

令和 6 年 5 月 25 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03215

研究課題名（和文）最も少ない労力で行える溺死の補助診断検査：法医実務に合わせた最も効果的な活用法

研究課題名（英文）The reliable diagnostic tests for the death by drowning with less laborious: An attempt to establish the most effective and supportive methods with the forensic practice

研究代表者

湯川 修弘（Yukawa, Nobuhiro）

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：30240154

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：水に棲む微生物を指標として溺死を証明する試みは、1904年以来報告されてきた。その後、1950年代に入り肺に吸引された珪藻だけでなく、肺の血管を介して血中に侵入した珪藻を検出することこそが溺水の証明に最も重要であると提案された。しかし、1960年代に入るとこれに矛盾する報告も度々示され、現在もその議論は続いている。我々は主な原因としてフラスコの偽陽性検出が強く関係していると考えて、その根拠をこの研究で明らかにした。また従来の検査方法の簡易化・迅速化に加えて、珪藻検査を行っても十分な結果が得られない場合に、法医実務に合わせた最も少ない労力で効果的に活用できる新たな検査方法も提案した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プランクトン検査は法医実務上、非常に重要な検査であり、溺れた際に川や海の水を肺に吸引した可能性を示唆する。しかし、検査に対する信頼性は、国や施設によって様々である。我々はその原因の1つを実験的に明らかにした。さらに肺以外の諸臓器から検出される珪藻の数は、従来言われているよりもずっと少ないことも報告した。また珪藻を含めてあらゆる微細藻類を分子生物学的に検出するための基盤的実験も継続して実施し一定の進展が得られた。さらに、水中の細菌を対象とした検査方法は、従来の検査の代替法あるいは補強する検査として実務レベルで効果的に活用できることを示した。このように溺死診断検査法のさらなる発展に貢献できた。

研究成果の概要（英文）：Inconsistent results from diatom tests were common in studies carried out in the 1960-80s, but the reasons for this remained unclear. In the present study, we have identified one of the most important factors associated with false-positive results in diatom tests using strong acid. The data also suggest that the number and abundance of diatoms in closed organs of drowning victims may be much lower than previously thought. In this study, we have also developed a faster and less laborious method for extracting DNA and detecting bacterioplankton from lung and blood samples to simplify the whole process. We are also planning new techniques to investigate at a wide range of aquatic microbes in lung and blood samples from victims.

研究分野：法医学

キーワード：法医学 死因究明 溺死の診断 珪藻 水棲細菌 壊機法 分子生物学的手法

## 1. 研究開始当初の背景

水中や水辺で発見された遺体の死因を究明することの困難さは、1247年の書物に既に記されている。ヒトの体は元々60-70%が水で構成されており、死後、時間が経過すると水は細胞や組織を通過し移動するため、水の存在をもって溺水を証明することは困難になる。またたとえ死後、間もない遺体であっても溺死以外の死因で、鼻口部の泡沫や顕著な肺水腫など溺死に似た解剖所見を時々経験する。そこで、水に棲む微生物の存在に基づいて体内に入った溺水を証明する試みが、1904年以來報告されてきた。その後、1950年代に入ると肺を介して血中に入った珪藻を検出できて初めて溺水を証明できると提案されるようになった。即ち、溺死の際、肺に水を吸引し、その水の一部は肺泡毛細血管を介して血中に入り血行性に全身に運ばれる。そこで水と共に各臓器へ達した水中の微生物を検出することで間接的に溺水の存在が証明されるという考えである。これに対して、既に死亡した状態で水中に遺棄された場合は、呼吸運動や血液の循環は既に停止しているため、水圧などの影響によって肺に物理的に少量の水が入ることはあっても、水が血管を通過して全身に運ばれることはないため、水と共に珪藻が腎臓や肝臓など肺以外の臓器で検出されることはないとする考えである。しかし、1960年代に入るとこれに矛盾する検査結果や実験結果が報告されるようになり、現在もなおその理由は明らかになっていない。そのため、現在も珪藻検査に対する信頼性は国や機関によって分かれている。なぜそのような違いが生じるのか、我々は20年以上にわたりこの問題の解決に取り組んできた。我々はその問題の主な原因としてフラスコの偽陽性検出が強く関係していると考えてその根拠をこの研究で明らかにしたいと考えた。さらに従来珪藻検査の特異性や検出感度を高めることができれば、珪藻検査の重要性や信頼性を向上できると考え、これに取り組んだ。また、従来珪藻検査の方法を再検討し最適化することにより、少ない労力や時間で検査を行うことが可能となれば、これまで非常に煩雑で熟練を要し費用対効果が非常に低いと敬遠されてきた珪藻検査の有用性は向上することが期待できる。さらに、腎臓や肝臓から検出される珪藻の数は、様々な報告例を比較するとかなりの相違がみられる。我々はこれまでの継続的な研究を通して腎臓や肝臓に含まれる珪藻の数は従来いわれているよりもずっと少ないのではないかと考えおり、これについてもこの研究を通してその一端を明らかにしたい。さらに、珪藻を指標とした検査は、水環境における珪藻の「数」に依存するため、これまで珪藻が少ない水域では診断に苦慮する場合も法実務の現場で度々経験した。そこで珪藻以外の水棲微生物をターゲットとした新しい検査方法の必要性を強く感じ、これまで基盤的研究を継続してきた。

