

平成 22 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20790463

研究課題名（和文）剖検中迅速に溺死の推定が行える血清学的予試験法の開発

研究課題名（英文）Preliminary study of the enzyme immunoassay using bacterioplankton for diagnosis of drowning

研究代表者

柿崎 英二（KAKIZAKI EIJI）

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：70284833

研究成果の概要（和文）：剖検中迅速に溺死の推定が行える血清学的検査法の開発を目的として、溺死 41 例（海水域 15 例，汽水域 8 例，淡水域 14 例，浴槽内 4 例）及び非溺死 18 例（水中 2 例，水辺 16 例）の血液を調査した。その結果，海水溺死例では *Vibrio* 属，*Photobacterium* 属，淡水溺死例では *Aeromonas* 属の細菌が，特異的かつ高頻度に検出された。そこで淡水での溺死については *Aeromonas hydrophila* を指標とした血清学的検査法を検討した。

研究成果の概要（英文）：We measured bacterioplankton in blood from cadavers retrieved from the sea ( $n = 15$ ), near estuaries ( $n = 8$ ), rivers (fresh water,  $n = 14$ ) and from bathtubs ( $n = 4$ ) as well as from non-drowned victims ( $n = 18$ ) discovered near aquatic environments. The results suggested that the presence of numerous bacterioplankton (*Vibrio* and *Photobacterium* in seawater, *Aeromonas* in freshwater) in immersed cadavers could support a conclusion of death by drowning. Therefore, we investigated about enzyme immunoassay for *Aeromonas hydrophila*.

交付決定額

（金額単位：円）

|         | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2008 年度 | 2,400,000 | 720,000 | 3,120,000 |
| 2009 年度 | 900,000   | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 総計      | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：法医学、溺死、水棲細菌、酵素免疫測定法

## 1. 研究開始当初の背景

我々は溺死例及び非溺死例の血液を試験的に調べていくなかで、海水及び河川水を吸

引し溺死した死体の血液中には、各々の水域に特徴的な水棲細菌が優勢的に存在していることを発見した。そしてそれら細菌種の構成は死後比較的長期間維持されており、死後に別の水域、例えば淡水域から海水域に流された場合でも維持されていることが示された。これは溺死の際、最初に血中に入った細菌群の中で少数の種類のみが血液中の栄養素を独占し枯渇させるため、その後他の細菌が血液内に侵入しても容易に増殖できないことが理由ではないかと考えられた。これらの結果から、血中における水棲細菌の存在は、溺死の診断に役立つのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

これまでに我々は水棲細菌を指標とした溺死の検査方法について検討してきた [Kakizaki E et al. Marine bacteria comprise a possible indicator of drowning in seawater. *Forensic Sci Int* 2008; 176: 236-247. Kakizaki E et al. Bioluminescent bacteria have potential as a marker of drowning in seawater: Two immersed cadavers retrieved near estuaries. *Legal Med* 2009; 11: 91-96. Kakizaki E et al. Freshwater bacterioplankton cultured from liver, kidney and lungs of a decomposed cadaver retrieved from a sandy seashore: possibility of drowning in a river and then floating out to sea. *Legal Med* 2010, accepted. Kakizaki E et al. In vitro study of possible microbial indicators for drowning: salinity and types of bacterioplankton proliferating in blood. *Forensic Sci Int* 2010, accepted]. そして当教室で検査した溺死例(海水・淡水)におい

て高頻度に水棲細菌が検出され、他方溺死でない事例からは水棲細菌は検出されなかった。しかしこの検査法は血液試料を選択平板培地に塗抹し培養後、得られた bacterial colony の塩基配列を決定する方法であり、培養に約1日、遺伝子解析に3-5日程度を要した。そこで、本研究では剖検中、迅速に溺死の推定が行える検査法の確立を目標に、水棲細菌を指標とした血清学的検査法を検討することとした。

## 3. 研究の方法

先ず指標とする最適な細菌種を検討するため、これまで解剖を行った溺死41例(海水域15例、汽水域8例、淡水域14例、浴槽内4例)、および非溺死18例(水中で発見された2例、水辺付近で発見された16例)について血液中の優勢種を調査した。

