

平成 23 年 5 月 7 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590682

研究課題名（和文）高度に腐乱した水中死体でも溺死の推定が行える検査法の開発

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

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

研究成果の概要（和文）：特定の水棲細菌（*Aeromonas* 属，*Vibrio* 属，*Photobacterium* 属）を指標とした TaqMan-PCR 法による簡便かつ迅速な溺死の補助診断法の開発に取り組んだ。基礎実験によって、指標とする細菌に対して特異的検出が確認されたことから、実際の溺死例について血液試料や臓器試料を検査したところ、海水溺死 5 例の 100%、淡水溺死 8 例の 88%、河口周辺水域での溺死 2 例の 100%で、それぞれ肺以外のいずれかの試料においても陽性が得られた（肺は全て陽性）。今後、さらに検討を重ね、本法の有効性を明らかにする。

研究成果の概要（英文）：We determined some bacterioplankton as markers for diagnosis of drowning and tried to develop a new method using TaqMan-PCR: the genus *Aeromonas* (*A. hydrophila*, *A. salmonicida*), *Vibrio* (*V. fischeri*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*), *Photobacterium* (*P. damsela*, *P. phosphoreum*, *P. leiognathi*). We adopted the method of Triplex-PCR, which can detect three type of bacterioplankton simultaneously, and PCR was performed by 40 cycles using 7500 Real Time PCR System. Present method was specific for standard strains of above bacterioplankton. Moreover, bacterioplankton was detectable in blood or tissue from cadavers retrieved from the sea ( $n = 5$ ), rivers (fresh water,  $n = 8$ ), near estuaries ( $n = 2$ ) by the new method.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009 年度	700,000	210,000	910,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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，水棲細菌，分子生物学的手法

## 1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでに水中死体の血液を試験的に調べていくなかで、海水や河川水で溺死した死体の血液には、各々の水域に特徴的な水棲細菌が優勢的に存在していることを発見した。そしてそれら細菌種の構成は死後比較的長期間維持されており、死後に別の水域、例えば淡水域から海水域に流された場合でも維持されていることが示された。これは溺死の際、最初に血中に入った細菌群の中で少数の種類の細菌のみが血液中の栄養素を独占し枯渇させるため、その後、他の細菌が血液内に侵入しても容易に増殖できないことが理由ではないかと考えられた。これらの理由から、血中における水棲細菌の存在は、生前の溺水吸引の有無、並びに溺死した水域を推定するに役立つのではないかと考えた。

当教室において、これまでに平板培養により溺死例(海水・淡水)を検査した結果、高頻度に *Vibrio* 属、*Photobacterium* 属、*Aeromonas* 属などの水棲細菌が検出された。他方、溺死でない事例からはこれら水棲細菌は検出されず、本検査法の有用性が示唆された。しかしこの検査法は血液試料を平板培地で培養後、得られた bacterial colony から DNA を抽出し塩基配列を決定する方法であり、培養に約 1 日、遺伝子解析に 3-5 日程度を要した。さらにこの方法は生菌を対象としており、腐敗が高度になると生きていた水棲細菌は死滅、ないし顕著に減少する傾向が示された。また腐乱して血液が採取できなかつた例も少なくなかつた。

## 2. 研究の目的

そこで、水棲細菌の分子生物学的検出が可能であれば、簡便かつ迅速に水棲細菌の存在を確認でき、さらに腐敗により生菌として水棲細菌を検出できなくても、腐敗の初期及び中期で優勢となっていた死菌の DNA を検出できるのではないかと考えた。

本研究ではこれまでに我々の得た研究成果に基づき指標とする水棲細菌を選定し、溺死体の優勢種を特異的に検出するための分子生物学的検査法の開発を試みた。

## 3. 研究の方法

これまでの我々の研究成果、並びに本研究によって平成 20 年度及び 21 年度までに得られた研究成果 (*Legal Med* 2010, 12, 195-199; *Forensic Sci Int* 2011, 204, 80-87) に基づき、指標とする水棲細菌を決定し、TaqMan-PCR 法による簡便かつ迅速な溺死の補助診断法の開発に取り組んだ。