## 2. 研究の目的

珪藻を指標としたプランクトン検査は、古くから溺水吸引を示唆する重要な検査として位置付けられてきた。しかし、偽陽性検出の問題や検出感度の低さの問題など、未解決の課題は多く残されている。そこでまず大きな課題の1つである偽陽性検出の主な原因について本研究で明らかにすることとした。そして、偽陽性検出を防ぐ方法を新たに提案したいと考えた。さらにもう一つの課題である珪藻検査の検査方法を改善することで検出感度を従来よりも向上させ、検査時間も大幅に短縮することを検討した。しかし、溺水吸引の補助診断検査として珪藻の検出だけに頼ると、珪藻は棲息環境水域によって、数が極端に少ない場合がある。そのため、法実務において診断に苦慮する場合があり、従来の検査法とは別に追加して行う検出方法も合わせて利用することが理想的であり、そのためのアプローチを試みた。珪藻以外の水棲微生物としては、水棲細菌 (*Aeromonas*, *Vibrio*, *Photobacterium* など) をターゲットとした。水棲細菌は溺死体の血管内や諸臓器内においてその数が非常に多いことから、珪藻と比べて格段に検出しやすい。そのため珪藻検査を実施して肺に珪藻が非常に少ない、あるいは腎臓や肝臓など肺以外の臓器から珪藻を検出できなくても、それを補強する検査として効果的と考えた。その手法として LAMP 法をまず検討した。LAMP 法は分子生物学的な手法を用いる方法で、一般的な PCR 法やリアルタイム PCR 法 (インターカレーター法、両末端蛍光プローブ法) と異なり、6つのプライマーを使用することから、高濃度のテンプレート (100-500 ng/tube) に対しても検査が可能であり、特異性が高い検出系を確立できた。そこで、その方法をさらに改良して検査行程のほぼすべてを自動化することにより最も少ない労力で簡便・迅速に水棲細菌を検出する方法を実務レベルで検証した。そして珪藻検査に追加して、あるいは先行して行う予備試験として非常に効果的であることが示された。加えて、本研究では珪藻やその他の微細藻類全般を分子生物学的に広く検出できる方法として最終的な目標としてメタゲノム解析やマイクロアレイ解析を目指して検討した。またタンパク質分解酵素や界面活性剤を用いて組織から珪藻を単離・検出する方法の検証も試みた。

## 3. 研究の方法

### (1) 珪藻検査における偽陽性検出に対する原因究明

[壊機法を用いた組織試料からの珪藻検出(1回目の壊機)] 肺や現場水については組織 2 g, 現場水 50-200 mL, 遠心分離 2 回, 腎臓や肝臓, 血液試料については組織 10-20 g, 血液 10 mL,

