

令和 2 年 6 月 28 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09268

研究課題名(和文) 溺死診断のためのTaqMan PCRを用いた水棲微生物の迅速な多検体同時検出法

研究課題名(英文) Simultaneous detection of multiple aquatic microbes using TaqMan PCR system

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：溺死は診断することの難しい死因の1つである。一般に溺死の診断は解剖によって得られる所見に加えて、各種検査所見(プランクトン検査・胸腔液電解質検査・死後画像診断・薬毒物検査等)、現場環境、病歴や診療記録、警察の捜査等を考慮し総合的に判断されている。しかし診断に苦慮する場合があります。新しい検査法の確立は診断精度の向上に急務である。そこでこの研究では診断精度のさらなる向上を目指して、珪藻類を簡便かつ迅速に検出するためのPCR検査法の開発に取り組んだ。本研究成果により診断精度の改善に繋がる新しい知見が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

海水域や淡水域など生息水域に限らず、一つのプライマーセットを用いて一括して珪藻類を検出可能な測定系の開発に取り組んだ。開発した測定系は珪藻以外の他の水棲微生物との交叉性(偽陽性)を示さず、検出限界は1～10 pg/tubと良好であった。ところで従来の珪藻検査から得られる結果の意義、特に肺以外の諸臓器や血液から得られる結果の意義については、世界中で意見が分かれ未だ解決には至っていない。本研究によって得られた成果はこの問題に対しいくつかの重要な示唆を与えることができたと考えている。今後も引き続き検討を重ねこの課題の解決に繋げたい。

研究成果の概要(英文)： We developed a new real-time PCR method to detect fresh and marine diatoms for diagnosis of drowning in various water environments. Present method was specific for various standard strains of fresh and marine diatoms (Achnanthes, Achnanthes, Achnanthes, Achnanthes, Achnanthes, Tabellaria, Ulnaria, etc. as fresh water diatoms; Eucampia, Odontella, Pseudo-nitzschia, Thalassionema, etc. as marine diatoms). The sensitivity of the method was >10 pg/tube. Moreover, the diatom DNAs were detectable in water samples collected from various water environments although they were undetectable in the blood and tissues (kidney and liver) from cadavers retrieved from the rivers and sea by the new method. These results gave us one of the reasons to prove our hypothesis that the diatom DNAs would be almost undetectable in blood and closed organs (kidney and liver).

研究分野：法医学

キーワード：溺死の診断 リアルタイムPCR 水棲微生物 珪藻 水棲細菌

1. 研究開始当初の背景

溺死は診断することの難しい死因の1つである。一般に溺死の診断は解剖によって得られる所見に加えて、各種検査所見(プランクトン検査・胸腔液電解質検査・死後画像診断・薬毒物検査等)、現場環境、病歴や診療記録、警察の捜査等を考慮し総合的に判断されている。しかし診断に苦慮する場合があります、新しい検査法の確立は診断精度の向上に急務である。

プランクトン検査として一般に活用されている方法に壊機法があり、強酸を用いて肺やその他の臓器を溶解し、水に棲む微生物である珪藻を検出する方法である。現在、水棲微生物を対象とした検査法の中で最も信頼されているのが壊機法である。しかし、検査手法が煩雑な上に極めて危険な94%発煙硝酸を加熱沸騰させて用いるなど、特に安全面に大きな問題を抱えている。また、腎臓や肝臓からの検出感度や特異性の低さも問題とされ、未だ改善されないままである。

ところで肺以外の組織から珪藻を検出できれば、溺水吸引の証明に有効である。これは水中で発見された死体であれば、死後でも水が肺に浸入すると考えられているためである。これまで我々は溺死の補助診断検査として、水棲細菌(*Aeromonas*, *Vibrio*, *Photobacterium*)を標的とした Multiplex TaqMan Real-Time PCR 法を開発した。この方法は簡便かつ迅速に検査が行えるだけでなく、従来の珪藻検査(壊機法)よりも肺以外の組織や血液でも高い陽性結果が得られた。そこで本研究では診断精度のさらなる向上を目指して、珪藻類も同時に検出可能な検査方法の開発を試みた。