淡水性の細菌の指標としては *Aeromonas* 属 (*A. hydrophila*, *A. salmonicida*)、海水性の細菌の指標としては *Vibrio* 属 (*V. fischeri*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*) 及び *Photobacterium* 属 (*P. damsela*, *P. phosphoreum*, *P. leiognathi*) の細菌を選定した。

NBRC (NITE Biological Resource Center) より購入した水棲細菌の標準株上記計 8 種、及び陰性対照としてヒト常在菌等の標準株計 6 種 (*Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*) をそれぞれ平板培養し、そのコロニーから、DNA 抽出キット ISOPLANT (NIPPON GENE) を用いて DNA を抽出し、標準株 DNA とした。

日本データバンク (DDBJ: DNA Data Bank of Japan) から各細菌の標的遺伝子の塩基配列情報を取得し、GENETYX-MAC Ver. 15.0 (ゼネティックス) 及び Primer Express Software Ver. 3.0 (Applied Biosystems; ABI) を用いて解析後、BLAST 検索により特異性を確認し、Primer 及び TaqMan-Probe の設計を行った。各水棲細菌の標的遺伝子は、*Aeromonas* 属が aerolysin 遺伝子、gyrB 遺伝子及び fstA 遺伝子、*Vibrio* 属が katA 遺伝子、toxR 遺伝子及び vhh 遺伝子、*Photobacterium* 属が ureC 遺伝子、sodB 遺伝子及び luxA 遺伝子とした。各 Primer の Tm 値を約 60 に設定し、TaqMan-Probe は、それぞれ 3dye の蛍光色素 (FAM, NED, Cy5) で標識した。FAM 及び NED 標識の TaqMan-Probe は MGB 付加により Tm 値を約 70 に設定した。

1 試料当たりの PCR 反応は、3 種類の標的遺伝子を同時検出できる Triplex-PCR の手法を採用し、これを 3 セット (Triplex-Set A, Triplex-Set V, Triplex-Set P) 行った。

PCR 反応は ,TaqMan Gene Expression Master Mix (ABI) 及び 7500 Real Time PCR System (ABI) を用いて 40 サイクル行った Positive Control は VIC 標識の TaqMan Gene Exogenous Internal Positive Control Regent (ABI) を用いた . コントロール DNA は , それぞれ水棲細菌の標準株 DNA を 50ng/  $\mu$ l から 3 倍段階希釈して 8 段階希釈系列で検量線を作成した .

溺死体及び非溺死体の検査試料としては , 血液 ( 左心血 , 右心血 , 大腿静脈血 ) 及び諸臓器 ( 右肺下葉内部 , 左肺上葉辺縁部 , 腎臓 , 肝臓 ) を用いた . 血液試料は各 50  $\mu$ l , 臓器試料は各 1g を用いた . DNA の抽出は , DNA 抽出装置 BioRobot EZ1 ( QIAGEN ) を用いて , DNA 抽出キット EZ1 DNA Investigator Kit ( QIAGEN ) により自動抽出した .

#### 4 . 研究成果

水棲細菌用に各々設計した Primer 及び TaqMan Probe を用いて , 特異性を検証した .

始めに標準株 DNA を用いて Single-PCR で増幅を確認したところ , 溺死の指標として選定した標準株 8 種は , いずれも目的の細菌 DNA のみ特異的に増幅が認められた . 検出感度は , いずれも DNA 約 1pg/  $\mu$ l であった .

次いで , Multiplex PCR による PCR 反応を検討したところ , Multiplex-Set A ( *Aeromonas* 用 : *A. hydrophila* , *A. salmonicida* ) , Multiplex-Set V ( *Vibrio* 用 : *V. fischeri* , *V. harveyi* , *V. parahaemolyticus* ) , Multiplex-Set P ( *Photobacterium* 用 : *P. damsela* , *P. phosphoreum* , *P. leiognathi* ) で , いずれも目的とする水棲細菌の特異的増幅が確認された . 他方 , これまでに非溺死例から検出されたヒト常在菌等の標準株 6 種に対して , 非特異的増幅がないかを検討したところ , いずれも正しく判定できることが確認された . さらに , 水棲細菌の標準株を用いた PCR 増幅産物について , シークエンス解析を行った結果 , 目的の配列が正しく増幅されていることが確認された .

