

主論文の要旨

**A human genotyping trial to estimate the post-feeding  
time from mosquito blood meals**

〔吸血蚊から吸血後の時間を推定するためのヒト遺伝子型判定の試み〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻  
社会生命科学講座 法医・生命倫理学分野

(指導：石井 晃 教授)

廣重 優二

## 【緒言】

蚊は、世界中に広く分布する昆虫で、現在 37 属約 3600 種が知られている。多くの種において、雌は吸血し、血液を消化し、卵巣を成熟させる。また、時には重篤な感染症を媒介する。日本において、蚊は広く生息している昆虫であるため、特に犯罪現場が室内の場合吸血した蚊を見つけることがある。この吸血した蚊から、血液に由来する人物の特定及び吸血後の経過時間の推定を DNA 分析により試みた。

これまでに、吸血した蚊の血液に関する研究が報告されているが、その多くはミトコンドリア DNA を用いた動物種の特定や、常染色体上の Short tandem repeat (STR)型を用いた個人の特定を目的として行ったもので、吸血後の経過時間を推定することを目的として行ったものはない。またその手法については、現在の手法と比較すると古典的であったり、マニュアルから逸脱しているものがあり、安定した反応が得られないものや、感染症の危険について考慮していないなど倫理的に問題があるもの、再現実験を行うことが難しいものもある。そこで本研究では、上記の問題を改善し、吸血後の経過時間を推定することを目的として、市販の低分子化した DNA を評価できる定量キット及び個人識別能力の高いマルチプレックスタイピングキットを用い、吸血した血液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程度の推定を行うと同時に、個人識別の可能性についても検討した。

## 【対象及び方法】

大日本除虫菊株式会社より、卵から飼育した未吸血のアカイエカとヒトスジシマカの成虫の提供を受けた。インフォームドコンセントを受けた被検者に吸血させ、吸血後一定期間飼育した。飼育 0 時間後から 72 時間後までの間の 13 時系列(0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 18, 24, 36, 48, 72 時間)で吸血蚊を殺処理し、デジタルマイクロスコープで腹部の状態を確認した。確認後、各試料から QIAamp DNA Micro kit を用いて DNA を抽出し、41bp, 129bp, 305bp のフラグメントサイズ(Q41, Q129, Q305)で DNA の分解の程度を評価できる KAPA Human Genomic DNA Quantification and QC Kit を用い、リアルタイム PCR 法により DNA 定量を行った。また、それぞれの抽出 DNA 溶液 1 $\mu$ L を、AmpF $\ell$ STR<sup>®</sup> Identifier<sup>®</sup> Plus PCR Amplification Kit を用い、プロトコールに沿って 28 サイクルの PCR 反応を行い、15 種類の STR 型判定を行った。

## 【結果】

### 実態顕微鏡検査

蚊の腹部は吸血直後には赤色を呈し、次第に血液が消化され、それに伴い白色の卵巣が発達する傾向が観察された (Fig. 1)。しかしいくつかの試料では、腹部の状態が未吸血の蚊とほぼ同様の状態のものがあり、吸血後いずれかの時点で放血したものと考えられた (Fig. 2)。この現象は、吸血後経過時間が 12 時間以内の試料で特に多く観察された。以下、明らかに放血したと推定される試料については吸血後経過時間の推定には用いなかった。

