

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460871

研究課題名(和文) 溺死の診断のためのLAMP法を用いた簡易迅速スクリーニング検査法の開発

研究課題名(英文) Development of new molecular technique (LAMP assay) for determination of death by fresh water drowning

研究代表者

柿崎 英二 (KAKIZAKI, Eiji)

宮崎大学・医学部・准教授

研究者番号：70284833

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：すべての水中死体に対して、時間と労力のかかる従来の珪藻検査を実施することは容易ではない。そこで、補助診断として簡易に行える溺死のスクリーニングテストを行い迅速に判定できれば、さらに効率的に対応できると考えた。本研究の目的は、LAMP法の優れた特性(簡便性・迅速性)を利用した新しい簡易迅速診断法を開発し、法医実務に役立てることである。本研究の結果、淡水溺死の指標としてAeromonas属細菌を属レベルで広く検出可能な簡便かつ迅速な検出システムを開発した。また実際の解剖事例において、本検査を実施した結果、法医実務診断において非常に有用な検査方法であることが示された。

研究成果の概要(英文)：We determined the genus *Aeromonas* (fresh water bacterioplankton) as microbial marker for diagnosis of drowning in fresh water and tried to develop a new method using LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) assay. Present method was specific for standard strains of *Aeromonas hydrophila* and *A. salmonicida*. The sensitivity of the method was >10 pg/tube. Moreover, the *Aeromonas* spp. were detectable in blood and/or lung tissues from cadavers retrieved from the rivers (10/11), sea (4/10), near estuaries (5/5) by the new method although they were not detectable in those of non-drowning cadavers (0/14). The *Aeromonas* spp. were not also detectable in blood and lung tissues from cadavers retrieved from baths (0/6). Thus, this technique has high potential as a novel molecular tool with which to examine whether an immersed victim has drowned.

研究分野：法医学

キーワード：法医学 溺死 水棲微生物 水棲細菌 Aeromonas属 LAMP法

1. 研究開始当初の背景

解剖実施率の一層の増加が望まれる一方で、スタッフの増員が望めない法医学教室の現状では、すべての水中死体に対して、時間と労力がかかり、危険な劇物(94%硝酸、97%硫酸)を用いる従来の珪藻検査を行うことは容易ではない。そのため、従来の珪藻検査以外に、簡便かつ迅速に行える新しい検査方法の確立は急務である。またその検査は、高額な検出機器(例えば、リアルタイム PCR 装置など:350~750 万円)を導入しなくても、容易に立ち上げることのできる検査方法であることが望ましい。

LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法は、鎖置換型 DNA 合成酵素を用いて、目的とする DNA を増幅し検出する方法である。標的 DNA を増幅・検出する方法としては、PCR 法が一般に知られているが、LAMP 法は鎖置換反応を利用して全ての反応過程を一定温度(例えば 65 設定のみ)で完了することができ、所要時間も通常 1 時間程度と格段に早い。また、検出においても DNA 増幅反応の副産物であるピロリン酸マグネシウム(ニリン酸マグネシウム)の白濁を目視で確認したり、あるいは蛍光で確認できるため、電気泳動を行わなくても増幅の有無を定性的に判定できる。また増幅効率が極めて高い(PCR より高感度)ことや、高い特異性(6 つの領域を 4 つのプライマーでカバーするため)を有することも LAMP 法の優れた特徴である。さらに精密な温度制御装置も必要としないことから、例えば解剖室でも、簡易スクリーニングテストとして実施可能な極めて有用な手法と期待できる。

以上の理由から LAMP 法を用いた溺死の簡易検査法を確立できれば、法医学の実務に大きく貢献できるのではないかと考えた。

ところで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、我々はまず溺死例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。淡水及び海水溺死例では、それぞれ各水域に特徴的な水棲細菌(淡水、*Aeromonas* spp.; 海水、*Vibrio* spp., *Photobacterium* spp.) が検出された[3,4,6]。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、この方法は簡易判定に約 1 日(選択平板培養、Oxidase test)、最終的な同定には 2-3 日(PCR と DNA Sequencing)を要した。

一方、従来とは全く異なるアプローチとして、溺死体の血液と諸臓器中に存在するあらゆる微生物を網羅的に同定するために、

454-pyrosequencing によるメタゲノム解析を行った[8]。その結果、*Aeromonas* 属、*Vibrio* 属、*Photobacterium* 属細菌は、他の水棲微生物に比して圧倒的に優勢であり、これらの水棲細菌を指標とすることの重要性が改めて示された。

