

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293163

研究課題名(和文) 溺死体の血液及び諸臓器中に存在する水棲微生物のメタゲノム解析

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

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) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：溺死の診断において、水由来の微生物を肺だけでなく血液などから検出できれば、生前に水を吸引した可能性が高くなる。本研究の目的は最新の遺伝子解析技術(454-pyrosequencing)を利用して、これら水棲微生物の網羅的解析を行い、溺死の診断に役立てることである。そこで、溺死ないし溺死の可能性が高い事例として、19例83試料(淡水域6例、汽水域4例、海水域9例)、非溺死例ないし極少量の水を吸引した可能性がある事例として、13例45試料を検査した。本研究は、溺死例および非溺死例の肺や血液中に存在する多様な外来性ないし内在性の微生物の種類やその構成を世界で初めて明らかにするものである。

研究成果の概要(英文)：We used a high-throughput 454-pyrosequencing strategy to detect diverse aquatic microbes in the lungs (56 specimens) and blood (72 specimens) of 19 drowning and 13 non-drowning victims. 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. To the best of our knowledge, this is the first attempt to use a next generation sequencer to investigate diverse aquatic microbes in the lungs and blood of many drowning and non-drowning victims.

研究分野：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(シアノバクテリア)

1. 研究開始当初の背景

水棲細菌を指標としたこれまでの一連の研究[1-9]において、我々は先ず溺死体の血液から水棲細菌を選択的に検出するための平板培地を開発し、血液中で優勢的な細菌の種類を培養法と遺伝子解析によって明らかにしてきた(淡水溺死では *Aeromonas* 属、海水溺死では *Vibrio* 属及び *Photobacterium* 属)。特に、河川の淡水域で溺死し、海で発見された事例では、生菌として淡水性の *Aeromonas* や *Plesiomonas* が検出され、溺死した水域の絞り込みに有効であった[3,4,6]。また、非溺死例では水中で発見された2例を含め、水棲細菌は検出されず、偽陽性は認められなかった[3,6]。しかし、珪藻やこれら水棲微生物以外に、どのような種類の水の微生物が、溺死の際、水の吸引と共に血中に入り、存在しないし増殖しうるのか、殆ど明らかになっていない。

そこで、我々は、まず Pilot Study として海水および淡水での溺死2例について、血液や諸臓器中に存在するあらゆる微生物を、454-pyrosequencing の手法を用いて解析した[8]。その結果、血液や諸臓器中には、珪藻や水棲細菌以外にも、Cyanobacteria (藍藻)、Cryptophyceae (クリプト藻)、Dictyochophyceae (黄色鞭毛藻)、Chrysophyceae (黄金色藻)、Trebouxiophyceae (トレボウクシア藻) など、多様な水棲微生物が存在していることが世界で初めて示された。また、この研究によって水棲細菌 (*Aeromonas* や *Vibrio* など) は、他の水棲の微生物に比して圧倒的に優勢であり、水棲細菌を指標とすることの重要性も改めて示された。

本研究では、次のステージとして、さらに規模を拡大して、より多くの事例を調査し、溺死体の体内における微生物相の詳細を明らかにすることとした。

[本研究を行うにあたり基盤となったこれまでの我々の溺死診断に関する研究]

【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* 176 (2008) 236-247.

【2】 [Kakizaki E](#), Kozawa S, Sakai M, [Yukawa N](#). Bioluminescent bacteria have potential as a marker of drowning in seawater: Two immersed cadavers retrieved near estuaries. *Legal Med* 11 (2009) 91-96.

【3】 [Kakizaki E](#), Kozawa S, Tashiro N, Sakai M, [Yukawa N](#). Detection of bacterioplankton in immersed cadavers using selective agar plates. *Legal Med* 11 (2009) S350-S353.

【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: possibility of drowning in a river and then

floating out to sea. *Legal Med* 12 (2010) 195-199.

【5】 [Kakizaki E](#), Kozawa S, Matsuda H, Muraoka E, Uchiyama T, Sakai M, [Yukawa N](#). In vitro study of possible microbial indicators for drowning: salinity and types of bacterioplankton proliferating in blood. *Forensic Sci Int* 204 (2011) 80-87.

【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* 211 (2011) 9-18.

