

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460870

研究課題名(和文)細菌感染死亡者からの解剖後の起炎菌同定に関する研究

研究課題名(英文) Postmortem bacteria analysis of deaths due to sepsis

研究代表者

池田 典昭 (IKEDA, NORIAKI)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60176097

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：無菌的に実験動物の血液、鼻孔内ぬぐい液、咽頭ぬぐい液、左右肺切開面ぬぐい液を採取し、細菌培養を行った結果、無菌的な各試料の採取方法が確立できた。左右肺の組織切片を作成し、細菌の死後感染と生前の感染の選別を試みたところ、グラム陰性桿菌の肺への感染において、興味ある知見が得られた。ジェネティックアナライザーを用いて横行結腸内容の細菌DNAの分析、肺炎における肺ぬぐい液についても同様の試みを行ったところ、一部の細菌感染では、起炎細菌の同定が可能であり、血液培養を行わなくとも、ジェネティックアナライザーを有効に活用することによって敗血症においても真の起炎細菌の同定が可能になることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We collected the swab of nose, pharinx and both lung, and then did the cultivation of bacteria. An aseptic collecting method of these samples was established. The histopathological examination of infeced lung for the purpose of distinction between beore and after death revealed that the infection of gram negative vacteria might effect the outbreak of sepsis. After that, we used the genetic analyzer for the analysis to bacterial DNA of blood, lung swab and feces of large intestine. This method using genetic analyzer is useful for the diagnosis of sepsis.

研究分野：法医学

キーワード：敗血症 法医解剖 細菌感染 腸内細菌 死後変化

1. 研究開始当初の背景

- (1) 病院内における感染症では血液やその他の試料からの細菌培養や DNA 分析によってその起炎菌を同定してきた。しかし死亡直前まで起炎菌の同定が不可能であったり、急激な感染の広がりによりショック状態に陥って死亡したり、長期入院患者で、終末期に同定されていた起炎菌とは別の細菌感染によって死亡することも多々ある。
- (2) 法医解剖例では生前の感染が疑われても血液培養がなされていなかったり、その情報の入手が困難であったりする事が多い。そのため死後の解剖およびその後の検査によって起炎菌を同定し感染症や敗血症の診断をする必要がある。
- (3) 動物実験に関する手技については、従来よりイヌ、ウサギ、ラットを用いた実験を繰り返し行っており、実験動物の扱いには十分な経験があり、敗血症に至る間の動物実験は容易である。また、動物生存中の血液生化学検査、死後の全身臓器の薬物分析についても十分な経験がありその評価も正確に行う事ができる。

2. 研究の目的

- (1) 病院内における長期入院患者はその終末期には様々な感染症に罹患し、その感染症やさらに進んで敗血症により死亡することがある。また最近の医療事故、医療過誤事例の中には過失が疑われる行為があった後さらに、MRSA のような多剤耐性菌の病院内感染を起こし死に至ったのではないかと疑われる例がある。そのような例では、病院による二重の過失なのかあるいは死亡と最初の過失行為の間には直接の因果関係がないのかを法医解剖によって明らかにする必要があり、そのためには起炎菌の同定が求められ、それが必須となることがある。さらに法医解剖においては、高齢者社会を迎えたことによる老人の孤独死あるいは小児虐待の多発に伴う子供の死亡例等で、解剖時感染症や敗血

症がその直接死因として疑われることが増えており、その際には起炎菌の同定が必須である。従来、入院患者の感染症あるいは病院内における感染症では血液やその他の試料からの細菌培養や DNA 分析によってその起炎菌を同定してきた。しかし死亡直前まで起炎菌の同定が不可能であったり、急激な感染の広がりによりショック状態に陥って死亡したり、長期入院患者で終末期に同定されていた起炎菌とは別の細菌感染によって死亡することも多々ある。また法医解剖例では生前の感染が疑われても血液培養がなされてなかったり、その情報の入手が困難であったりする事が多い。そのため死後の解剖およびその後の検査によって起炎菌を同定し感染症や敗血症の診断をする必要がある。この死後の起炎菌の同定による感染症の診断は生体と同様に解剖時に採取した血液やその他の試料の培養を行うとともに、病理組織学的に細菌感染があることを証明し、その感染病巣を特定して行ってきた。また全身の詳細な病理組織学的検査によりその感染程度、敗血症の有無を判断し、最終的に感染症が直接の死因であるか否か特定してきた。

- (2) 一方、解剖時の試料には死後変化のために多彩な細菌の混入が避けられず、必ずその影響が加わっており、また解剖における試料採取では無菌的な試料の取扱いは難しく、どうしても他の細菌の混入が避けられない。そのため死因となった感染細菌の正確な同定は非常に困難であり、ほとんどの例で不成功に終わるかあるいは同定された細菌も死因の特定にあたっては参考程度にしか利用されないのが現状である。このため諸外国では敗血症が疑われる症例においても、法医解剖後は感染細菌の同定は最初から行わず、免疫染色等を用いた病理組織学的診断のみで診断しようとする試みが一般的となっている。しかしながら病理組織学的所見の評価は個人によって差があり、起炎菌の同定がなされていないな

