

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 25 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790598

研究課題名（和文） 溺死の診断のためのクローン解析に基づく水棲微生物の血中及び臓器内分布について

研究課題名（英文） Detection of diverse aquatic microbes in blood and organs of drowning victims by a metagenomic approach

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）：溺死の際、どのような水棲の微生物（藍藻，細菌，古細菌，珪藻，鞭毛藻，緑藻など）が，溺水の吸引と共に，体内に侵入ないし増殖しているのか，その情報はあまり明らかにされていない．そこで，本研究では次世代シーケンサーの優れた並列解析能力を利用し，溺死体の体内に侵入したあらゆる微生物を網羅的に解析したいと考えた．そして本研究結果から，我々の設計したプライマーを用いることで，溺死体の血液や臓器中には様々な種類の水棲微生物が侵入していることが世界で初めて明らかとなり，さらにそれらの情報は溺死の診断に役立つことが示された．

研究成果の概要（英文）：We used a high-throughput 454-pyrosequencing strategy to detect diverse aquatic microbes in the blood and organs of two drowning victims and obtained novel information about various microbes. This technique was very useful for determining the diversity of aquatic microbes such as bacteria including cyanobacteria, diatoms and other algae in drowning victims. This technique therefore has high potential as a novel molecular tool with which to examine whether an immersed victim has drowned, especially when the results of conventional diatom testing or other useful approaches are equivocal.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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，水棲微生物，プランクトン，水棲細菌，珪藻，藍藻

1. 研究開始当初の背景

これまで我々は溺死の診断を目的として水棲細菌に関する一連の研究に取り組み，6編の論文に報告した．研究では，第一に，溺

死体において水の塩濃度に特徴的な水棲細菌が高率に検出されることを明らかにした。第二に、擬陽性がないという意味での特異性について、水中から回収された遺体でも、解剖所見や状況を総合的に判断して水の吸引のない、あるいはほとんどないと考えられた事例では、症例数はまだ限られているものの、水棲細菌は検出されなかった。第三に、死後に別の水域、例えば川で溺れて海に流された事例では、海洋細菌は検出されず、淡水性水棲細菌のみが検出されるという、溺水場所の絞り込みに役立つ結果が得られた。これらの結果から、水棲細菌の検査は溺死の補助診断の新たな方法として大いに期待できると考えられた。

ところで我々の検査法は様々な水棲微生物の中で細菌のみを対象としており、検出可能な種も培地のタイプや培養条件等によってある程度限定されてしまう。さらに血中で増殖しない菌はほぼ検出することができない。そこで、水棲細菌のみならず実際にどのような種類の水棲微生物が、どのような割合で溺死体の血液中に存在しないし増殖しているのかを広く網羅的に調査したいと考えた。

2. 研究の目的

特定の水棲微生物を指標として溺死の診断に役立つ試みはこれまでに数多く報告されている。しかし、実際に溺死体の血液および臓器中にどのような種類の水棲微生物（藍藻、細菌、古細菌、珪藻、鞭毛藻、緑藻など）がどのような割合で、広く存在しているのか明らかにされていない。

そこで、本研究では次世代シーケンサーGS FLX System (Roche, 454) の優れた並列解析能力を利用し、溺死体の体内に侵入したあらゆる微生物を網羅的に解析したいと考えた。即ち、微生物の16S rRNA 遺伝子には、微生物間で共通する保存領域と、属ないし種レベルでの識別が可能な可変領域が存在する。そこで保存領域に設定した一組のプライマーセットを用いて検査試料中の様々な微生物の可変領域を網羅的に増幅し、ピロシーケンス法を用いてそれらを解析すれば、難培養性の微生物群も含め広く群集構造を明らかにすることができると思えた。

3. 研究の方法

藍藻、細菌、古細菌、珪藻、鞭毛藻、緑藻など様々な水棲微生物の16S rRNA 遺伝子についてアライメント解析を行った。そしてこれらのうちできる限り多くの種類を、可能な限り属レベルで識別可能な可変領域（増幅領

域）及び保存領域（プライマー領域）を検討した。検討後、決定したプライマーを用いてこれまで我々が主に溺死例から単離した細菌72株について増幅を試み、プライマーの有効性を検討した。

続いて、実際の淡水及び海水溺死例の2例について、血液試料（左心血、右心血、大腿静脈血）、臓器試料（右肺下葉内部、左肺上葉辺縁部、腎臓、肝臓）及び水試料（遺体発見現場）から全DNAを抽出・精製した。次いで、各試料中の微生物の可変領域をPCRで増幅後、精製・定量し、エマルジョンPCRを行った。さらに、ピロシーケンスを行いGenome Sequencer FLX system (454)を用いて各試料を解析した。なお、シーケンスにはGS Titanium PicoTiterPlateの1/4区画を各事例（Case 1, 2）にそれぞれ割り当て、各検査試料の識別は8つのタグ配列 Multiplex Identifier (MID)を用いて行った。PCR産物の精製からシーケンスデータの解析までの一連の操作は宮崎大学フロンティア科学実験総合センター微生物ラボに依頼して行った。

また、各事例の諸臓器試料（右肺下葉内部、左肺上葉辺縁部、腎臓、肝臓）については、壊機法によるプランクトン検査を行い、珪藻の数及び種類を調べた。一方、血液試料（左心血、右心血、大腿静脈血）については、我々の教室で独自に行っている選択平板培地を用いた水棲細菌の検査を行い、水棲細菌の数及び種類を調べた。