遠心分離 3 回の諸条件で、砂皿上壊機法を実施した。壊機法に用いるケルダール分解装置は強力に組織を分解させるためガス式を利用した。[フラスコに残存する珪藻の検出 (2 回目から 6 回目の壊機)] 壊機試験終了後の各フラスコを洗浄後、組織を入れずに上の 1 回目の方法と同様に 2 回目、3 回目の壊機試験を行った。これらのうち 2 例については、3 回目の壊機試験でも 1-59 個の珪藻を認めたため、6 回目まで実施した。[検出した珪藻の数や大きさ、種類] 検出した珪藻の数をカウントし、種類や大きさを確認した。ただし、腎臓や肝臓の壊機試験において陰性対照に認めた極めて小さな珪藻 (5-7  $\mu\text{m}$ ) は、陽性カウントとは別にカウントした。珪藻の断片のみを認めた場合も別にカウントした。[腎臓や肝臓の再テスト] 腎臓や肝臓で 1-2 個の珪藻を認めた事例を含めて計 9 例 (12 検体) について、再度壊機試験を実施して、同様の結果が得られるかを確認した。[遠心分離後の吸引排液中に含まれる珪藻の確認] 除酸処理において遠心分離後の吸引排液を回収し、失われた珪藻の数をフィルター濾過により調査した。[フラスコに残存した珪藻の電子顕微鏡観察] 河川水 400 mL を 4,000 rpm, 30 分間遠心分離後、沈渣をケルダールフラスコに移し、発煙硝酸及び過酸化水素を用いて壊機試験を実施した。試験後、フラスコは 3% 強アルカリ洗剤で浸漬洗浄し、もう一度同じフラスコで河川水 400 mL を壊機した。試験後、珪藻の固着が予想される部位にマジック及びガラス切りでマークした (2 × 2 cm)。その後、フラスコは水道水や超純水で十分に水洗し、ガラス片を切り出した。ガラス片はオスミウムプラズマコーター Meiva Fosis Neoc-21S を用いて、薄くオスミウム蒸着し、カーボンテープおよび銀ペーストで試料台に接着した。これを SEM (FEI 社製 Quanta3D FEG; 加速電圧 5 kV) を用いて観察し、珪藻の有無を調べた。

#### (2) 壊機試験法の最適化への試み

プランクトン検査は設備環境や予算、人的制約等に合わせて様々な国や機関で最適化が試みられている。壊機試験法について我々は系統的な研究及び日常の検査業務を通して検査方法の改善に努めてきた。現時点において改善でき効果的であった方法について検討した。

#### (3) 蛋白質分解酵素を用いた安全な珪藻検査法 (代替法) の検討

研究機関によっては設備上の制約や人事上の制約によって、局所排気装置内で珪藻検査を実施できない場合もある。そこで、38 例について酵素学的に組織を溶解し、珪藻を検出する方法を検討した。蛋白質分解酵素には Proteinase K および Papain を用いた。

#### (4) LAMP 法による簡便かつ迅速な水棲細菌の検出法の検証

解剖所見や死後 CT 検査のみで十分に溺水を証明できる場合に、確認のための予備検査や簡易検査として、最も少ない労力で実施できる補助診断検査として LAMP 法を開発した。また、解剖所見や死後 CT 検査と合わせて、溺死と診断することが必ずしも容易ではない事例や、珪藻検査を実施しても珪藻の数が少なく診断が難しい事例の場合に、補助診断検査として LAMP 法を活用して考え方を 137 検体 (左右肺, 左右心血, 左右大腿静脈血等) に対して検証した。また LAMP 法は最終的にはメタゲノム解析やマイクロアレイ解析を実施するための予試験的な役割としての位置づけにおいても効果的な検査方法であることも提案したい。

#### (5) 珪藻及びその他の微細藻類の分子生物学的検出法の検討

珪藻を指標とした検査として、水中死体の諸臓器から実際に珪藻を単離し顕微鏡で探す従来の方法ではなく、分子生物学的に珪藻やその他の藻類の DNA を検出する試みも世界中の多くの研究者によって度々報告されてきた。そこで、本研究でも現在報告されている検査方法の検証を行うと共に、現状を把握し改善点を検討し、さらに新しい検査方法の提案を試みた。なお、この実験にあたり、現在所持している標準珪藻株 10 種の全 DNA 抽出・精製試料に加えて、新たに珪藻の標準株 12 種 (*Achnathes*, *Achnanthydium*, *Eunotia*, *Fragilaria*, *Gomphonema*, *Hantzschia*, *Planothidium*, *Sellaphora*, *Staurosirella*, *Cyclotella*, *Skeletonema*, *Thalassiosira*) を培養し、塩化ベンジル法を用いて全 DNA を抽出・精製した。これを陽性対照や特異性の検証のために利用した。他方、川や池、湖や海の環境水に関しては、沈降物の量に合わせて 100 mL から 2,000 mL を採取し、50 検体以上を準備し、全 DNA を抽出・精製した。また各 DNA 抽出・精製試料は DNA 合成を阻害する物質を除去するためにカラム精製も実施した。

