には約 1500 ng/ μL であったものが、時間経過とともに次第に減少し、72 時間経過するとほぼ検出されなくなった。また、サイズ間による増幅量の違いは、いずれの経過時間においても現れ、増幅サイズが大きいほど少ない傾向を示した。一方、ヒトスジシマカにおいても、どのサイズの定量値も吸血直後には、約 1000 ng/ μL あったものが、時間経過とともに次第に減少し、72 時間経過するとほぼ検出されなくなった。

各時系列におけるアカイエカおよびヒトスジシマカの Q129/Q41、Q305/Q41、Q305/Q129 の平均値をその対数値をプロットした。その代表例として Q129/Q41 の定量値比の時系列変化を図 2 に示す。アカイエカにおいて、ほぼ 1 日半まで Q129/Q41 は約 1、半日から 2 日まで Q305/Q129 はほぼ 0.7 となった。その後 2 日経過で Q129/Q41 は約 0.7、Q305/Q129 は約 0.5 となり、3 日目でいずれも 0 になった。

一方ヒトスジシマカにおいては、ほぼ2日までQ129/Q41は約1.0、1日半までQ305/Q129およびQ305/Q41はほぼ1.0から0.7であった。その後2日経過でQ129/Q41およびQ305/Q129は約0.4となり、3日目でいずれも0になった。

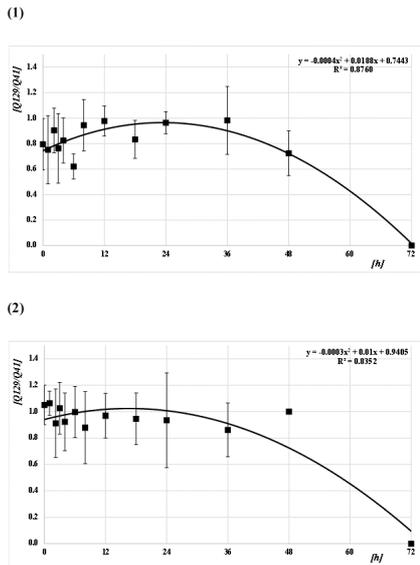


図2．定量値比 (Q129/Q41) の対数値の変化 (1)アカイエカ、(2)ヒトスジシマカ

以上の結果から、アカイエカでは、Q41 および Q129 が約 500 ng/μL 以上、Q305 が約 300 ng/μL 以上であれば1日以内、いずれのサイズにおいても250 ng/μL から100 ng/μL 程度であれば吸血後1日から2日、いずれのサイズも検出できなければほぼ3日経過していると考えられる。また、Q129/Q41 がおおむね1.0から0.7の間、Q305/Q41 および Q305/Q129 がおおむね0.8から0.5の間であれば2日以内、定量値が低く定量値比が算出できなければほぼ3日経過していると考えられる。ヒトスジシマカでは、いずれのサイズにおいても約500 ng/μL 以上の定量値であれば半日以内、いずれのサイズにおいても400 ng/μL から300 ng/μL 程度であれば半日から1日、いずれのサイズにおいても50 ng/μL から10 ng/μL 程度であれば1日から2日、ほぼ検出できなければ3日程度経過していると考えられる。また、いずれのサイズ比もおおむね1.0から0.7の間であれば1日半以内、Q129/Q41 が1.0から0.9付近で、Q305/Q41 および Q305/Q129 が0.8から0.6の間であれば1日から1日半、Q129/Q41 が1.0付近で、Q305/Q129 および Q305/Q41 が0.4程度であれば2日、定量値が低く定量値比が算出できなければほぼ3日経過していると考えられる。

(3) STR 型判定結果

DNA 抽出で得られた各抽出液 1 μL について、IDPlus Kit を用いて、28 サイクルで増幅させ、STR 型判定を行った。いずれの試料においても被検者に由来する型以外は検出されず、陰性対照については何も検出されなかつ

