

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 11 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590854

研究課題名(和文)珪藻のDNA-binding特性を利用した溺死診断法の開発

研究課題名(英文)Development of the methods for the Diatom tests utilizing DNA binding ability of frustule

研究代表者

瀬尾 泰久 (Seo, Yasuhisa)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：80187830

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：溺死の診断に利用される壊機法は、優れた方法であるものの多くの問題点も指摘されてきた。本研究では、珪酸質よりなる珪藻被殻の特徴に着目した溺死診断法の開発を試みた。二酸化ケイ素を含むガラス質のものは、カオトロピックイオンの存在下でDNAと非特異的に吸着する性質を有することから、この性質を利用して、シリカコート磁気ビーズに被殻をトラップし、夾雑物を除く精製方法を開発した。溺死した死体の心臓内血液に混じた珪藻を、自己のDNAに吸着させた後、DNAの沈殿として回収する方法を開発した。また、珪藻被殻を酵素染色して観察する方法を確立した。今後、新たな溺死の診断法として期待される成果を得た。

研究成果の概要(英文)：We have focused on the DNA-binding abilities of the diatom frustule, which is constructed of silica, in the presence of chaotropic ions, in an attempt to devise a better forensic test for diatoms. It is proved possible to capture diatoms via lambda DNA using silica-coated magnetic beads followed by isolation and purification from the Mag beads.

For purification of diatoms from the blood, DNA binding ability of diatom frustule in the presence of chaotropic agent was utilized. The procedure is basically same as commonly used method for DNA purification from the blood as Proteinase K treatment and denaturation using chaotropic agent. Under this condition, the DNA adsorbed to the diatom and formed DNA/diatom complex. DNA/diatom complex was simply recovered ethanol precipitation and then the DNA was fragmented using DNase. we also developed and evaluated a method for staining diatoms that exploits the DNA binding ability of silica.

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：溺死 プランクトン 珪藻 DNA

## 1. 研究開始当初の背景

従来、法医学における溺死診断法の一つとして、壊機法による珪藻類プランクトンの検出が行われてきた。しかし、この方法は、肺以外の臓器ではその密度の低さから検出が困難である場合が多いことに加え、炭粉や脂質などの残存夾雑物の存在や、珪藻被殻がガラス質であるためプレパラート上での観察が難しいなど、多くの問題点が指摘されている。

これらの問題を解決するためにこれまで数多くの研究が行われてきたが、申請者自身も、溺水中に含まれる微小異物を検出証明する新たな溺死診断法の研究に従事してきた実績がある。これまでに、溺水中に含まれるバクテリアなどの微生物を主要臓器や血液中から培養証明する方法 (Kakizaki E, Takahama K, Seo Y et al. Forensic Sci Int 2008)、肺に特異的に存在するサーファクタントプロテインDをマーカーとしたサンドイッチ酵素免疫測定法 (Kamada S, Seo Y et al. Forensic Sci Int 2000) などについてその成果を報告し、実際の溺死診断法として有用であることを明らかにしてきた。

しかし、上に述べた珪藻類以外の微小異物の証明法は、優れた方法ではあるもののその手法における特殊性が高く、特定の機関でしか実施できない汎用性に欠けるものであったため、いまだ各機関に広く取り入れられるまでには至っていないのが現状である。

そこで今回、我々は、壊機された珪藻類を簡便に、より高精度に検出する方法の開発を試みることにした。珪藻類のもつ最大の特徴は、珪酸質よりなる被殻を有し優れた耐酸性を持つことであり、第一に壊機法はこの特性を利用した検出法である。我々は、この珪酸質の被殻がもつもう一つの特徴に注目した。二酸化ケイ素 (SiO<sub>2</sub>) を含むガラス質のものは、古くからカオトロピックイオンの存在下で、DNAや一部のタンパク質を非特異的に吸着する性質を有することが知られていた。さらに、この吸着は、水などの極性の高い環境下で容易に解離する特性をもつ。最近では、グラスファイバーを固相として使うDNAの精製法が開発され、多くのDNA抽出キットにこの基本原理が応用されている。今回我々は、ガラス質の持つこれらの基本原理は、珪酸質でできている珪藻類の被殻にもそのまま当てはまるであろうと考え本研究の着想に至った。

## 2. 研究の目的

本研究は、溺死の診断に汎用される壊機法による珪藻の検出に関し、現行の方法より高精度且つ高感度な検出法を開発することを目的とする。珪酸質である珪藻類の被殻にカオトロピックイオンの存在下でDNAを結合し、結合したDNAを形態学的、分子生物学的に検出することによって珪藻の存在を証明することが本研究の原理である。形態学