### 4. 研究成果

#### (1) 珪藻検査における偽陽性検出に対する原因究明

検査を実施した 20 例のうち、11 例において肺や現場水に一度用いたフラスコから偽陽性として珪藻を検出した。また、一つのフラスコあたり最大 290 個の珪藻を偽陽性として認めた。フラスコへの珪藻の固着残存は、壊機した試料中 (現場水・肺) におよそ 10,000 個以上の珪藻が含まれる場合に生じやすい傾向を示した。またこの結果は、例えば 5 g や 10 g の肺組織あるいは 500 mL や 1 L の現場水を試料として用いた場合、偽陽性珪藻の数はさらに増加する可能性を示唆した。さらに、珪藻が最も残存したフラスコについては、6 回目の壊機試験後 (毎回洗浄後) でさえ 2-9 個を検出した。同じフラスコを壊機試験に繰り返し使用すると、珪藻の数がさらに加算され増える可能性を示唆した。一方、フラスコの洗浄について、通常の強アルカリ洗剤では偽陽性を完全に防げなかった。ただし加熱した 20% NaOH 溶液で処理した場合には偽陽性を生じなかった (この処理は危険であり日常の検査の洗浄方法としては勧められない) また、試薬類やその他の検査器具から珪藻の混入は認めなかった。腎臓や肝臓の陰性対照に認めた小さな珪藻 (5-7  $\mu\text{m}$ ) は、空気中からの混入と推測された。これまで新品のフラスコのみを用い

て20例を検査したが、腎臓や肝臓から検出された珪藻は非常に小さくその殆どが10 µm以下で、数も僅か1-2個/10gであった。即ち溺水由来を積極的に示唆する十分な数と種類の珪藻は確認できなかった。壊機する組織の量を増やせば、陽性率が上がる可能性も考えられるが、追試した結果は変わらなかった。遠心分離の操作過程で珪藻を失う恐れもあるため、遠心分離後に腎臓や肝臓の上清（吸引排液）を回収しフィルターを過（0.2 µm）して確認したが、珪藻は検出されなかった。但し、肺の上清（吸引排液）からは珪藻を認めた（損失は2%以下）。壊機試験中、加熱した硝酸によって珪藻が消失し数が減少する可能性もある。しかし蛋白質分解酵素Papainを用いて腎臓や肝臓を50°C（pH7）で溶解した場合にも、珪藻の数は同様に1-2個/10gであった。これまでの結果から、腎臓や肝臓に含まれる珪藻の数は肺と異なりごく僅かで、たとえ検出されても従来言われている数の珪藻は殆どの事例で期待できないのではないかと考えられた。偽陽性との判別の難しさや費用対効果を含めて、腎臓や肝臓の壊機試験は本当に必要なのだろうか。この課題について今後、新しいフラスコのみを使用してさらに多くの事例を検査し明らかにしたい。また偽陽性を引き起こすもう一つの大きな要因として、解剖時の試料採取の方法が挙げられるが、どのような操作でどの程度混入しうるのかについても将来明らかにしたい。他方、フラスコ内面に固着した珪藻について、SEMを用いてケルダールフラスコから切り出したガラス片を観察した結果、多数の珪藻の固着を認めた。以前の研究結果に加えて、今回のSEM観察の結果から壊機試験中に珪藻がフラスコ内面に固着し、これが次の壊機試験でガラスから遊離し、偽陽性として検出されていることが改めて確認できた。特にフラスコに固着する珪藻にはいくつかの特徴的なパターンがみられ、珪藻が偽陽性として検出される機序も示唆された。詳細についてはさらに分析を加え今後報告していく予定である。