た。各時系列における型検出数の平均値を図3に示す。

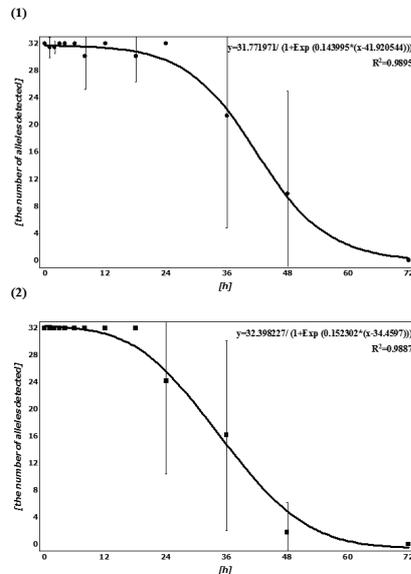


図3．STR 型検出数の変化 (1)アカイエカ、(2)ヒトスジシマカ

型検出数とは、アメロゲニンを含む全16ローカスにおいて検出された被検者由来のピーク数をカウントしたもので、ホモ接合体の場合は2とカウントした。アカイエカにおいて、24時間経過まではほぼ全ての型が検出され、24時間から48時間では部分的に検出され、72時間ではいずれの型も検出されなかった。一方ヒトスジシマカにおいて、12時間経過まではほぼ全ての型が検出され、12時間から36時間では部分的に検出され、72時間ではいずれの型も検出されなかった。それぞれの蚊について、吸血直後(0 hr)の各試料のアメロゲニンのX型の平均ピーク高を1000とし、各試料における各座位の相対ピーク高を算出し、各時系列において平均値を求めた(図4)。

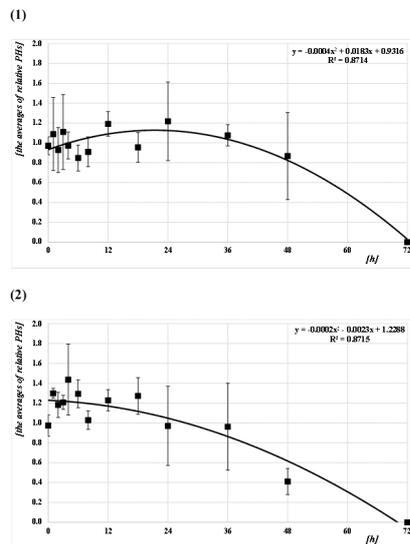


図4．相対ピーク高の変化 (1)アカイエカ、(2)ヒトスジシマカ

アカイエカにおいて、平均相対ピーク高は、吸血直後には約 1000 あるが時間経過とともに次第に減少し、72 時間経過するとほぼ 0 となった。一方ヒトスジシマカにおいて、平均相対ピーク高は吸血直後には約 1000 あったものが、時間経過とともに次第に減少し、48 時間経過するとわずかに数値として計算できる程度となった。

以上の結果から、アカイエカにおいて、平均相対ピーク高が 1000 程度であれば吸血直後、おおよそ 900 から 250 の間であれば 1 日以内、200 程度であれば 1 日から 1 日半、50 程度であれば 1 日半から 2 日、0 であればほぼ 3 日間経過していると考えられる。また、型検出数がおおむね 32 (全ての型が検出) であれば 1 日以内、半数以上部分的に検出されれば 1 日から 1 日半、半数以下部分的に検出されれば 1 日半から 2 日、型が検出できなければほぼ 3 日経過していると考えられる。一方ヒトスジシマカにおいて、平均相対ピーク高が 1000 程度であれば吸血直後、おおよそ 900 から 600 の間であれば半日以内、400 から 300 程度であれば半日から 1 日経過、100 前後であれば 1 日から 1 日半経過、わずかに数値が計算できればほぼ 2 日間経過、0 であれば 3 日経過していると考えられる。また型検出数については、おおむね全ての型が検出されれば半日以内、半数以上部分的に検出されれば半日から 1 日経過、半数以下部分的に検出されれば 1 日から 1 日半経過、型が検出できなければほぼ 2 日経過していると考えられる。

(4) Y-STR 型判定結果

Y-STR 型判定については、各ローカスのピーク高は吸血後 12 時間まではほぼ同じ高さで推移し、17 座位すべてにおいて型判定は可能であった。しかしながら、いずれの蛍光色においても吸血後 24 時間を経過すると型判定できないローカスが現れ、48 時間経過では多くのローカスで型検出が不可能となった。Y-STR 型判定数を時間ごとに平均化してプロットし、各プロットを非線形回帰したグラフを図 2 に示す。ヒトスジシマカでは吸血後 24 時間まで、アカイエカでは吸血後 12 時間までは、ほぼすべての試料において 17 ローカスすべての型判定が可能であったが、どちらの蚊も 48 時間を過ぎると型検出数が大幅に減少し、72 時間で全く検出されなくなった。したがって、Y-STR 型に関していずれの型も検出されない場合は、少なくとも吸血後 72 時間は経過していると推測される。ただし、法医実務において Y-STR 型や STR 型が検出されない場合、蚊が吸血した血液がヒト由来でない可能性もあるので、DNA 分析により人血か否かの鑑別をする必要があると考えられる。また、アカイエカの平均型判定数が、ヒトスジシマカに比べ、きれいに回帰されなかった原因としては、吸血後 12 時間程度までの間で観察された蚊の放血行動がヒトスジシマカよりアカイエカの方に多かったため、アカイエカの DNA 抽出量にばらつきが生じた