【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* 32 (2011) 269-274.

【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* 220 (2012) 135-146.

【9】 Uchiyama T, [Kakizaki E](#), Kozawa S, Nishida S, Imamura N and [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* 222 (2012) 11-26.

2. 研究の目的

溺死の診断において、溺死特有の解剖所見が少ない場合や腐敗を伴う場合、その判断は難しくなる。このような場合には、水由来の微生物(珪藻類)を、肺だけでなく血液や腎臓、肝臓などから検出することが、生前に水を吸引した可能性を高める最も有力な手段とされている。そこで、最新の遺伝子解析技術(Roche Genome Sequencer Juniorによる454-pyrosequencing)の卓越した並列解析能力、即ち一度(1ラン)に平均10万個ものDNA断片の塩基配列を解読できる能力(10万リード)を利用して、これら微生物を網羅的に解析すれば、1)各解析データを集積することによって未だ明らかになっていない溺死体の体内の詳細な微生物相を世界で初めて示せるだけでなく、2)各事例の解析結果そのものが膨大な情報を提供し、それぞれの鑑定に直接反映できる。さらに、3)溺水のタイプ(淡水・海水・汽水の水)も明らかにすることが期待できる。

すべての微生物が持つ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(V1-V9)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(藍藻、細菌、珪藻、緑藻など)の可変領域をPCRで一括して増幅し、Pyrosequencing法を用いてそれらを解析すれば、多様な微生物相を一度に明らか

にできると考えた。従来の方法を用いてこのような DNA 断片を解読するには、クローニング、即ち遺伝子組み換え操作が必要であり、さらに一つ一つを個別にシーケンスしなければならず、多大な労力と莫大な費用を要する。このように 454-pyrosequencing 法の技術を用いて世界に先駆けてこれら未解明の課題を明らかにしたいと考えた。

3. 研究の方法

溺死例ないし非溺死例の計 32 例 128 試料について、肺組織（右肺下葉内部、左肺上葉辺縁部）及び血液試料（左心血、右心血、大腿静脈血）中の微生物の種類を網羅的に明らかにするための検査を行った。また、水中に存在する様々な微生物の対照試料として、河川や海の水を計 16 箇所から採取し、同様に調査を行った。

最初に、法医解剖の所見及び現場環境から、溺死ないし溺死の可能性が高い事例として、19 例 83 試料（肺 38 試料、血液 45 試料）を検査した。このうち、6 例は淡水域で発見され、計 28 試料（肺 12 試料、血液 16 試料）を検査対象とした。また 4 例は、淡水と海水の混ざり合う汽水域で発見されたもので、18 試料（肺 8 試料、血液 10 試料）を検査した。さらに、残り 9 例は、海水域で発見されたもので、37 試料（肺 18 試料、血液 19 試料）を検査した。

一方、水中あるいは水辺近くで発見されたものの、法医解剖の所見及び現場環境から、溺死の可能性が低い事例として、13 例 45 試料（肺 18 試料、血液 27 試料）を検査した。このうち、2 例は水中で発見された事例であり、また別の 3 例は、水には浸かかっていないものの、各々の現場環境の水が少なくとも遺体発見時に衣服に付着していた事例である。

肺組織は、原則して右肺下葉内部と左肺上葉辺縁部の 2 箇所から採取した。これは、肺には死後でも水が侵入しうるため、物理的に最も肺に水が侵入しやすいと考えられる右肺下葉の内部と、最も水が浸入しにくいと考えられる左肺上葉の辺縁部への水の吸引ないし浸入の有無を明らかにしたいためである。他方、血液試料については、心臓内血液として、左心血（左心房内血液）および右心血（右心房内血液）、肺から離れた位置に存在する血液試料として、大腿静脈血も採取した。ところで当初、腎臓及び肝臓の組織も検査試料として検討していたが、これらの組織は、厳密に無菌的に試料を切り分けることは不可能であり、完全にコンタミネーションによる影響を払拭できない。そのため、本研究では、肺以外の試料については、確実に無菌的に試料を採取することのできる血液についてのみ実施した。