4. 研究成果

様々な水棲微生物のアライメント解析を行った結果、藍藻、細菌、及び珪藻の3つについては、可変領域であるV7及びV8領域を挟む位置に、高度に保存された領域（プライマー）のあることが示された。そこで、この保存領域にプライマーを設定し、これまで我々が主に溺死例から単離した細菌72株について増幅を試みたところ、すべてに増幅が確認された。

次いで実際の淡水及び海水溺死例について、血液試料、臓器試料及び現場水からDNAを抽出し、目的の領域を増幅させたところ、何れの試料においても増幅が確認された。

GS FLX Systemを用いて各試料を解析した結果、Case 1及びCase 2において、溺水の吸引と共に多様な水棲微生物が体内に入り、血行性に諸臓器へ運ばれていることが示された。

検出された水棲微生物の一部を以下に示す。なお、これらの種の殆どは本研究によって世界で初めて、溺死体の血液や臓器試料中において確認されたものである。

Chroococcidiopsis and *Chroococcus* (Class Cyanobacteria); *Chlorella* (Trebouxiophyceae); *Brevundimonas*, *Caulobacter*, *Hypomicrobium*, *Methylobacterium*, *Paracraurococcus*, *Roseomonas*, *Sphingobium* (Alphaproteobacteria); *Delftia*, *Hydrogenophaga*, *Janthinobacterium*, *Leptothrix*, and *Pelomonas* (Betaproteobacteria); *Buttiauxella*, *Cellvibrio*, *Edwardsiella*, *Enhydrobacter*, *Glaciecola*, *Legionella*, *Marinomonas*, *Morganella*, *Photobacterium*, *Plesiomonas*, *Stenotrophomonas*, *Tolumonas* and *Vibrio* (Gammaproteobacteria); *Hymenobacter* (Sphingobacteria); *Fluviicola* (Flavobacterium); *Leifsonia*, *Cytophaga*, *Pedobacter* and *Rhodococcus* (Actinobacteria); *Cetobacterium* (Fusobacteria); *Nitrospira* (Nitrospira), *Rhabdochlamydia* (Chlamydiae); *Turicibacter* (Erysipelotrichi) など。

他方、壊機法によるプランクトン検査を行ったところ、Case 1 では左右の肺に多数の珪藻を認め、さらに腎臓や肝臓にも 1-2 個の珪藻を認めた。また Case 2 では左右の肺に珪藻を認めたものの、その数はやや少めであった。但し腎臓や肝臓には各 1 個の珪藻をそれぞれ認めた。

水棲細菌の検査を行ったところ、Case 1 では 3 つの血液試料すべてに水棲細菌の存在を示唆するブルーのコロニーが多数認められ、それらのシーケンス解析 (ABI PRISM3130 Genetic analyzer) の結果、淡水性の *Aeromonas* 属の細菌であることが示された。一方、Case 2 については細菌のコロニーは確認されなかった。

本研究におけるこれまでの結果から、我々の設計したプライマーを用いることで、水中死体の血液や臓器中に存在する多様な水棲微生物を検出できることが示された。

一般に強酸に強い珪藻以外の水棲微生物については、溺死の際、どのような種類の微生物が血液や諸臓器へ運ばれ存在しないし増殖しているのか広く明らかにされていなかったが、本研究によって実際に多様な微生物が溺水の吸引と共に血液や諸臓器に運ばれ存在していることが示された。そしてこの解析によって得られる水棲微生物に関する膨大な情報は、実際に溺死の診断を行う際に、水の吸引を示唆する有力な根拠の 1 つとして有用であることが明らかとなった。

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 Eiji Kakizaki, Yoshitoshi Ogura, Shuji Kozawa, Sho Nishida, Taketo Uchiyama, Tetsuya Hayashi, Nobuhiro Yukawa, Detection of diverse aquatic microbes in blood and organs of drowning victims: First metagenomic approach using high-throughput 454-pyrosequencing, *Forensic Science International*, in press (2012), DOI: 10.1016/j.forsciint.2012.02.010. 査読有

[学会発表] (計 2 件)

① 柿崎英二, 小澤周二, 今村奈穂子, 湯川修弘. 水中死体の血中及び臓器中に存在する水棲微生物のメタゲノム解析: ピロシーケンス法を用いた群集構造解析. 第 95 次日本法医学会総会. 日本法医学雑誌. 2011 年 6 月 16 日. コラッセふくしま (福島).

② 柿崎英二, 小澤周二, 内山岳人, 湯川修弘. 河口周辺水域で発見された水中死体 8 例における水棲微生物 (珪藻・水棲細菌) の種類と溺死した水域の推定. 第 94 次日本法医学会学術全国集会. 2010 年 6 月 24 日. タワーホール船堀 (東京).

[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
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

(4) 研究協力者

湯川 修弘 (YUKAWA NOBUHIRO)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：30240154

小澤 周二 (KOZAWA SHUJI)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：20379944

林 哲也 (HAYASHI TETSUYA)

宮崎大学・フロンティア科学実験総合

センター・教授

研究者番号：10173014

小椋 義俊 (OGURA YOSHITOSHI)

宮崎大学・フロンティア科学実験総合

センター・助教

研究者番号：40363585

内山 岳人 (UCHIYAMA TAKETO)

宮崎大学・大学院医学系研究科・大学院生

(宮崎県警察本部刑事部科学捜査研究所

法医係)

西田 翔 (NISHIDA SHO)

宮崎大学・大学院医学獣医学総合研究科・

大学院生