2. 研究の目的

これまで我々は、溺死の補助診断検査として、水棲細菌を標的とした Multiplex TaqMan Real-Time PCR 法を開発し、解剖事例計43例を検査した結果、溺死例の80%において陽性(血液、腎臓、肝臓)であった。他方、水中ないし水辺近くで発見された非溺死例についてはすべて陰性であった。さらに、本法はイギリスのレスター大学病院(The East Midlands Forensic Pathology Unit; EMFPU)で実際に実務利用され、有効性が確認された[Rutty GN et al, Legal Med 2015, Int J Legal Med 2017]。このように、従来のプランクトン検査における陽性率を上まわり、プランクトン検査の代用ないしこれを補強する検査として有効であった。

そこで、本研究の目的は、診断精度のさらなる向上を目指して、珪藻類を検出する方法の開発を試みた。しかし、我々の目標とする検査法は簡便かつ迅速な溺死のスクリーニング検査法を開発することであり、従来行ってきた検査よりも必要とする時間や労力を可能な限り軽減しシンプルでなければならない。そこで、指標とする珪藻の対象は、種や属レベルに限定するのではなく、できる限り多くの珪藻を一括して検出することが望ましいと考えた。しかし、珪藻のみに共通するプライマー配列を設計し、さらに実際に他の水棲微生物に対して交叉性(偽陽性)を示さない配列を決定することは非常に困難であり、解析・設計・検討に多くの時間を要することが予想された。

3. 研究の方法

ターゲットとする珪藻の標的遺伝子としては葉緑体関連遺伝子(GAPDH, *rbcl*, *ndhF*, *tufA*, *matK*, *atpA*, *atpB*, *psbA*, *trnDYE*, *trnL-F*, *trnV*, *rpoA*, *rpoB*, *rpoC1*, *psaA*, *psaB*, *psbB*, *psbC*, *psbD*, *psbEFLJ*)などを中心に多くの既知配列を検討した。まず日本DNAデータベース(DDBJ)から各遺伝子の塩基配列情報を取得し、GENETYX-MAC Ver.20などのソフトウェアを用いてアライメント解析を行った。さらにBLAST(Basic Local Alignment Search Tool)を利用してデータベース上で特異性を確認した。さらにこれらの中から経験上成功する可能性の高いものから順次プライマーセットを作成し検証を重ねた。

各プライマーセットの検出感度や特異性を調べるためにNIES Collection(National Institute for Environmental Studies, Microbial Culture Collection)より珪藻の標準株(淡水性珪藻として*Achnanidium*, *Aulacoseira*, *Nitzschia*, *Tabellaria*, *Ulnaria*, 海水性珪藻として*Eucampia*, *Odontella*, *Pseudo-nitzschia*, *Thalassionema*など)を購入し、培養後、ゲノムDNAを抽出・精製した。珪藻からのDNA抽出・精製における至適条件も検討するため、珪藻殻の物理的破壊やタンパク質分解酵素、界面活性剤による抽出方法などについて検討した。また植物細胞からのDNA抽出においては、DNAの合成反応を阻害する物質も多く含まれることが知られている。そこでこれら阻害物質を除去する方法の検討も合わせて行った。さらに各プライマーセットの特異性を確認するために、上記標準培養株の珪藻やその他の細菌などとの交叉反応性を確認した。次に各標準株を用いて検出感度を決定した。開発した検出系を用いて、現場水や実際に壊機法による珪藻検査を行った事例に対して珪藻検出を試みた。

4. 研究成果

珪藻標準株の各培養液からゲノムDNAを抽出・精製するために、まず塩化ベンジル法を利用した。塩化ベンジル法は植物細胞からDNAを抽出する場合に効果的とされており、実際に収量は高く純度も良好であった。これに対してProteinase KやSDSを利用する一般的なシリカメンブレン法も試みたが、抽出過程で多量の油性成分が生じこれが影響したためか、収量や純度に低下がみられた。珪藻の細胞内にはポリフェノール類や多糖類などが多く含まれ、またシリカメンブレン法では塩化ベンジル法とは異なり有機溶媒による2層分離の工程がないため収量や純度に影