的な検出法として、被殻に結合したDNAを蛍光色素などで染色し顕微鏡下における観察を試みる。

## 3. 研究の方法

(1) 珪藻被殻の DNA binding 特性を利用した珪藻検出法の改良

### ①シリカビーズとDNAの反応性

シリカビーズ (磁性ビーズ) をモデルとして用い、珪酸質が有する DNA binding 特性に DNA の種類が影響するかを確認した。材料は、塩基数の異なる 3 種類の DNA (Salmon sperm DNA、Lambda DNA、human DNA)、吸着 buffer としてカオトロピックイオンを含む 4M グアニジン塩酸塩溶液を使用した。方法は、各 DNA に前記吸着 buffer とシリカビーズを入れ DNA を吸着させた後、上清を除いた。次に同 buffer で 1 回、70%エタノールで 2 回洗浄し、最後に滅菌水に DNA を溶出した。

### ②DNA 吸着実験

DNA の種類が与える影響が珪藻被殻でもあてはまるかを確認した。材料は、Salmon sperm DNA、吸着 buffer としてカオトロピックイオンを含む 4M グアニジン塩酸塩溶液、川で採取した珪藻を使用した。DNA に吸着 buffer と珪藻を入れ DNA を吸着させた後、上清を除いた。次に同 buffer で 1 回、70%エタノールで 2 回洗浄し、最後に滅菌水に DNA を溶出した。

### ③染色性の確認

珪藻被殻に Salmon sperm DNA を結合させ DNA 染色 (銀染色、ヌクレアファーストレッド染色、Mupid<sup>®</sup>-blue) を行った。材料は、珪藻、吸着 buffer としてカオトロピックイオンを含む 4M グアニジン塩酸塩溶液、Salmon sperm DNA を使用した。方法は各染色法に従って行った。

### ④珪藻被殻の精製方法

Lambda DNA を吸着させたシリカビーズで珪藻をトラップする方法を試みた。材料は、珪藻 (原液を 100~10000 倍希釈したもの)、吸着 buffer としてカオトロピックイオンを含む 4M グアニジン塩酸塩溶液、Lambda DNA、シリカビーズを使用した。方法は、Lambda DNA、吸着バッファー、珪藻、シリカビーズを同じチューブに入れ図 1 のように珪藻をトラッ



図1 ビーズトラップ (模式図)

プした。その後、同 buffer で 1 回、70%エタノールで 2 回洗浄し、最後に滅菌水を加え珪藻を遊離した。

## ⑤溺死例からの珪藻検出

実際の溺死例 (n=5) の臓器を使用し、上記の方法で珪藻の検出を行った。

(2) DNA との共沈作用を利用した心血からの珪藻検出法

### ①標本

司法解剖時に溺死 2 例、非溺死 1 7 例の死体の心臓内より血液を各 10ml 採取した。このうち、溺死 8 例については左右の心室内血液を別々に採取した。採取した血液は、使用するまで凍結して保存した。

本研究は、大分大学医学部の倫理委員会の承認を得て行った。

### ②検出手順

解凍した 5ml の血液に 35ml の純水を加え、激しく振盪混和した後 700xg で室温 20 分間遠心した。次いで、約 5ml を残し、上清を吸引除去した。さらに、2.5% SDS 溶液を 35ml 加え、激しく振盪混和し 700xg で室温 20 分間遠心した。約 1ml を残して上清を吸引除去し、残渣を 1.5ml のマイクロチューブに移した後 17700xg で 2 分間遠心した。沈渣を含めた 100  $\mu$ l の溶液を残し、上清を吸引除去した。

次いで、この遠心残渣に DNA エキストラクター FM キット (和光純薬工業社) に付属する溶解液 200  $\mu$ l、酵素活性化溶液 20  $\mu$ l、プロテアーゼ K (10mg/ml) 20  $\mu$ l を各加え、振盪混和後 56°C の恒温槽内で 0.5 時間から 16 時間インキュベーションし沈渣を完全に溶解した。

本溶解液にカオトロピックイオンとして 200  $\mu$ l の 6M グアニジンチオシアン酸塩溶液を加えた後、0.7ml のイソプロパノールを加え、振盪混和し 17700xg で 4°C、10 分遠心し DNA/珪藻複合体の沈殿を得た。肉眼的に DNA の沈殿が確認できない場合は、アンカーとして 3.5  $\mu$ l (0.7  $\mu$ g/ $\mu$ l) の  $\lambda$  DNA を添加した。

沈殿した DNA/珪藻複合体は、70%エタノールで 2 回洗浄した後、70°C、10 分間加熱乾燥した。その後、DNA/珪藻複合体中の DNA を溶解するために 150  $\mu$ l の純水を加えるとともに 10mg/ml の DNase 1  $\mu$ l を加え、37°C、1 時間インキュベーションした。