次いで , 実際の溺死 15 例 ( 海水溺死 5 例 , 淡水溺死 8 例 , 河口周辺水域で発見された溺

死 2 例 ) について血液試料 ( 左心血 , 右心血 , 大腿静脈血 ) 及び臓器試料 ( 右肺下葉内部 , 左肺上葉辺縁部 , 腎臓 , 肝臓 ) を対象に検査を行ったところ , 全例において , 左右の肺組織から指標とするいずれかの水棲細菌が検出された . また海水溺死の 100% , 淡水溺死の 88% , 河口周辺水域での溺死の 100% で , それぞれ肺組織以外の試料においても水棲細菌が検出され , 本検査法の有効性が示唆された .

本検査は 3 種の標的遺伝子を同時検出可能な Triplex-PCR を 3 セット用いて , Real-Time PCR を行うことで , 簡便に且つ検査時間を大きく短縮できた . 試料の DNA 抽出から結果が得られるまで僅か 5~6 時間程度であり , 淡水または海水由来の水棲細菌を溺死体から効率的に検出することが可能であった . また従来の珪藻検査及び平板法の結果とも特に矛盾しなかった .

水棲細菌遺伝子の検出感度は , 少なくとも 1pg/  $\mu$ l 以上 , 平板法では細胞 1,000 個以上認められた試料について確実に検出可能であった . また , 比較的高度に腐敗した試料でも判定可能であった . 血液試料では左心血が最も検出感度が高い傾向が示された . またいずれの血液試料についても陰性であった事例でも左右の肺組織では陽性であった . このように一般に死後に水の侵入が困難とされる肺の辺縁部の組織試料からは全例で陽性の得られたことは , 従来の珪藻検査の結果と合わせて考慮すると溺水の吸引を示唆する重要な所見として有用であると思われる .

ところで , 新鮮な溺死体における血液試料から水棲細菌が検出できなかった理由については , 死後経過時間や水温 , 気温 , 水の水質 , 溺水の吸引量などが影響し , 血中での水棲細菌の増殖が不十分 , あるいはすべて死滅したためではないかと考えられた .

本法は , リアルタイム PCR 装置を用いて , 複数の目的遺伝子を同時に , かつ迅速に検出可能な方法 ( Multiplex-PCR ) である . また血液及び諸臓器からの DNA の抽出・精製は自動抽出装置 BioRobot EZ1 ( QIAGEN ) を用いて自動で迅速に行っている . このため , 従来の珪藻検査の結果が得られる前に , いち早く溺水吸引の有無や , 溺死した場所 ( 海水・淡水・

汽水)が示唆され、警察の犯罪捜査にも大きく貢献し得ると考えられる。

以上の結果から、従来の珪藻検査に加えて、本法を行うことは溺死の迅速な補助診断法として有効と考える。今後、さらに検討を重ね、本法の有効性を明らかにする。

#### 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)

E. Kakizaki, S. Kozawa, H. Matsuda, E. Muraoka, T. Uchiyama, M. Sakai, N. Yukawa, 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. 査読有。

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

[学会発表](計3件)

柿崎英二、小澤周二、田代敬子、湯川修弘：発光細菌の検出が有用であった汽水域での溺死2例。第92次日本法医学会総会。*日本法医学雑誌* .2008.4.25; 62(1): p97, 長崎。

柿崎英二、小澤周二、内山岳人、湯川修弘：水の塩濃度と水棲細菌の種類。第93次日本法医学会学術全国集会。*日本法医学雑誌* . 2009.5.14; 63(1): p78, 大阪。

内山岳人、柿崎英二、小澤周二、湯川修弘：水棲細菌を指標としたMultiplex-PCR法による溺死の補助診断法の検討：腐乱死体

への応用を目指して。第94次日本法医学会学術全国集会。*日本法医学雑誌* . 2010.23-25; 64(1): p81, 東京。

[その他]  
ホームページ等  
なし

#### 6. 研究組織

##### (1)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

##### (2)研究分担者

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

小澤 周二 (KOZAWA SHUJI)  
宮崎大学・医学部・助教  
研究者番号：20379944

##### (3)連携研究者

なし

##### (4)研究協力者

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)