響したのではないかと考えられた。またポリフェノール類や多糖類などは PCR 反応を阻害することが知られている。しかし、我々の目的は、圧倒的に割合の多い動物組織（細胞）や血液に含まれる極わずかな割合の珪藻細胞を溶解することであり、まず動物組織や血液を溶かすことが大前提であるためシリカメンブレン法の方が効果的であると考えた。そこで塩化ベンジル法は珪藻標準株の DNA 抽出に限り使用することとした。このように植物プランクトンである珪藻 DNA を簡便・迅速に効率良く抽出すること自体、容易でないことが再確認された。また水棲細菌の抽出方法とも異なり同時検出のためには検査方法の簡便・迅速化においてさらなる検討が必要と考えられた。

培養した珪藻の中には、プレパラート上でカバーグラスをかけただけの操作で僅か 5 分程度の時間で表面張力によって珪藻の殻が容易に壊れたり (*Eucampia* sp.), 細胞内成分が漏れ出したりするもの (*Ulnaria delicatissima*) が観察された。但し、一方で極小さな珪藻など、細胞内成分は漏れ出だすものの、金属ビーズや金属クラッシャーを用いても容易には破壊されない種 (*Achnantheidium minutissimum*) も認めた。現時点において培養した珪藻株からの DNA 抽出は、金属クラッシャーを用いて物理的な力で外殻を破壊後、塩化ベンジル法でゲノム DNA を抽出・精製することが最も効果的と考えている。一方、血液や臓器中に含まれる珪藻からゲノム DNA を抽出・精製するには、同じく金属クラッシャーで珪藻の外殻を破壊後、タンパク質分解酵素 Proteinase K と界面活性剤 SDS を用いてヒトのゲノムを含め全ゲノムを抽出する方法が利便性を考慮して効果的であると考えている。しかしながら、珪藻の種類によっては、金属クラッシャーでの物理的破砕がゲノム DNA の収量にほとんど影響しないものも認めた。抽出方法において、もう少し検討に時間を要すると考えられた。

この他、珪藻培養液の遠心分離を行ってみると珪藻株ごとに遠沈管の壁面に吸着しやすい種 (*Achnantheidium minutissimum*, *Nitzschia palea*, *Eucampia* sp., *Pseudo-nitzschia* sp.) と、ほとんど吸着しない種 (*Aulacoseira granulata*, *Tabellaria flocculosa*, *Thalassionema nitzschioides*) がいるなど多様な性質も観察された。但し、これらの中には遠沈管の材質で解決できる種もみられた。また、群体を形成するような珪藻は沈みやすいが、単体で浮遊する小さな珪藻は沈みにくい傾向もみられた。活発に遊走する種 (*Nitzschia palea*, *Eucampia* sp.) も観察された。

また、どの珪藻株においても、培養液の凍結融解 (-80 , -30) に伴う珪藻殻の顕著な破壊は確認されなかった。即ち、組織試料を一度凍結しても壊機法による検査では明らかな影響は受けないことが示された。

環境水や珪藻から抽出される成分に対して、PCR 反応を阻害する成分を除去するためにカラム精製も追加し試みたが、明らかな効果は得られずこの操作は必要のないものと判断した。

各プライマーセットを検討した結果、培養したすべての珪藻の標準株を一括して検出可能なものをいくつか得られた。これらプライマーセットは、海水性や淡水性など生息水域に限らず、一つのプライマーセットで一括して検出することが可能であった。また海や河川などから採取した環境水から抽出した Total DNA に対しても増幅を確認できた。さらに、これまでに溺死体や非溺死体から検出されたことのある珪藻以外の水棲微生物 (*Vibrio*, *Photobacterium*, *Listonella*, *Aeromonas*, *Shewanella*, etc.) やその他の微生物 (*Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, etc.) との交叉性 (偽陽性) も認めなかった。加えてヒトゲノムとの交叉性も認めなかった。一方、検出限界は 1~10 pg/tube で珪藻の多くの属を一度に検出できるプライマーセットとして良好であった。この検出系を用いて、珪藻 DNA の検出を試みたところ、現場水からは珪藻 DNA を検出できたが、組織 (肝臓や腎臓) や血液から珪藻 DNA を検出することはできなかった。