インキュベーション後の溶液をカバーグラスに滴下し、200°C、20 分間乾燥後、マウントメディア (和光純薬工業社) を使って封入した。

### ③添加回収実験

10  $\mu$ l あたり 30~60 個程度になるよう調整した淡水性または海洋性の珪藻溶液を、非溺死例 (n=15) から採取した心血 5ml に添加後、上記の方法を用いて標本作製した。その後、顕微鏡下で観察し、検出された珪藻の個数を添加水中の珪藻個数と比較し、回収率を算出した。

### ④溺死例からの珪藻検出

溺死例から採取した心血 5ml を使い、上記の方法を用いて標本作製し、各事例から検

出された珪藻の個数をカウントした。このうち 14 例については左右心室の血液を一括して採取したのを使い、8 例については左右心室内の血液を分けて採取したものを材料とした。

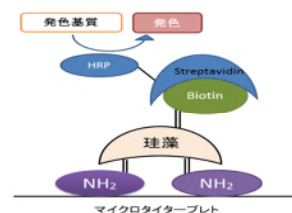
(3) 珪藻被殻の DNA-binding 能を利用した染色法の開発

### ①染色方法

あらかじめカルボキシル基が導入されたマイクロタイタープレートを使用した。そこへ、アミノ基を導入した PCR フラグメントを固相へ共有結合させ、カオトロピックイオン存在下で珪藻を DNA へ結合させる一次反応を起こした。さらにカオトロピックイオン存在下でビオチン標識 PCR フラグメントを珪藻に結合させる二次反応を起こした。ついでペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを 30%エタノールで 300 倍希釈し、ビオチンと結合させる三次反応をおこなった。70%エタノールで 3 回洗浄後、AEC 基質 (ニチレイバイオ社) を使って発色した後、CC マウント (DBS 社) で封入したものを顕微鏡下で観察し、染色された珪藻の検出を行った (図 2 参照)。

図 2 珪藻染色法の概略

アミノ基を導入した PCR フラグメントとビオチン標識 PCR フラグメントで珪藻をサンドイッチしペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンと反応後、発色基質を加え珪藻を染色する。



### ②添加回収実験

100  $\mu$ l あたり 90 個程度になるよう調整した淡水性または海洋性の珪藻溶液をマイクロタイタープレートに添加し、上記の方法を用いて珪藻を染色した。その後、顕微鏡下で観察し、検出された珪藻の個数を添加水中の珪藻個数と比較し、回収率を算出した。

### ③固相化する PCR フラグメント量の検討

固相化する PCR フラグメントの量によって回収率がどのように変化するかについて検討した。固相化する PCR フラグメントの量を 0.1~1.6nmol/ $\mu$ l として固相化し、添加回収実験における、回収率の違いを求めた。また一度固相化したフラグメント溶液の上清を再利用し、同様に PCR フラグメント濃度の与える影響を考察した。

### ④固相化する PCR フラグメントサイズの検討

固相化する PCR フラグメントのサイズ (300bp, 1kbp)、さらに、一本鎖又は二本鎖フラグメントによって回収率に違いはあるのかについて検討した。PCR フラグメントは、DNA を固相に結合させる前に、98°C に加温した後に、氷冷して二本鎖から一本鎖へと変性させた。

### ⑤溺死例からの珪藻検出



実際の溺死例(n=3)の臓器を使用し、上記の方法で珪藻の検出を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 珪藻被殻の DNA binding 特性を利用した珪藻検出法の改良

##### ①シリカビーズと DNA の反応性

ビーズと反応後の上清を電気泳動した結果、3種類の DNA とともにシリカビーズに吸着したことがわかった。続いて溶出液を電気泳動した結果、Salmon sperm DNA のみ溶出されなかった。つまり Salmon sperm DNA はシリカビーズに対し不可逆的に結合することが確認された。

##### ②DNA 吸着実験

珪藻被殻と反応後の上清と溶出液中の Salmon sperm DNA を吸光度定量したところ、吸着はしているが溶出されていないことがわかった。以上のことから、Salmon DNA は珪藻に対しても不可逆的に結合することが確認された。

##### ③染色性の確認

各 DNA 染色法により珪藻に吸着させた DNA を染色することができた。しかし、問題点として染色感度が低いことと操作ステップの煩雑さが挙げられた。

##### ④珪藻被殻の精製方法

珪藻液を 10000 倍希釈すると、希釈液 40  $\mu$ l 中に珪藻が数個程度になった。その希釈液からも珪藻を検出することができた。また、段階的な希釈倍率に従い 10 分の 1、100 分の 1 になっており、確実に珪藻をトラップできていることが確認できた。

##### ⑤溺死例からの珪藻検出

溺死例について本法を適応した結果、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓全ての臓器から珪藻が検出された。さらに、ビーズの洗浄操作により、脂肪や炭粉の少ない検鏡しやすい標の本作製にも成功した(表2 参照)。

表2 本法を使った溺死例からの珪藻検出

Case	Number of diatoms (Centrales/Pennales)				
	Mag beads purification				
	Lung	Heart	Liver	Spleen	Kidney
1	100< (6/94)	5 (2/3)	3 (0/3)	2 (0/2)	2 (0/2)
2	100< (9/91)	14 (1/13)	4 (0/4)	2 (0/2)	3 (0/2)
3	100< (80/20)	11 (9/2)	7 (5/2)	14 (11/3)	3 (2/1)
4	100< (62/38)	4 (2/2)	1 (1/0)	N.D.	N.D.
5	100< (40/60)	1 (0/1)	6 (2/4)	3 (1/2)	1 (1/0)

Not detectable.