#### (2) 壊機試験法の最適化への試み

現在、我々は壊機試験法において組織の溶解に硫酸を用いていない。その理由は可能な限り使用する劇物を減らすためや、組織の完全な溶解に必ずしも必要としなかったためである。硫酸は沸点が高く不揮発性であることから、加熱中に溶解液が蒸発する心配がなく、その意味で溶解液が燃焼したり焦げついたりすることは基本的にない。しかし、硫酸は粘性や比重が高く扱いづらい上に、硝酸を追加した際に激しく反応し飛沫のためコンタミネーションを生じやすい。また希釈された状態ではそもそも酸化力が顕著に低下することも論じられており、最適な条件下で使用する事自体容易ではない。そのため、十分に使い慣れている場合を除いて、やはり硫酸は敢えて使用する必要はないのではないかと考えられた。加熱時間については、温度に依存するが、検鏡を容易にするため30分以上は行っている。ただし90分は超えないようにし、それでも不十分な場合は強制的に終了している。一般に加熱時間が長いと殻の薄い珪藻は溶解し消失しやすくなるが、そもそもそのような珪藻は数も種類も多くないため、組織の溶解を優先し、他の珪藻を確実に観察できるようにしている。検出感度を上げるため、組織の検体量を増やす方法も考えられるが、多量の臓器（50~100g）を溶解するには、強い火力で長時間加熱しなければならず、そのような条件では珪藻自体も溶けてしまう。またそれを避けるために、短い時間で壊機を終了すると、未消化残渣が多すぎて鏡検に著しい支障を来す。その意味で例えば肝臓では10gの組織量が適切で、20gが限界ではないかと我々は考えている。さらに強酸による組織の溶解が不十分であると、遠心分離によって珪藻が沈みにくくなる。そのため小さな珪藻や比重の低い珪藻にとって（特に海水珪藻）、組織の完全な溶解は重要である。溶解液が単に透明になっただけでは不十分な場合が多い。我々はこれを、過酸加水素を加えた際に生じる泡沫の状態で判断している。珪藻検査の最適化については今後も検討を続けていく。

#### (3) 蛋白質分解酵素を用いた安全な珪藻検査法（代替法）の検討

非常に危険な発煙硝酸を使用しなくても、肺組織や現場水を効果的に溶解できることができ、実務での利用も可能であることが示された。しかし、発煙硝酸を加熱沸騰させて組織を溶解する方法の方が、組織をより完全に消化することができ、バックグランドが著しく低下することから検出感度も向上することも示された。ただし、安全な代替法としては非常に優れており、今後はより簡便かつ迅速に検査を行えるようにさらなる改善を検討したい。

#### (4) LAMP法による簡便かつ迅速な水棲細菌の検出法の検証

血液を採取できた場合、腐乱した事例や損傷の多い事例、水辺で発見された非溺死例などにおいても、偽陽性検出は確認されず、正しく判定できていることが示された。特にLAMP法で抽出精製した検査試料（DNAテンプレート）は、そのままメタゲノム解析による網羅的検出を行うことができ、診断精度をさらに高めることが可能である。ただし、メタゲノム解析には現在よりもさらに効果的なプライマーセットの新規開発が不可欠であり、今後も引き続き研究を進めていく。また、水棲細菌の確定診断として、マイクロアレイ解析用のDNAプローブも新たに設計した。多数の細菌遺伝子の候補の中から、最終的に9つのDNAプローブ（100bp以上）を決定した。これらのターゲットは、メタゲノム解析法や培養法で過去に溺死例から高頻度に検出されたものと一致する。また18種の細菌種をそれぞれ平板培養し、シングルコロニーとした後、液体培養を行って増菌させた。これを遠心分離し、集菌したのち全DNAを抽出・精製した。