## DNA 定量

アカイエカにおいて、吸血直後の定量値は  $\log_{10}[\text{Q41}]$  で 3.24 (1750 pg/ $\mu\text{L}$ ),  $\log_{10}[\text{Q129}]$  で 3.14 (1370 pg/ $\mu\text{L}$ ),  $\log_{10}[\text{Q305}]$  で 3.09 (1230 pg/ $\mu\text{L}$ ) であった。その後ばらつきはあるものの、時間が経過すると次第に定量値は減少し、72 時間後にはいずれのサイズでも DNA は検出できなくなった (Fig. 3(1),4(1),5(1))。ヒトスジシマカにおいて、吸血直後の定量値は  $\log_{10}[\text{Q41}]$  で 3.03 (1070 pg/ $\mu\text{L}$ ),  $\log_{10}[\text{Q129}]$  で 3.05 (1100 pg/ $\mu\text{L}$ ),  $\log_{10}[\text{Q305}]$  で 3.03 (1070 pg/ $\mu\text{L}$ ) であった。その後ややばらつきはあるものの、時間が経過すると次第に定量値は減少し、72 時間後にはいずれのフラグメントサイズでも DNA は検出限界以下となった (Fig. 3(2),4(2),5(2))。

また、3 種の定量値の比(Q129/Q41, Q305/Q41, Q305/Q129)を計算し吸血後経過時間との関係を調べたところ、アカイエカでは 48 時間後まで Q129/Q41 は約 1.0, Q305/Q41 及び Q305/Q129 は約 0.7 とほぼ一定であった (Fig 6(1),7(1),8(1))。ヒトスジシマカでは Q129/Q41 については 48 時間後まで約 1.0 で一定であったが、Q305/Q41 については 36 時間後までに 1.0 から 0.7 に、Q305/Q129 については 36 時間後までに 1.0 から 0.8 にそれぞれ減少した (Fig. 6(2),7(2),8(2))。

## STR 型判定

STR 型検出数について、アカイエカでは、24 時間後まで全ての STR 型が検出できた。その後型検出数は次第に減少し、72 時間後には全ての STR 型が検出できなくなった (Fig. 9(1))。ヒトスジシマカでは、18 時間後までは全ての STR 型が検出できた。その後型検出数は次第に減少し、72 時間後には全ての STR 型が検出できなくなった (Fig. 9(2))。

平均ピーク高について、アカイエカでは、吸血直後に対数値で 3.48 (3600 RFU), その後ばらつきはあるものの次第に減少し、72 時間後には 0 RFU となった (Fig. 10(1))。ヒトスジシマカでは、吸血直後に対数値で 3.45 (3300 RFU), その後次第に減少し、72 時間後には 0 RFU となった (Fig. 10(2))。

相対平均ピーク高について、アカイエカでは、48 時間後まで約 1.0 で一定であった (Fig. 11(1))。ヒトスジシマカでは、36 時間後まで約 1.0 で一定であったが、48 時間後には 0.4 となった (Fig. 11(2))。

## 【考察】

放血について、特にアカイエカにおいて比較的初期の段階で多く観察され、ヒトスジシマカではほとんど観察されなかった。これは、ジエチルエーテルガスで殺処理を行った時に放血した可能性があると考えた。このことは、アカイエカの腹部はヒトスジシマカの腹部よりも柔らかいこと、アカイエカにおいて吸血直後(0 時間)の試料でも放血が観察されたこと、血液は消化されると次第に凝固するため 12 時間後以降では放血があまり観察されなかったことから推測された。今後、殺処理の方法を修正し、放血を防ぐ方法が必要となる。

吸血後の経過時間をより正確に推定するためには 2 つの課題を解決する必要がある。

一つ目は、放血によるデータのばらつきを抑え、より多くの試料を検査すること。二つ目は、例えばより長いフラグメントサイズやより短いフラグメントサイズを用いることで、消化に伴う DNA の分解の程度をより正確に定量できる方法を開発することである。

比較的ばらつきの少ないヒトスジシマカのデータを総合的に判断すると、12 時間間隔で吸血後の経過時間を推定できることが分かった (Table 1)。

### **【結論】**

本研究により、ヒトスジシマカにおいて、12 時間間隔で吸血後の経過時間を推定できることが分かった。アカイエカにおいては、放血現象のため安定したデータが得られなかった。放血現象を防ぎ、より多くのデータを集めること、また本実験とは異なるフラグメントサイズを用いた新たな定量法を確立することで、吸血後の経過時間をより正確に推定することが可能となると考えられる。