そこで、本研究ではまず淡水溺死の指標として有望な淡水性の水棲細菌(*Aeromonas* 属)を指標とした LAMP 法を確立することとした。

[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、水由来の微生物（珪藻類）を、肺や血液、腎臓や肝臓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。しかし、すべての水中死体に対して、時間と労力のかかる従来の珪藻検査を行うことは簡単ではない。さらに、2012年日本法学会全国集会（浜松）における水中死体の課題調査報告においても、珪藻検査の実施率は42%であった。そこで、少なくとも明らかに溺死の解剖所見が認められ、煩雑な珪藻検査による確定診断まで行う必要性の低い事例に対しては、補助診断として、簡易に行える溺死のスクリーニングテストを実施し迅速に判定できれば、より効率的に対応できると考えた。

本研究の目的は、LAMP法の優れた特性、即ち簡便かつ迅速に実施でき、高価な機器を必要とせず、判定も定性的に目視で行える特性を生かして、溺死の簡易スクリーニングテストを開発し、溺死の診断に役立てることである。

3. 研究の方法

簡便かつ迅速な溺死のスクリーニング検査を可能にするためには、指標とする水棲細菌の対象は、種レベルではなく、多数の種を一度に検出可能な属レベルであることが望ましい。

これまでの我々の研究成果から、淡水溺死の指標として *Aeromonas* 属細菌の検出が効果的であることが明らかとなっている。そこで、本研究では淡水溺死の指標として *Aeromonas* 属細菌を広く検出可能な検出システムを開発することとした。

(1) プライマーの設計

Aeromonas 属細菌及びその他の細菌について、塩基配列情報を日本 DNA データバンク (DDBJ) から収集した。次いで、収集した配列に対して GENETYX-MAC Ver. 15.0 (ゼネテックス) および PrimerExplorer V5 (栄研) を用いてアライメント解析等を行い、*Aeromonas* 属細菌を属レベルで特異的に検出可能なプライマー配列を検討・設計した。

(2) LAMP法の至適条件の決定

設計したプライマーセット (F3, 18 mer; FIP, 40 mer; BIP, 41 mer; B3, 17 mer) を用いて LAMP法の至適条件を検討した。

標準菌株として *Aeromonas hydrophila* および *Aeromonas salmonicida* を NBRC (NITE Biological Resource Center) より購入し、純粋培養、集菌後、ゲノムDNAを抽出・精製した。これらを陽性コントロールのDNAテンプレート (1 ng/tube) として、LAMP法の至適条件 (反応温度、反応時間) を決定した。DNA増幅の確認には、リアルタイム濁度測定装置 LoopampEXIA (栄研) を用いて測

定した。

(3) 特異性の検討

その他の細菌について、NBRCより標準菌株10属17種 (*Vibrio* 属3種, *Photobacterium* 属3種, *Escherichia* 属1種, *Listonella* 属1種, *Pseudomonas* 属2種, *Citrobacter* 属1種, *Enterococcus* 属1種, *Proteus* 属1種, *Shewanella* 属2種, *Aeromonas* 属2種) を購入し、純粋培養、集菌後、これらのゲノムDNAを抽出・精製した。テンプレート濃度は、100 ng/tube (通常のPCR法を行う際に上限とされている最も高いテンプレート濃度、即ち低濃度では非特異的な増幅が認められない場合でも、高濃度では非特異的な増幅が現れる場合があるため) として LAMP法を行い、非特異的な増幅が認められないか、その特異性を確認した。

ところで水中死体の状態は、水温や死後経過時間、現場環境等によって、大きく異なり、試料中に存在する微生物の種類や数も多様である。このため、特異性の高いプライマーセットを設計することが本法にとって最も重要である。そこで、特異性を詳細に検討するために、溺死体及び非溺死体から平板培地を用いた研究 [3, 4, 6] で検出された細菌143株 (*Aeromonas* 属14株, *Bacillus* 属6株, *Carnobacterium* 属1株, *Enterobacter* 属3株, *Halomonas* 属2株, *Lactococcus* 属2株, *Marinomonas* 属1株, *Pantoea* 属3株, *Pseudoalteromonas* 属5株, *Psychrobacter* 属6株, *Serratia* 属2株, *Staphylococcus* 属5株, *Vibrio* 属26株など) について、LAMP法を行い特異性を確認した。

(4) 検出感度の検討

標準菌とした *Aeromonas hydrophila* および *Aeromonas salmonicida* のDNAは、100 fg ~ 100 ng/tube の10倍希釈系列を作成し、LAMP法の検出感度を決定した。