方法は2%, 3%, 4%のNaClを含むTodd Hewitt培地を用いてこれらの血液試料を平板培養(25°C, 24時間)し、先ず暗室で発光細菌の有無を確認した(水に棲息する細菌の中で発光する細菌は海洋細菌のみである)。次いでその平板にOxidase試薬(N, N-dimethyl-1, 4-phenylenediamine oxalate, alpha-naphthol)を噴霧しブルーコロニーの有無を確認した(水棲細菌の多くはブルーに染まるが一般にヒトの死後血中で増殖すると考えられている腸内細菌や多くのグラム陽性菌は染まらない)。発光するコロニー及びブルーに染まるコロニーは陽性菌としてカウントした。さらに優勢的に認められた細菌について、16S rRNA遺伝子(約1500 bp)を指標に種の簡易同定を行った。他方、上記の細菌検査をおこなったほぼすべての事例について、従来の壊機法によるプランクトン検査も同時に行い、溺水吸引の有無について確認した。

以上の結果から淡水での溺死の指標としては *Aeromonas hydrophila* が適していることが示唆された。そこで *Aeromonas hydrophila* を指標とした血清学的検査法の検討を行った。まず、イムノビーズないし集菌効果のある磁気ビーズを用いて溺死体の血液中の細菌を、呈色ないし吸光度計によって検出する方法を試みた。次いで、蛍光光度計を用いて高感度に検出する方法を検討した。即ち一次抗体として本菌のモノクローナル抗体をイムノビーズに固相化し、2次抗体として Peroxidase を標識した本抗体によるサンドイッチ法を行い、解剖事例 36 例（海水域での溺死 10 例、汽水域での溺死 6 例、淡水域 10 例、水中ないし水辺付近で発見された非溺死 10 例）について検査を行った。

#### 4. 研究成果

溺死 41 例（海水域 15 例、汽水域 8 例、淡水域 14 例、浴槽内 4 例）、および非溺死 18 例（水中で発見された 2 例、水辺付近で発見された 16 例）について血液中の優勢種を決定した。

その結果、海水溺死例からは陽性菌として *Vibrio* 属 (*V. parahaemolyticus*, *V. spp.*), *Photobacterium* 属 (*P. damsela*, *P. leiognathi*, *P. phosphoreum*, *P. mandapamensis*), *Shewanella* 属 (*S. algae*, *S. sp.*), *Psychrobacter* 属 (*P. phenylpyruvicus*) などの海洋細菌が検出された。

淡水溺死例からは陽性菌として *Aeromonas* 属 (*A. hydrophila*, *A. veronii*, *A. spp.*), *Shewanella* 属 (*S. sp.*) の淡水性の細菌、他方陰性菌としては *Buttiauxella gaviniae*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter ludwigii*, *Enterobacter sp.*,

*Klebsiella pneumoniae*, *Leclercia adecarboxylata*, *Proteus vulgaris*, *Lactococcus lactis*, *Acinetobacter sp.* がそれぞれ検出された。

汽水域での溺死例からは淡水性の細菌と海水性の細菌の両方の細菌が検出され、海水性の細菌としては、*Vibrio fischeri*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *Photobacterium damsela*, *Listonella anguillarum* が検出され、淡水性の細菌としては *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sp.* (陰性菌として *Citrobacter freundii*, *Vagococcus carniphilus*, *Enterobacter sp.*, *Proteus sp.*) などの細菌が検出された。これまでに汽水域で発見された水中死体は 8 例あり、死体が発見された水域に棲む細菌とは異なる水域の細菌が検出される (3 例) など、特徴的な結果が得られた。即ち、2 例から海水性の細菌のみ、3 例からは淡水性の細菌のみがそれぞれ検出された。さらに目撃証言があり、汽水域の水を吸引したことが明らかかな 1 例 (引き上げられた際に意識はあったが、救急隊到着時には心肺停止、その約 1 時間後に死亡確認) では、淡水性と海水性の両方の細菌 (*Vibrio*, *Aeromonas*) が検出された。水棲細菌が検出された上記 8 例については珪藻検査でも同様の水域での水の吸引が示唆され、特に淡水性の細菌が検出された 3 例は河川の淡水域で溺死し、発見場所の河口周辺に流れついたものと推定された。他方、細菌が検出されなかった残り 2 例については、肺のみに珪藻を認めた。汽水域でのこれらの結果から各水域に特徴的な *Vibrio* 属、*Photobacterium* 属、*Aeromonas* 属などの細菌は溺水吸引の指標として有望であり、死後単に水中に置かれた状況だけでは容易に体内に侵入しない、即ち容易にコンタミしないことが示唆された。