方法としてはまず肺組織は 0.2 g、血液試料 1 mL をステンレスビーズ（ないし金属クラッシャー）を用いて物理的に細胞を破壊し

た。次いで、Proteinase K 及び SDS を用いてさらに組織を化学的に溶解し、次いでシリカメンブレン法によってゲノム DNA を精製した。精製した DNA は、NanoDrop 2000 を用いて純度及び濃度を確認した。続いて、得られたゲノム DNA をテンプレートして、8 種類の MID プライマー（MID 1~8）を用いて、PCR を行い各試料の PCR 産物を標識した。DNA 合成酵素には、PrimeSTAR GXL DNA Polymerase（Takara）を使用した。この酵素は、高濃度のテンプレートを使用できることや、高い正確性を有すること、GC 含量の高い DNA 配列の合成にも有効であることなどの理由から選択した。増幅した PCR 産物はアガロースゲル電気泳動後、目的のバンドを切り出し精製した。さらに、qPCR および emPCR を行った後、Roche GS Junior でシーケンスを行った。qPCR 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、我々の開発した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。種の同定には Oxidase test によるスクリーニング後、特定のコロニーを採取し、PCR を行って 16S rRNA 遺伝子に基づくシーケンス解析を行った。

4. 研究成果

各検査試料（肺、血液）中に存在する水棲細菌の 16S rRNA 遺伝子（V8、V9 領域を含む約 400 bp）を増幅するために、肺および血液試料から抽出・精製したゲノム DNA は、PCR 用テンプレートとして 100 ng/μL に調製した。

PCR の条件として、テンプレート濃度 300 ng/tube、サイクル数 30 cycles で増幅の認められた試料についてのみ、陽性であるものとし、次世代シーケンサーを用いる次のステップに進むものとした。これは、予備実験において PCR を行うテンプレート濃度およびサイクル数が上記の条件を超えた場合、見かけ上 PCR 産物は得られていても、解読できる十分なリード数が得られなかったためである。

これらの PCR 条件下で増幅の確認された事例は以下の通りであった。

溺死ないし溺死の可能性の高い事例のうち、

- ・淡水域で発見された 6 例では、全例で肺の組織試料について PCR 増幅が認められ、5 例で血液試料について PCR 増幅が認められた。
- ・汽水域で発見された 4 例では、全例で肺の組織試料について PCR 増幅が認められ、3 例で血液試料について PCR 増幅が認められた。
- ・海水域で発見された 9 例では、全例で肺の

組織試料について PCR 増幅が認められ、4 例で血液試料について PCR 増幅が認められた。

一方、水中あるいは水辺近くで発見されたものの、法医解剖時の所見及び現場環境から、溺死の可能性が低いと判断された 13 例のうち、2 例は水中で発見された事例であり、これらは左右の肺と血液試料について全て PCR 増幅が認められた。また 3 例は水に浸かっていないものの、少なくとも遺体発見時に衣服に河川水や海水の付着の認められた事例で、左右の肺の両方、あるいはいずれかで PCR 増幅が認められ、1 例で血液試料について PCR 増幅が認められた。この他の 13 例中 9 例は、水辺近くで発見されたものの、海水や淡水の吸引しないし接触がないかあるいは非常に低いと判断された事例で、うち 2 例は左右の肺のいずれかで PCR 増幅を認め、この他 2 例については血液試料において PCR 増幅を認めた。

また、対照試料として計 16 箇所から採取した河川水や海水は、全ての試料で PCR 増幅を認めた。

PCR 増幅を認めた検査試料については、Min Elute PCR purification kit (QIAGEN) を用いて PCR 産物を精製・濃縮した。次にこれらの PCR 産物は、3% Nusieve 3:1 Agarose ゲル電気泳動を行い、目的のサイズの Band のみを切り出した。さらに切り出したゲルから、Min Elute Gel Extraction kit (QIAGEN) を使用して、目的のサイズの PCR 産物を精製・濃縮した。PCR 産物の濃度および純度は 3% Nusieve 3:1 Agarose ゲル電気泳動および NanoDrop 2000 を用いて確認した。これらの MID 標識 (MID 1~8) された PCR 産物は、等量ずつ混合し、 μ PCR および emPCR を行った後、Roche GS Junior でシーケンスを行った。