この理由の一つとして考えられるのは、例えばキアゲンの代表的な DNA 抽出キット (DNA Mini Kit) は、動物組織の約 25 mg から約 20 μ g の Total DNA が得られるとされる。一般に 1 回の PCR で検査可能なテンプレート (鋳型 DNA) の最大濃度は 0.1 μ g までとされており、この濃度を超えるとたとえ優れたプライマーセットであっても極端に偽陽性や偽陰性を生じる可能性が高くなる。そこで、この上限の 0.1 μ g を基準に考えてみると、20 μ g の 1/200 量 (20 μ g/0.1 μ g) までしか 1 回の PCR で検査できない計算となり、これを組織量に換算すると 25 mg の 1/200 なので僅か 0.125 mg (25 mg/200) となる。つまり 1 回の PCR で調べることのできる組織量は僅か 0.000125 g である。これに対して従来の検査方法である壊機法は 1 g あるいは 2 g (PCR の 8000 倍あるいは 16000 倍の組織量) を一度に溶解しその中の珪藻を顕微鏡で確認できるため、検出感度は格段に高くなる。しかも顕微鏡で実際に珪藻を確認・撮影できるため、証拠としての効果・能力も高い。

ところで、我々の最近の解剖例 20 例の珪藻検査の結果について調べてみると、肺組織からは平均 3600 個/g 検出され (但し少ないものでは 1 g あたり 10 個程度や 100 個程度の場合もある), 現場水では平均 3000 個/mL であった。ここで肺の組織に着目し、上で算出した 1 回の PCR で調べる事のできる組織の上限 0.000125 g あたりの珪藻数を当てはめると僅か 0.45 個 (3600 個 \times 0.000125 g) となる。但し、これは最も効率良く DNA 抽出を行えた場合の理想値である事に加えて、ヒトの DNA や他の微生物 (主に細菌) の DNA が混在するテンプレート (鋳型 DNA) 中での検出であり、さらに死後経過時間ともなって DNA の分解は進み珪藻の DNA も減少していくため、検出はさらに困難となる。また水中死体は発見が遅れて高度に腐敗した状態で発見される場合も少なくない。その上珪藻の外殻は硝子と同じ成分からなり半永久的に保存されるた

め、水の中を漂う珪藻の中には既に死んでいてもそもそも DNA を含まないものも少なくない(壊機法では死んでいる珪藻と生きている珪藻は区別できず、それぞれ1個としてカウントする)。そして最も重要な問題は肺以外の腎臓や肝臓などからは壊機法において10gの組織あたり多くても数個しか検出できないことであり、計算上DNA検出ほぼ不可能なはずである。そしてこれは今回の我々の結果にも一致している。

以上を総合的に考えるとやはり珪藻の検出に関しては壊機法や酵素法を用いて1gないし2gの肺組織を溶解し、顕微鏡下で珪藻を確認する方が、検出感度や特異性の点からも最も適しているのではないかと考えられる。また顕微鏡観察では多様な珪藻を一度に観察できることも、水環境の現場の情報を得やすく適している。さらに実務検査であれば、検査にかかる費用についてもDNA検査よりはるかに安価に行うことができる。なお、腎臓や肝臓、血液からの珪藻検出の意義については現在別の新しい研究で検証中である。