(5) 法実務への応用

我々の開発したLAMP法が新しい簡易迅速診断法として、実務利用が可能か否かを検証するために、溺死例ないし非溺死例の計46例の肺及び血液試料 (計173試料) に対して、本検査を実施した。

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試料についてのみ、検査を実施した。

肺組織は 0.2 g、血液試料は 1 mL を -80 凍結後、ビーズ破砕機 μ T-12 (TAITEC) 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。得られた DNA 試料をテンプレートとして LAMP 法を行った。

4. 研究成果

(1) LAMP 法の至適条件

至適条件を検討した結果、反応温度 63℃、反応時間 90 min の条件下で最も検出感度が高いことが確認された。なお各プライマー濃度は、F3 及び B3 を 5 pmol/tube、FIP 及び BIP を 40 pmol/tube とした。

(2) 特異性

NBRC から購入した標準菌株のゲノム DNA をテンプレートとして、テンプレート濃度 100 ng/tube で LAMP 法を行ったところ *Aeromonas* 属の 2 種 (*A. hydrophila*, *A. salmonicida*) にのみ特異的に陽性を示した。

また溺死体及び非溺死体から検出されたことのある細菌 143 株について、LAMP 法を行ったところ、*Aeromonas* 属 14 株 (*A. allosaccharophila*, *A. hydrophila*, *A. molluscorum*, *A. popoffii*, *A. punctata*, *A. salmonicida*, *A. veronii*, *A. spp.*) のすべてにおいて陽性を示し、かつ他の属の細菌株はすべて陰性で、本法の優れた特異性が示された。

(3) 検出感度

標準菌の *Aeromonas hydrophila* および *Aeromonas salmonicida* の検出感度を調べたところ、いずれも 10 pg/tube まで検出可能であった。これは通常の PCR 法と比較して、また属レベルの検出を行える測定系として、十分な検出感度を示すものと思われる。

(4) 法医実務への応用

溺死例ないし非溺死例の計 46 例の肺及び血液試料 (計 144 試料) に対して、本研究で開発した LAMP 法を実施したところ、以下の様な結果が得られた。

淡水域で発見された計 11 例については、10 例の肺試料から陽性が得られた。また血液試料からは、5 例において陽性であった。肺試料において陰性であった 1 例については、生菌として *Pseudomonas fluorescens* や *Shewanella putrefaciens* が培養されたが、*Aeromonas* 属細菌は認められなかった。また珪藻検査においても、その数は極端に少なく、溺水の吸引は殆どなかったのではないかと考えられた。

汽水域で発見された計 5 例については、すべての肺試料から陽性が得られた。また血液試料からは、2 例において陽性であった。

海水域で発見された計 10 例については、5

例の肺試料から陽性が得られた。また血液試料からは、2 例において陽性であった。これら陽性であった事例の中には、河川及び河口の近くで入水した可能性の高い事例が含まれていた。

浴槽内で発見された計 6 例については、すべての肺試料および血液試料において陰性であった。

非溺死例の計 14 例 (水に浸かった状態で発見された 3 例、衣服が水に濡れた状態で発見された 3 例、水辺付近で発見された 8 例) については、すべての肺試料および血液試料において陰性であった。

以上の結果から、解剖事例の検査試料においても、簡便に *Aeromonas* 属細菌を検出することが可能であり、極めて有用性の高い検査法であることが示された。

今後、さらに事例を追加した後、これらの結果をまとめ、国際誌に投稿する予定である。

また、殆どの事例について、左右の肺、腎臓、肝臓を用いて、従来の強酸 (発煙硝酸) による珪藻の検出を行い、珪藻の数及び種類を確認した。さらに、多くの事例について、選択平板培地を用いて、血液試料 (左心血、右心血、大腿静脈血) 中の生菌の検出・同定を行った。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。

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。

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 2 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

Sakai M, Biswas G, Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for detection and identification of aquaculture pathogens: current state and perspectives, *Appl Microbiol Biotechnol*, 98: 2881-2895 (2014).
DOI: 10.1007/s00253-014-5531-z.
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

柿崎 英二 (KAKIZAKI EIJI)
宮崎大学・医学部・准教授
研究者番号: 70284833

(2) 研究分担者

湯川 修弘 (YUKAWA NOBUHIRO)
宮崎大学・医学部・教授
研究者番号: 30240154

酒井 正博 (SAKAI MASAHIRO)
宮崎大学・農学部・教授
研究者番号: 20178536

(3) 連携研究者

園田 愛 (SONODA AI)
宮崎大学・医学部・助手
研究者番号: 10762122