標準菌株として、また特異性の確認用として利用した。

#### (5) 珪藻及びその他の微細藻類の分子生物学的検出法の検討

珪藻やその他の微細藻類を顕微鏡で検出するのではなく、DNA を指標として分子生物学的に検出する方法について検討した。これまでに様々な報告が世界各国からなされてきた。しかし、Primer・Probe の設計やその他の DNA 増幅条件、そもそも検出できるほど微細藻類が血液や諸臓器中に存在しているのかなど、検討すべき課題は多い。そこで、まず国際誌で報告されている6つの検査方法を検証した(A-F)。20年以上前に報告されたものもあり、DNA 合成酵素やDNA増幅装置など当時と完全に同じ条件下での再現できない。しかし、特異性や増幅産物の生成量に強く影響するアニーリング温度やサイクル数などを一致させ、また条件をいくつか変えて検証した。DNA 合成酵素は複数の種類(*Pol I* 型, 型, Hot Start, GC rich 対応など)を利用した。その結果、Aらのプライマーは、植物プランクトンをターゲットとしているが、ヒトDNAと交叉性を示し、また純粋培養された標準珪藻株や河川や海の各種環境水に対して必ずしも反応しなかった。Bらのプライマーは、Aらとは別の遺伝子で植物プランクトンをターゲットにしているが、ヒトDNAやバクテリアとの交叉性を認めた。また肺組織においても交叉性を高頻度に認めた。CらやDらの各プライマーは、珪藻類や光合成細菌(藍藻, シアノバクテリア)の遺伝子をターゲットとしていたが、ヒトDNAや細菌類と強い交叉性を認めた。Eらのプライマーは、珪藻類をターゲットとしていたが、ヒトDNAと強い交叉性を認め、また溺水や珪藻とは関係ない殆どの検体に対して陽性を示した。Fらのプライマーは、光合成細菌をターゲットとしているが、現場水で陽性反応を得られなかった。このように、今回調べた全ての検出系において、実務での有効性は確認できなかった。我々もいくつかの遺伝子をターゲットしてプライマー・プローブを設計し検討した。その結果、特異性や検出感度の優れた検出系が得られた。1つは標準珪藻株に対していくつか反応の弱いものもみられたが、様々な環境水に対して非常に優れていた。次に別の遺伝子をターゲットとしたが、検体によってプライマーダイマーを形成する場合があります。3つ目は、さらに別の遺伝子をターゲットとし、検討した中で最も結果が良好であり、検出感度も高く、特異性も優れていた。肺組織に対して、壊機法で検出された珪藻の数との相関を認めた。ただし肺1gあたり5,000個から10,000個程度の珪藻を検出できる検体(1mgあたり5-10個)でなければ陽性を示さなかった。しかし、1回のPCRで検査できるテンプレート(DNA)量から換算すると、今回の結果は妥当と思われた。死後変化の殆ど無い組織・血液から得られた高濃度のDNA( $\geq 50$  ng/ $\mu$ L)、腐敗した組織・血液から得られたDNA、死後に増殖する細菌から得られたDNAなどに対して、十分な特異性が得られ、検出感度も100 fg/tubeと高感度であった。これらデータの詳細は今後論文の発表をもって報告する予定である。今後もさらに解析や検討を続け溺死診断検査法の発展に貢献したい。

#### [本研究は以下のこれまでの我々の溺死診断研究を基盤にして計画し実行した]

【1】 Kakizaki E, Takahama K, Seo Y, Kozawa S, Sakai M, Yukawa N. Marine bacteria comprise a possible indicator of drowning in seawater. *Forensic Sci Int* (2008). 【2】 Kakizaki E, Kozawa S, Sakai M, Yukawa N. Bioluminescent bacteria have potential as a marker of drowning in seawater. *Legal Med* (2009). 【3】 Kakizaki E, Kozawa S, Tashiro N, Sakai M, Yukawa N. Detection of bacterioplankton in immersed cadavers using selective agar plates. *Legal Med* (2009). 【4】 Kakizaki E, Kozawa S, Matsuda H, Muraoka E, Uchiyama T, Sakai M, Yukawa N. Freshwater bacterioplankton cultured from liver, kidney and lungs of a decomposed cadaver retrieved from a sandy seashore. *Legal Med* (2010). 【5】 Kakizaki E, Kozawa S, Matsuda H, Muraoka E, Uchiyama T, Sakai M, Yukawa N. In vitro study of possible microbial indicators for drowning. *Forensic Sci Int* (2011). 【6】 Kakizaki E, Kozawa S, Imamura N, Uchiyama T, Nishida S, Sakai M, Yukawa N. Detection of marine and freshwater bacterioplankton in immersed victims: post-mortem bacterial invasion does not readily occur. *Forensic Sci Int* (2011). 【7】 Kakizaki E, Kozawa S, Sakai M, Yukawa N. Numbers, sizes and types of diatoms around estuaries for a diatom test. *Am J Forensic Med Pathol* (2011). 【8】 Kakizaki E, Ogura Y, Kozawa S, Nishida S, Uchiyama T, Hayashi T, Yukawa N. Detection of diverse aquatic microbes in blood and organs of drowning victims: First metagenomic approach using high-throughput 454-pyrosequencing. *Forensic Sci Int* (2012). 【9】 Uchiyama T, Kakizaki E, Kozawa S, Nishida S, Imamura N, Yukawa N. A new molecular approach to help conclude drowning as a cause of death: Simultaneous detection of eight bacterioplankton species using real-time PCR assays with TaqMan probes. *Forensic Sci Int* (2012). 【10】 Yukawa N, Kakizaki E, Kozawa S. Diatom and laboratory tests to support a conclusion of death by drowning. in: Ruttly GN (Ed), *Essentials of Autopsy Practice: Innovations, Updates and Advances in Practice*, vol. 5, Springer (2013). 【11】 Kakizaki E, Yukawa N. Simple protocol for extracting diatoms from lung tissues of suspected drowning cases within three hours. *Forensic Sci Int* (2015). 【12】 柿崎英二, 湯川修弘. 特集 次世代シーケンサーが可能にした感染学の新しい展開, 4. 臨床への応用(Clinical Sequencing), 4)法医学への応用. 化学療法領域 (2017). 【13】 Kakizaki E, Sonoda A, Sakai M, Yukawa N. Simple detection of bacterioplankton using a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay: First practical approach to 72 cases of suspected drowning. *Forensic Sci Int* (2018). 【14】 Kakizaki E, Sonoda A, Shinkawa N, Yukawa N. A new enzymatic method for extracting diatoms from organs of suspected drowning cases using papain. *Forensic Sci Int* (2019). 【15】 Kakizaki E, Shinkawa N, Sonoda A, Yukawa N. Conventional diatom testing using strong acid: Notable false-positive results caused by an underestimated contamination source (blind spot). *Forensic Sci Int* (2022). 【16】 Sonoda A, Kakizaki E, Shinkawa N, Yukawa N. Conventional diatom testing using strong acid: (II) Number and types of diatoms detected in closed organs and lungs of 80 autopsy cases using only new Kjeldahl flasks. *Forensic Sci Int* (2022).