国内外の法医学分野の論文やテキストの中には、珪藻DNAを指標とした検出法が紹介され、従来の壊機法と比べて検出感度の向上が期待できるとされている。しかし本研究で得られた成果によるとまだ完全に検証はできていないものの、珪藻のDNA検出が従来の壊機法と比較して、検出感度や特異性の点で本当に優れているのか疑問が残る。さらに、我々が行った壊機法(発煙硝酸)や酵素法(Papain)での顕微鏡観察(腎臓、肝臓、血液)の結果からもそれは考え難い。特に他の研究者の報告では腎臓や肝臓など肺以外の諸臓器からも珪藻のDNAを容易に検出できており、我々のこれまでの結果(肺以外の諸臓器からは検出できては珪藻しか検出されない)とは大きく異なっている。

溺死診断の分野において珪藻検査に関わる内容は重要なテーマであり、本研究により得られた上記の成果や新たな課題は今後さらに検討を続け明らかにしていかなければならない。また今回開発した珪藻DNAを検出する方法は、テンプレート濃度が高くなると偽陽性を生じる場合があり(但し偽陰性はみられない)、それを防ぐためにはPCRのサイクル数を25サイクルまでに抑える必要がある。また、検出対象とする遺伝子によってコピー数も異なるため、さらに慎重な確認を必要とする。このように検査法そのものの改良の余地もまだ残っており、引き続き研究を継続していく。なお、本研究で用いた方法の詳細や得られた結果の詳細は今後学術論文を通して明らかにしたい。

[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ものです]

【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.

【10】 Kakizaki E and Yukawa N. Simple protocol for extracting diatoms from lung tissues of suspected drowning cases within three hours: First practical application. *Forensic Science International* 251: 179-185 (2015).

【11】 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. 化学療法の領域 33: 143-151 (2017).

【12】 Kakizaki E, Sonoda A, Sakai M and Yukawa N. Simple detection of bacterioplankton using a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay: First practical approach to 72 cases of suspected drowning. *Forensic Science International* 289: 289-303 (2018).