シーケンスの結果、研究期間全体で計 13 ランを実施し、各ランにおいて約 53,000 リード~123,000 リードのシーケンスデータが得られた (条件設定のための基礎実験として行った数ランを除く)。なお、1 リードとは、検査試料中に存在する 1 個の微生物の種類を明らかにする単位で、研究期間全体で約 1,153,000 種類の微生物群を明らかにすることを意味している。また GS Junior では、1 リードあたり 400~500 の塩基配列を解読可能である。このように水中死体の肺や血液試料からこれほど膨大で網羅的な微生物のデータを示した報告は、世界的にも認められない。今後既存のデータベースを参照し、詳細に解析を行い、これらの結果をまとめ、国際誌に投稿する。

また、溺死に関する本研究を進めいく上で、珪藻の検査は必要不可欠であるが、従来の珪藻検査は、非常に煩雑で、特に発煙硝酸を用いるため危険も伴う。そこで我々はこれに代わる方法の確立は本研究を遂行していく上でも急務と考え、酵素を用いて迅速に肺組織から珪藻を安全かつ簡便・迅速に検出可能な方法を開発した。本法は、実際の法医実務鑑定に役立ち、溺死の診断に大きく貢献でき

たことから Technical Note として論文にまとめ、国際誌に投稿し採択された。次に、この検査方法をさらに安価に迅速に行うために、別の酵素として Papain を用いる方法を考案し、その有効性が示された。今後、これらの結果もまとめ、国際誌に投稿する予定である。

今後の展望として、本研究は、各々の事例の微生物相の特徴から、現在の珪藻検査では証明できない浴槽内での溺死、特に高齢者や浴槽内での子供の殺害事件などの証明にも役立つことが期待される。また、検出の対象やプライマーを変えることにより、別の目的、例えば細菌感染による死亡が疑われる解剖事例の血中および諸臓器中における細菌相の解析や、トイレ内で出産し、便槽内に浸かった嬰兒における水の吸引の有無を判断する場合にも役立つ可能性が高い。このようにその他の法医学領域においても大きな波及効果が期待できる。

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)

Kakizaki E, Yukawa N, Simple protocol for extracting diatoms from lung tissues of suspected drowning cases within 3 h: First practical application, *Forensic Sci Int*, 251: 179-185 (2015).

DOI: 10.1016/j.forsciint.2015.03.025.

査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

柿崎英二, 園田 愛, 湯川修弘. 溺死の診断のための LAMP 法を用いた簡易・迅速検査法の開発: 属特異的 Primer を用いた *Aeromonas* 属細菌の検出. 第 100 次日本法医学学会学術全国集会. 2016 年 6 月 17 日. きゅりあん (東京都・品川区).

柿崎英二, 園田 愛, 松田晴那, 湯川修弘. 危険な強酸を用いずに安全かつ簡便迅速に行える新しい珪藻検査法の開発. 第 99 次日本法医学学会学術全国集会. 2015 年 6 月 12 日. 高知市文化プラザかるぼーと (高知県・高知市).

Kakizaki E, Yukawa N: A simple protocol for extracting diatoms from lung tissues of immersed victims using commercial reagents within three hours. 9th International Symposium Advances in Legal Medicine (ISALM). June 18th, 2014. Fukuoka (Japan).

〔図書〕(計 1 件)

Yukawa N, Kakizaki E, Kozawa S, Chapter 1, Diatom and laboratory tests to support a conclusion of death by drowning, in: Ruttly G.N. (ed.), *Essentials of Autopsy Practice: Innovations, Updates and Advances in Practice*, Springer, London, 2013, pp. 1-36.

ISBN-10: 0857295187,

ISBN-13: 978-0857295187

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

6 . 研究組織

(1)研究代表者

湯川 修弘 (YUKAWA NOBUHIRO)

宮崎大学・医学部社会医学講座

法医学分野・教授

研究者番号：30240154

(2)研究分担者

林 哲也 (HAYASHI TETSUYA)

九州大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：10173014

柿崎 英二 (KAKIZAKI EIJI)

宮崎大学・医学部社会医学講座

法医学分野・准教授

研究者番号：70284833

(3)連携研究者

小椋 義俊 (OGURA YOSHITOSHI)

九州大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：40363585

(4)研究協力者

園田 愛 (SONODA AI)

宮崎大学・医学部社会医学講座

法医学分野・助手

研究者番号：10762122