他方、浴槽内での溺死例からは *Enterobacter hormaechei*, *Escherichia coli*, *Leclecia adecarboxylata*, *Salmonella* sp., *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus arlettae* などの細菌が検出され、淡水や海水での溺死例から得られた特徴的な陽性菌は検出されなかった。

非溺死例からは、陽性菌として 3%以下の平板から Oxidase test 陽性菌が認められ、これらは *Pseudomonas* 属 (*P. fluorescens*, *P. synxantha*, *P. sp.*) の細菌であった。他方、陰性菌としては *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Enterobacter ludwigii*, *E. sp.*, *Moellerella wisconsinensis*, *Serratia marcesens*, *Staphylococcus aureus*, *S. saprophyticus*, *Lactococcus lactis* などの細菌が検出された。上記の非溺死例から検出された陽性菌は溺死例からは検出されなかった。今回特に水中から発見され、溺死でないことが判明した 2 例から水棲細菌は検出されなかった。これもまた水棲細菌が死後体内に容易に侵入しないことを示唆しているものと考えられた。

これまでの研究から水棲細菌の検出は、特に肺以外の諸臓器から珪藻が検出できないような、珪藻の少ない水を吸引した事例において溺死の補助診断の一つとして役立ち、さらに溺水域を推定する場合にも一助となり得ると考えられた。そして特に海水溺死例での *Vibrio* 属, *Photobacterium* 属, *Listonella* 属の 3 属, そして淡水溺死例での *Aeromonas* 属は、各水域での溺死で高頻度に検出され、一方水中で発見された 2 例を含め非溺死例においては全く検出されず、指標として有用であることが示唆された。なお、これまでの研究成果の一部は 20 年度に国際学会 (7<sup>th</sup> ISALM, 2008) で発表し、さらに国際誌 (Legal Med, 2009) に掲載された。また残りの結果に

ついても現在投稿準備中である。

以上の結果から淡水での溺死例においては *Aeromonas hydrophila* とその近縁種が高頻度に検出された。そこで本菌を指標とした血清学的検査法の検討を行った。まず、イムノビーズないし集菌効果のある磁気ビーズを用いて溺死体の血液中の細菌を、呈色ないし吸光度計によって検出する方法を試みたが、十分な感度が得られなかった。そこで蛍光光度計を用いて高感度に検出する方法を検討した。即ち一次抗体として本菌のモノクローナル抗体をイムノビーズに固相化し、2 次抗体として Peroxidase を標識した本抗体によるサンドイッチ法を行い、解剖事例 36 例について検査を行った。しかし、特異性の点でさらに検討の必要のあることが示された。

#### 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 1 件)

① Kakizaki E, Kozawa S, Tashiro N, Sakai M, Yukawa N. Detection of bacterioplankton in immersed cadavers using selective agar plates. *Legal Med* 2009; 11: S350-S353. 査読有

[学会発表] (計 1 件)

① Kakizaki E, Kozawa S, Tashiro N, Sakai M, Yukawa N. Detection of bacterioplankton in immersed cadavers using selective agar plates., 7th International of Symposium Advances in Legal Medicine, September 3, 2008, Osaka, Japan

[その他]  
ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柿崎 英二 (KAKIZAKI EIJI)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：70284833

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし