

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号： 9 9 9 9 9
 研究種目： 奨励研究
 研究期間： 2020 ~ 2020
 課題番号： 2 0 H 0 0 9 8 7
 研究課題名 珪藻の代替となる水圏生物を用いた新規の溺死の判別法と溺死場所の推定法の開発

研究代表者

立野 志生 (Tateno, Shio)

神奈川県科学捜査研究所・科学捜査研究所技術職員

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 480,000 円

研究成果の概要：神奈川県内の河川及び浴槽内を調査地として、珪藻に依らない溺死判定法及び溺死場所の推定法の開発を試みた。鶏肉または豚肉を用いた溺水モデルを作製し、河川または浴槽に沈めてモデル内の水を採取した。また調査地点の環境水を採取し底生生物を採集した。環境水からミクロキスティス属の藍藻が観察された。底生生物の群集組成の非類似度を算出し、視覚化したところ地域差が認められた。河川水と浴槽水を無脊椎動物のmtCO₂ 遺伝子の約700 bpのバンドの有無で区別できることが示唆された。ヒト水死体の溺水から mtCO₂ 遺伝子を増幅し、その配列を調べ水生無脊椎動物の配列と比較対照することで溺水場所を推定できる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

法医学において、水死体の溺水の証明には珪藻を主とするプランクトンが肺及び消化器系の臓器から検出されることが重要視されてきた。一方でプランクトンは溺水以外の要因でヒト体内に侵入し得るとして、溺水の判定のための指標としての価値に疑義をもつ考えもある。そこで珪藻以外の生物を溺水の判定に利用できるかを検討した。

溺水の判定のための珪藻以外の生物指標として、多様な水生昆虫類をはじめとした無脊椎動物を利用できる可能性が示唆された。また、更なる検証を要するが、溺水から水生無脊椎動物由来のDNAを検出することで、屋内外で溺水死したのか否か、また河川のどの場所で溺水死したのかを明らかにできる可能性がある。

研究分野：法医学、魚病学、生態学

キーワード：溺死の判定 群集組成 水生無脊椎動物 chao指数 NMDS プランクトン PCR mtCO₂

1. 研究の目的

法医学において、あらゆる水の中に存在し、人が水を吸引することで気道内に入り込むため、これまで溺死の判定には水死体中の珪藻を主とするプランクトンの有無が利用されてきた。しかし、死体検案ハンドブック第4版にあるように、プランクトンは溺水以外の要因でヒト体内に侵入し得るとして、溺水の判定のための指標としての価値に疑義をもつ考えもある。

河川水中に生息する生物には、水生昆虫類、寄生虫及び魚類の病原体などがあり、これらはアバンダンスが大きく地域レベルでの多様性が高いため、水死体からの検出及び溺水場所の推定の容易さがともに高い生物指標として利用できる可能性がある。また、水生昆虫類は硝酸等の試薬を使用せずに肉眼もしくは実体顕微鏡レベルで同定可能であり、より簡便な判定の指標に利用できると考えられる。

そこで本研究では、溺死体のモデルとして気道とみなした穴を開けた鶏肉または豚肉を用いて、水生昆虫類、寄生虫及び魚類の病原体を新しい生物指標として、珪藻に依らない溺死の判別法と溺死場所の推定法の開発を試みた。

2. 研究成果

(1) 調査地点の環境の把握と溺水モデルの周囲の生物の観察

直径 1.4~2.2 cm の気道とみなした穴を開けた鶏肉または豚肉(以下、溺水モデルと呼称する。)を河川中または自宅の浴槽内に 120 分後まで浸した。2019 年 12 月 5 日の調査では溺水モデルは 5 つ用意して実験したが、トビ *Milvus migrans* 等からの妨害を受けたため、以降の調査では溺水モデルは 1 回の実験に 1 つ用意し、金属製の籠に入れて外部から保護した。河川中の実験ではさらに網をかぶせた。実験は河川の管理者から同意を得られた範囲で実施し、溺水モデルを沈めてから 10 分後及び 120 分後にモデル内の穴から水を取るとともに、溺水モデル外の水採取して約 80% のエタノール(サイキョウ・ファーマ製)で固定した。ただし、2019 年 12 月 5 日の調査では溺水モデルを沈めてから 10 分後及び 60 分後にモデル内の穴から水を取った。また、調査地点の生物をタモ網で採集し、水と同様にして固定し、可能な限り同定して群集組成に地域差が認められるか調べた。



図1 溺水モデル実験の様子(左:河川中 右:浴槽内)

調査地点の環境は大別して山中のキャンプ場、礫河原に囲まれた河川及び水道水をためた浴槽内であった。浴槽内では肉眼で観察可能な生物は全く認められなかった。図2に示した相模川のC地点での実験では溺水モデルにキイロカワカゲロウ *Potamanthus formosus* が付着していた。図2に示した酒匂川のD地点での実験では溺水モデルの周囲にアブラハヤ *Rhynchocypris lagowskii steindachneri* の群れが観察された。図2に示した酒匂川のH地点の表層には、トビケラ科の昆虫の頭部のような水生昆虫の体の一部やユスリカ科の幼虫が豊富に認められた。

溺水モデル内の水からは肉眼で観察可能な生物は認められなかった。籠の蓋に用いた網により流水中の無脊椎動物が遮られ、溺水モデル内に入らなかったと考えられた。今後の実験では網で蓋をせずに溺水モデルを水中に沈め、溺水判別の指標に肉眼で観察可能な生物を採用できるか否か検討する必要がある。

(2) 調査地点において採集した生物の群集組成の解析



図2 本研究における調査地点

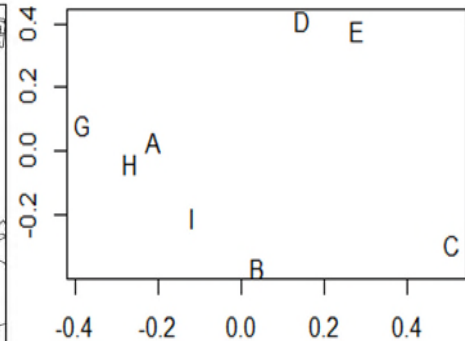


図3 生物群集の類似度指数のNMDS

図2に野外の調査地点を示した。B, C, I 地点は同じ調査地であるが、調査時期は順に 2019 年

12月5日、2020年7月16日、2021年1月30日である。浴槽内を除き、全ての調査地点でユスリカ族でないユスリカ科の昆虫が認められた。また、B, C, I 地点にのみ出現したモクズガニ *Eriocheir japonica* のようにある地点に独自に出現した生物も認められた。

生物群集について、chao 指数を用いて類似度指数を算出し、NMDS によって視覚化したところ、図3のようであり、溺水モデルの周囲の生物群集の組成には地域差が認められた。ストレス値は0.146で、0.2以下であった。概ね秋季から冬季の群集のグループと夏季の群集のグループに分かれた。認められた群集組成の地域差の要因として季節が考えられたため、季節を変数としてNPMANOVAで検定したところ、 $P=0.559$ で有意ではなく、季節のみで地域差は説明できなかった。調査地点数を増やすとともに、同じ地点で調査時期を変えて生物群集を調べることで、地域差を説明する要因を明らかにする必要がある。



図4 ユスリカ科の幼虫

(3) 溺水モデル内外で採取した水を用いた検鏡検査

調査した酒匂川にはアユ *Plecoglossus altivelis* が生息することから、真菌類のキチンに結合して紫外線下で蛍光する4,4'-ビスビフェニルナトリウムにより、採取した水からアユに寄生する微胞子虫 *Glugea plecoglossi* の胞子の検出を試みたが、胞子は認められなかった。

浴槽内に沈めた溺水モデル内の水及び浴槽にためた水道水からはプランクトンは認められなかった。図2のG地点において、溺水モデル内からはキンペラ属の珪藻が、溺水モデル外の水からはノバセッキ属の藍藻が認められるなど、河川水からはプランクトンが認められる場合があった。別の地点の水道水からプランクトンが検出されるかどうかを調べ、また藍藻が溺水判別の指標として使えるか検討するなど、溺水判別へのプランクトンの利用について再検討する必要がある。認められたプランクトンの数が少なかったため、今後の研究ではプランクトンの採集方法について検討する予定である。

(4) 溺水モデル内外で採取した水からの環境DNAの検出の試み

Water RNA/DNA Purification Kit (Norgen Biotek Corporation 製)により、採取した水からDNAを抽出した。PCR産物を1%アガロースゲルで電気泳動した。アユの病原体である冷水病菌 *Flavobacterium psychrophilum* 及び *G. plecoglossi* のDNAバンドは認められなかった。無脊椎動物のmtCOI遺伝子の増幅の結果、図5に示すように、Folmer et al. (1994)で報告された通りの約700 bpのバンドが認められた。

図5のEC(抽出コントロール)及びNC(PCRの陰性コントロール)からはバンドは認められず、PC(陽性コントロール、モクズガニのほか4種の無脊椎動物をまとめて抽出したもの)から約700 bpのバンドが認められた。一方で、Model(溺水モデルに用いたものと同一の鶏肉・豚肉)からも約700 bpのバンドとともに約1300 bpのバンドが認められたため、溺水モデルを含む水サンプルでは非特異反応が生じたと考えられた。しかし、溺水モデルを含まないF(浴槽水)からはバンドが検出されず、H, I, Bの水サンプルからは約700 bpのバンドのみが検出され、浴槽水と河川水を区別できる可能性が示唆された。

(2)で述べたように地域で特色ある無脊椎動物が認められたことをふまえ、シークエンシングにより今回検出されたDNAの配列を調べ、データベース上で検索してバンドの由来となった生物を特定することで、無脊椎動物のmtCOI遺伝子が溺水の判別及び溺水場所の推定に使用できるかの検討を進める予定である。

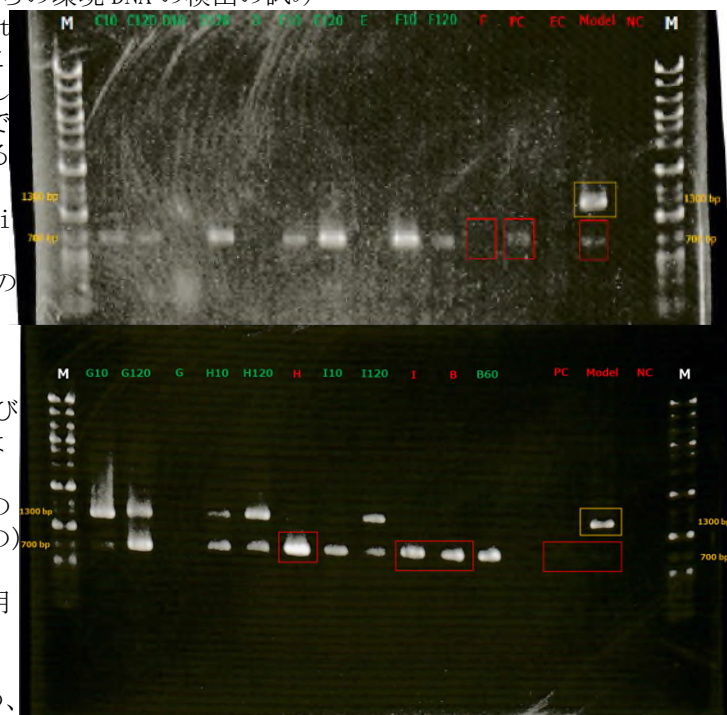


図5 無脊椎動物のmtCOIの増幅で認められたDNAのバンド

記号は図2と対応している。記号の後に数字がついたものは溺水モデル内の水サンプルである。数字は溺水モデルを沈めた時間(分)を表す。M: ラダーマーカー

主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

研究組織（研究協力者）

氏名	ローマ字氏名
----	--------