ためと考えられる。

さらに、Y-STR 型の平均ピーク高を対数によりプロットし、線形回帰したところ (データ未提示) 放血の少なかったヒトスジシマカにおいて、時間経過とともにピーク高の安定した減少が見られた。したがって、さらに例数を増やし、型判定数の結果と合わせることで、より精度の高い経過時間推定が可能であると考えられた。

吸血した蚊からの Y-STR 型分析は、吸血後のある程度の経過時間推定を可能にするとともに、特に同一の蚊が男性と女性から吸血したと考えられる事例において、男性を特定するために非常に有用であると考えられる。

(5) まとめ

時流にあわせた本法のような DNA 型検査を主な個人識別の手法として、被験者に安全で、吸血後の経過時間を比較的コントロールしやすい系統的な実験方法を用いた、本研究で得られた結果をまとめると、型判定は吸血後 2 日経過まで可能で、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半日単位の経過時間推定が可能であることが示唆された。しかしながら、ヒトスジシマカでは、ある程度、被検者間の差のない安定した結果が得られたが、アカイエカでは、吸血後、半日程度までの気がつかない間に、吸血をほぼ全て放血してしまうような現象が見られ、実際の生態系でもこのような現象が起こるのかの、何らかの検討が必要であると考えられた。今後は、例数を増やすことにより、さらに精度の高い吸血後経過時間推定が可能であると考えられた。

これらの結果の大部分は、英文誌に受理された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

Yuuji Hiroshige, Masaaki Hara, Atsushi Nagai, Tomoyuki Hikitsuchi, Mitsuou Umeda, Yumi Kawajiri, Koji Nakayama, Koichi Suzuki, Aya Takada, Akira Ishii, Toshimichi Yamamoto, A Human Genotyping Trial to Estimate the Post-Feeding Time from Mosquito Blood Meals, PLoS One, 2017, 査読有 *in press*
永井淳, 武内康雄, 原正昭, 高田綾, 廣重優二, 小川久恵, 石井晃, 山本敏充, 引土知幸, 梅田光夫, 川尻由美, 中山幸治, 鈴木廣一, 吸血した蚊からの Y-STR 型分析による個人識別、DNA 多型、査読無、Vol. 25、2017、24-27

[学会発表](計 3 件)

Toshimichi Yamamoto (発表者), Yuuji Hiroshige, Masaaki Hara, Atsushi Nagai, Takashi Yoshimoto, Hisae Ogawa, Koichi

Suzuki, Tomoyuki Hikitsuchi, Mitsuo. Umeda, Yumi Kawajiri, Koichi Nakayama, Aya Takada, Akira Ishii, A personal Identification Trial with Post-Sucking Time Estimation from Human Blood in Mosquitoes, 27th International Society of Forensic Genetics, 2017 Sept. (ソウル・韓国)

永井淳(発表者)、原正昭、廣重優二、小川久恵、引土知幸、梅田光夫、川尻由美、中山幸治、武内康雄、鈴木廣一、高田綾、石井晃、山本敏充、吸血した蚊からのY-STR型分析による個人識別、日本DNA多型学会第25回学術集会、2016年12月1日、東京大学大気海洋研究所(千葉県・柏)

廣重優二(発表者)、山本敏充、原正昭、永井淳、小川久恵、吉本高士、引土知幸、鈴木廣一、高田綾、石井晃：吸血した蚊からの時間経過推定及びSTR型分析による個人識別(第1報)、第100次日本法医学学会学術全国集会2016、6.17(東京都・品川)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等
作成予定

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原 正昭 (HARA, Masaaki)
埼玉医科大学・医学部・准教授
研究者番号：50129160

(2) 研究分担者

永井 淳 (NAGAI, Atsushi)
岐阜大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：00207961

山本 敏充 (YAMAMOTO, Toshimichi)
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：50260592

田村 明敬 (TAMURA, Akiyoshi)
大阪医科大学・医学部・助教
研究者番号：50207239
(期間内中途退職)

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

廣重 優二 (HIROSHIGE Yuuji)
小川久恵 (OGAWA Hisae)
引土知幸 (HIKITSUCHI Tomoyuki)
梅田光夫 (UMEDA Mitsuo)
川尻由美 (KAWAJIRI Yumi)
中山幸治 (NAKAYAMA Koji)
鈴木廣一 (SUZUKI Koichi)
高田綾 (TAKADA Aya)
石井晃 (ISHII Akira)