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Shinkawa N, Yanagita M, Yukawa N, Nagatomo T	4. 巻 19
2. 論文標題 Postmortem computed tomography of barium peritonitis due to descending colon perforation	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Radiology Case Reports	6. 最初と最後の頁 2008-20012
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.radcr.2024.02.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Otatsume M, Shinkawa N, Tachibana M, Kuroki H, Ro A, Sonoda A, Kakizaki E, Yukawa N	4. 巻 101
2. 論文標題 Technical note: Excel spreadsheet calculation of the Henssge equation as an aid to estimating postmortem interval	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Forensic and Legal Medicine	6. 最初と最後の頁 102634
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jflm.2023.102634	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Sonoda A, Shinkawa N, Kakizaki E, Yukawa N	4. 巻 8
2. 論文標題 A case of fatal tracheal compression in a patient with Hashimoto's disease under the setting of previous tracheostomy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Forensic Science International: Reports	6. 最初と最後の頁 100337
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.fsir.2023.100337	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Shinkawa N, Marukawa M, Wada K, Yukawa N	4. 巻 64
2. 論文標題 Methodological considerations of the acetaminophen Detection Kit: Involvement of molecular oxygen (O <sub>2</sub> ) in an indophenol reaction	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Legal Medicine	6. 最初と最後の頁 102278
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.legalmed.2023.102278	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shinkawa N, Imada M, Azuma M, Shinkawa N, Yukawa N	4. 巻 97
2. 論文標題 A clear presentation of intracranial hypostasis on PMCT	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Forensic and Legal Medicine	6. 最初と最後の頁 102540
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jflm.2023.102540	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shinkawa N, Takahashi N, Yano K, Sawaguchi A, Sonoda A, Kakizaki E, Yukawa N	4. 巻 44
2. 論文標題 A suggested mechanism for green discoloration of the postmortem brain	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 American Journal of Forensic Medicine and Pathology	6. 最初と最後の頁 132-135
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/PAF.0000000000000822	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sonoda A, Kakizaki E, Shinkawa N, Matsuda H, Yukawa N	4. 巻 341
2. 論文標題 Conventional diatom testing using strong acid: (II) Number and types of diatoms detected in closed organs and lungs of 80 autopsy cases using only new Kjeldahl flasks	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Forensic Science International	6. 最初と最後の頁 111510
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.forsciint.2022.111510	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shinkawa N, Kakizaki E, Sonoda A, Yukawa N	4. 巻 92
2. 論文標題 An autopsy case report of tramline bruises with various shapes -histological and mechanistic considerations	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Forensic and Legal Medicine	6. 最初と最後の頁 102452
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jflm.2022.102452	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sonoda A, Shinkawa N, Kakizaki E, Yukawa N	4. 巻 43
2. 論文標題 A case of fatal exsanguination by a Japanese short sword	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 American Journal of Forensic Medicine and Pathology	6. 最初と最後の頁 282-286
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/PAF.0000000000000767	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shinkawa N, Kakizaki E, Sonoda A, Yukawa N	4. 巻 18
2. 論文標題 Hemorrhagic shock due to ruptured idiopathic intramural hematoma of the sigmoid colon-An autopsy case report	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Radiology Case Reports	6. 最初と最後の頁 1190-1196
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.radcr.2022.12.061	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yukawa N, Shinkawa N, Yano K, Tachibana M, Kakizaki E, Sonoda A	4. 巻 60
2. 論文標題 On Baecchi's staining method with reference to Nakagawa et al. (2021): "Advantages of filtration method for sperm-DNA genotyping in sexual assault cases"	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Legal Medicine	6. 最初と最後の頁 102176
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.legalmed.2022.102176	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kakizaki E, Shinkawa N, Sonoda A and Yukawa N	4. 巻 330
2. 論文標題 Conventional diatom testing using strong acid: Notable false-positive results caused by an underestimated contamination source (blind spot)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Forensic Science International	6. 最初と最後の頁 111131
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.forsciint.2021.111131	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -



1. 著者名 Shinkawa N, Meiri T, Kakizaki E, Sonoda A and Yukawa N	4. 巻 94(1128)
2. 論文標題 "Black ring-shaped burn" in button battery ingestion is not a burn - Comparison with charring using spectral CT	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The British Journal of Radiology	6. 最初と最後の頁 20210271
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1259/bjr.20210271	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計7件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 柿崎英二, 新川慶明, 園田 愛, 柳井章江, 湯川修弘
2. 発表標題 壊機法によるプランクトン検査: 組織の溶解について(第4報)
3. 学会等名 第107次日本法医学会学術全国集会(小田原)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 湯川修弘, 大立目真臣, 新川慶明, 黒木尚長, 呂 彩子, 園田 愛, 柿崎英二
2. 発表標題 死後経過時間推定の一助としてのエクセル・スプレッドシートを用いたヘンスケの方程式の計算
3. 学会等名 第73回日本法医学会学術九州地方集会(鹿児島)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 柿崎英二, 園田 愛, 新川慶明, 柳井章江, 湯川修弘
2. 発表標題 壊機法によるプランクトン検査: 肺以外の臓器や血液を対象とした検査は本当に効果的か(第3報)
3. 学会等名 第106次日本法医学会学術全国集会(名古屋市)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 湯川修弘, 新川慶明, 園田 愛, 矢野希代子, 柿崎英二
2. 発表標題 ヴィシユネフスキー斑の確認に血痕予試験のロイコマラカイト緑法を試みた一剖検例
3. 学会等名 第72回日本法医学会学術九州地方集会(長崎市)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柿崎英二, 新川慶明, 園田 愛, 柳井章江, 湯川修弘
2. 発表標題 壊機法によるプランクトン検査: 腎臓や肝臓から検出される珪藻について(第2報)
3. 学会等名 第105次日本法医学会学術全国集会(福岡)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 湯川修弘, 新川慶明, 園田 愛, 柿崎英二, 和田 啓
2. 発表標題 カロナルのインタビューフォームを理解するためのアセトアミノフェン代謝の基礎
3. 学会等名 第71回日本法医学会学術九州地方集会(北九州)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新川慶明, 湯川修弘, 園田 愛, 柿崎英二
2. 発表標題 ボタン電池による損傷の黒色部分は火傷(炭化)ではない
3. 学会等名 第71回日本法医学会学術九州地方集会(北九州)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	柿崎 英二  (Kakizaki Eiji)  (70284833)	宮崎大学・医学部・准教授   (17601)	
研究 分担者	新川 慶明  (Shinkawa Norihiro)  (40625836)	宮崎大学・医学部・助教   (17601)	
研究 分担者	園田 愛  (Sonoda Ai)  (10762122)	宮崎大学・医学部・助手   (17601)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力者	柳井 章江  (Yanai Akie)	山口大学・大学院医学系研究科・准教授	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------