【13】 Kakizaki E, Sonoda A, Shinkawa N and Yukawa N. A new enzymatic method for extracting diatoms from organs of suspected drowning cases using papain: Optimal digestion and first practical application. *Forensic Science International* 297: 204-216 (2019).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kakizaki E, Sonoda A, Sakai M and Yukawa N	4. 巻 289
2. 論文標題 Simple detection of bacterioplankton using a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay: First practical approach to 72 cases of suspected drowning	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Forensic Science International	6. 最初と最後の頁 289-303
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.forsciint.2019.02.008	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 新川慶明, 中野 敦, 柿崎英二, 林 里采, 園田 愛, 湯川修弘	4. 巻 4896
2. 論文標題 小児のボタン電池誤飲を防ぐために - 低電圧1.5Vのボタン電池でも組織傷害性アルカリは生成される	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本医事新報	6. 最初と最後の頁 20-22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 林 里采, 石田 康, 園田 愛, 新川慶明, 柿崎英二, 湯川修弘	4. 巻 61
2. 論文標題 覚せい剤 (メタンフェタミン) の法医学講義ノート	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 法医学の実際と研究	6. 最初と最後の頁 201-216
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 柿崎英二, 湯川修弘	4. 巻 33
2. 論文標題 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	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 化学療法の領域	6. 最初と最後の頁 143-151
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 湯川修弘, 園田 愛, 柿崎英二, 落合秀信	4. 巻 60
2. 論文標題 一酸化炭素中毒の法医学講義ノート(Haldaneの第一法則・第二法則)	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 法医学の実際と研究	6. 最初と最後の頁 219-235
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Hayashi S, Kakizaki E, Sonoda A, Shinkawa N, Shiragami T* and Yukawa N*	4. 巻 299
2. 論文標題 Acceleration effect of the forensic luminol reaction induced by visible light irradiation of whole human blood aqueous solutions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Forensic Science International	6. 最初と最後の頁 208-214
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.forsciint.2019.04.007	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*, Yamaguchi M, Ozaki M, Yukawa N	4. 巻 40
2. 論文標題 Neonatal Death Caused by Interrupted Aortic Arch Associated With 22q11.2 Deletion Syndrome: An Autopsy Case Report	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 American Journal of Forensic Medicine and Pathology	6. 最初と最後の頁 178-182
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/PAF.0000000000000454	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*, Sonoda A, Shinkawa N and Yukawa N*	4. 巻 297
2. 論文標題 A new enzymatic method for extracting diatoms from organs of suspected drowning cases using papain: Optimal digestion and first practical application	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Forensic Science International	6. 最初と最後の頁 204-216
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.forsciint.2019.02.008	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11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kakizaki E, Sonoda A, Shinkawa N, Yukawa N
2. 発表標題 A new enzymatic method for extracting diatoms from lung, kidney and liver tissues of suspected drowning cases using papain digestion: First practical application
3. 学会等名 24th Congress of the International Academy of Legal Medicine (IALM) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yukawa N, Shinkawa N, Sonoda A, Kakizaki E, Hayashi S
2. 発表標題 Autopsy of a body with discolored sun-exposed areas of skin, and a literature survey on postmortem suntan
3. 学会等名 24th Congress of the International Academy of Legal Medicine (IALM) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 湯川修弘, 新川慶明, 柿崎英二, 園田 愛, 林 里采, 小片 守
2. 発表標題 右手に笹の葉を硬く握った状態で発見され即時性死体硬直と思われた溺死の一解剖例
3. 学会等名 第68回日本法医学会学術九州地方集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 新川慶明, 柿崎英二, 林 里采, 園田 愛, 湯川修弘
2. 発表標題 ボタン電池の誤飲や嵌頓において, 低電圧1.5 Vの電池でも組織傷害性のアルカリが生成される理由について
3. 学会等名 第68回日本法医学会学術九州地方集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 柿崎英二, 小椋 義俊, 林 哲也, 湯川修弘
2. 発表標題 水中死体の肺及び血中に存在する水棲微生物の網羅的解析 (第2報) : 法医解剖32例のメタ16S解析
3. 学会等名 第101次日本法医学会学術全国集会 (岐阜)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 園田 愛, 柿崎英二, 酒井正博, 湯川修弘
2. 発表標題 溺死診断のためのLAMP法を用いた簡易検査法の開発 (第2報) : Vibrio属・Photobacterium属細菌の一括検出
3. 学会等名 第101次日本法医学会学術全国集会 (岐阜)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 湯川修弘, 園田 愛, 柿崎英二, 林 里采
2. 発表標題 一酸化炭素中毒の法医学講義ノート (Haldaneの第一法則・第二法則)
3. 学会等名 第67回日本法医学会学術九州地方集会 (那覇)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 園田 愛, 柿崎英二, 新川慶明, 湯川修弘
2. 発表標題 水棲微生物を指標とした溺死の補助診断法 : 最も少ない労力で検査を行うためのプロトコールの最適化
3. 学会等名 第103次日本法医学会学術全国集会 (仙台)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 新川慶明, 園田 愛, 松山美紀, 柿崎英二, 林 里采, 和田 啓, 湯川修弘
2. 発表標題 慢性硬膜下出血内に認められたヘマトイジン含有マクロファージと思われる黄色色素含有細胞
3. 学会等名 第103次日本法医学会学術全国集会(仙台)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林 里采, 白上 努, 柿崎英二, 新川慶明, 園田 愛, 湯川修弘
2. 発表標題 血液水溶液への可視光照射によるルミノール反応の加速効果
3. 学会等名 第69回日本法医学会学術九州地方集会(大分)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 新川慶明, 柿崎英二, 林 里采, 園田 愛, 湯川修弘
2. 発表標題 切断された遺体に骨化性筋炎を認め, 生前の暴行が疑われた一例
3. 学会等名 第69回日本法医学会学術九州地方集会(大分)
4. 発表年 2019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)	

6. 研究組織(つづき)

	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	園田 愛 (SONODA Ai) (10762122)	宮崎大学・医学部・助手 (17601)	
研究 協力者	新川 慶明 (SHINKAWA Norihiro) (40625836)	宮崎大学・医学部・助教 (17601)	