(2) DNA との共沈作用を利用した心血からの珪藻検出法

##### ①添加回収実験

非溺死例の心血からは、珪藻非添加の状態でも 17 例中 3 例から、各 1 個の珪藻が検出された。これらの血液に珪藻を添加後本法に

より検出された珪藻の回収率を求めたところ、88.4~100%と算出され、血液中に添加された珪藻はほぼ完全に回収されていることが明らかとなった。

##### ②溺死例からの珪藻検出

22 例の溺死例から採取した心血中から本法を用いて珪藻の検出を試みたところ、すべての事例から珪藻が検出され、その平均は  $7.8 \pm 5.8$  個であった(表3)。また、左心室内の血液から検出された珪藻の数は、右心室のものより約 2 倍多いことが明らかとなった(表3 参照)。

表3 本法を使った溺死体心臓血からの珪藻検出

Case No.	Number of diatoms		
	Combined	Left	Right
D-1	9		
D-2	2		
D-3	9		
D-4	4		
D-5	6		
D-6	10		
D-7	7		
D-8	7		
D-9	6		
D-10	12		
D-11	1		
D-12	9		
D-13	17		
D-14	23		
D-15		1	ND
D-16		12	8
D-17		2	2
D-18		8	5
D-19		2	ND
D-20		17	4
D-21		1	2
D-22		6	3
Mean $\pm$ SD	7.8 $\pm$ 5.8	6.1 $\pm$ 5.9	3.0 $\pm$ 2.7

(3) 珪藻被殻の DNA-binding 能を利用した染色法の開発

##### ①添加回収実験

固相化する PCR フラグメントの濃度は 0.1 ~ 1.6nmol/ $\mu$ l の間でも回収率に大きな違いは認められなかった。しかしながら、濃度が高いと背景が沈着物で汚れ珪藻の検出が困難であったため、最適条件として 0.2nmol/ $\mu$ l の濃度を設定した。また、この沈着物は DNA の溶解残渣であると考えられた。

PCR フラグメントは短鎖、且つ、二本鎖フラグメントの方が、回収率が良いことがわかった。

##### ②溺死例からの珪藻検出

溺死例 3 例の心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓全ての臓器から珪藻が検出され、染色することができた。従来の方法と比べて、コントラストがしっかりしていて、背景も不純物が少なく見やすい標本となった(図3 参照)。



図3 染色されたクチビル珪藻

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

① Yasuhisa Seo, Daisuke Ichida, Shingo Sato, Kohji Kuroki, Tetsuko Kishida, An Improved method for the diatom test utilizing DNA binding ability of silica. Journal of Forensic Sciences, in press (査読あり)

DOI: 10. 1111/1556-4029.12390

② Yasuhisa Seo, Shingo Sato, Kohji Kuroki, Tetsuko Kishida, A simple coprecipitation method for the detection of diatoms in heart blood. Forensic Science International, 232, 2013, 154-159 (査読あり)

[www.elsevier.com/locate/forsciint](http://www.elsevier.com/locate/forsciint)

〔学会発表〕(計3件)

① 中路 伸也、岸田 哲子、瀬尾 泰久、黒木 浩二、DNA binding 特性を利用した珪藻被殻のサンドイッチ染色法、日本法医学会九州地方会、2013年10月18～19日、九州大学(福岡)

② 佐藤 伸悟、岸田 哲子、瀬尾 泰久、黒木 浩二、心臓血からの珪藻簡易検出法、日本法医学会九州地方会、2012年10月12～13日、熊本大学(熊本)

③ 一田 大輔、瀬尾 泰久、黒木 浩二、岸田 哲子、珪藻の DNA binding 特性を利用した溺死診断法の改良について、日本法医学会九州地方会、2011年10月7～8日、長崎大学(長崎)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

瀬尾 泰久 (SEO, Yasuhisa)  
大分大学・医学部法医学講座・助教  
研究者番号：80187830

### (2) 研究分担者

岸田 哲子 (KISHIDA, Tetsuko)  
大分大学・医学部法医学講座・教授  
研究者番号：50136793

内田 智久 (UCHIDA, Tomohisa)  
大分大学・医学部法医学講座・助教  
研究者番号：70381035