かでの死因判定では、感染時期の特定が不可能であり、多剤耐性菌感染による死亡例のように種々の紛争が起こる可能性のある敗血症への対応としては不十分と言わざるを得ない。

(3) そこで本研究では法医解剖死体で、死後に血液だけでなく感染臓器から直接無菌的に試料を採取する方法を確立すると共に、炎症性疾患による死亡患者からの死後における確実な起炎菌の同定を可能にし、病理組織学的所見と併せて正確な死因判定をすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) まず実験動物の気管内に細菌混入液を注入することによって、気管支肺炎を発症させ、全身感染に至らせ敗血症動物を作成する。ポリグラフ（現有）により、実験動物の病態の変化を感染直後から敗血症完成時、その後一定時間（ショックによる死亡時まで）観察する。その際病態の変化に応じて経時的に採血し、血清中感染関連因子を測定する。

(2) 死後の解剖時、皮膚面の無菌的切開法について検討し、無菌的開頭法、胸腔、腹腔の無菌的切開法を完成させ、心臓血、末梢血、肺、肝臓、腎臓やその他の臓器実質内液体成分の無菌的採取法を完成させる。

(3) 各採取資料から DNA 分析を行い、細菌同定を行うと共に、各臓器の病理組織学的検査を行い、同定した起炎菌の果たす役割と敗血症の程度について検討し、死因について考察する。

(4) 以上の手法を実際の法医解剖死体に応用し、感染症で死亡した例において起炎菌を同定すると共に、死因がその起炎菌による感染症に基づく敗血症であることの証明法を確立する。

4. 研究成果

(1) 研究計画に沿って、ラットを用いて肺炎感染症を作成し、死亡直後および一定時間恒温環境下に放置し、実験材料とした。各ラッ

トよりできる限り無菌的に血液、鼻孔内ぬぐい液、咽頭ぬぐい液、左右肺切開面ぬぐい液を採取し、細菌培養を行った。

その結果、無菌的な各試料の採取方法は確立できた。しかしながら、培養した細菌に多様性が見られ、どれが敗血症あるいは死亡の原因となった細菌かの同定が容易でなかった。特に、死後経過時間が数時間を超えた実験動物では、死後感染ないしは常在菌の死後全身への拡散による修飾のため、検出された細菌の評価が難しかった。

(2) そこで左右肺においては組織切片を作成し、従来の染色に加え、各種細菌染色を追加し、細菌の死後感染と生前の感染の選別を試みたところ、グラム陰性桿菌の肺への感染において、興味ある知見が得られた。実際の法医解剖例への応用を試みたが、解剖時の試料には死後変化のために多彩な細菌の混入が避けられず、必ずその影響が加わっており、また解剖における試料採取では無菌的な試料の取り扱いは難しく、どうしても他の細菌の混入が避けられない。そのため死因となった感染細菌の正確な同定は非常に困難であり、ほとんどの例で不成功に終わるかあるいは同定された細菌も死因の特定にあたっては参考程度にしか利用できなかった。

(3) そこでさらに、解剖時の試料を用いて感染細菌の同定を行うための予備実験として、ジェネテックアナライザーを用いて横行結腸内容の細菌 DNA の分析を行い、細菌同定を行った。各死因、特に敗血症と他の死因の際の同定細菌の違いを見出そうと試みたが細菌感染症死亡例における起炎細菌の同定には至らなかった。肺炎における肺ぬぐい液についても同様の試みを行ったところ、一部の細菌感染では、起炎細菌の同定が可能であり、血液培養を行わなくとも、ジェネテックアナライザーを有効に活用することによって敗血症においても真の起炎細菌の同定が可能になることが示唆された。

(4) さらに法医解剖時の横行結腸内容を用いて 16S rRNA メタゲノム解析を行ったところ、Phylum (門) レベルにおいて、全例で生体において検出される一般的な腸内細菌である Bacteroidetes、Firmicutes、Proteobacteria が主に検出され、この3種の Phylum が検出されたほとんどの菌叢を占めていた。Actinobacteria、Tenericutes が検出された試料もあったが、その割合は低かった。また、これらが検出された割合は試料によって異なっていた。以上より、腸内細菌叢は症例の死亡時の状況を反映しており、感染が疑われる場合には Family、Genus、Species レベルでの検討を血液や肺についても行うことが有用と考えられた。

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6件)

Hata Y, Kinoshita K, Kudo K, Ikeda N, Nishida N. Anomalous origin of the right coronary artery from the left coronary sinus with an intramural course: comparison between sudden-death and non-sudden-death cases. *Cardiovasc Pathol.* 2015; 24: 154-159.

DOI:10.1016/j.carpath.2014.11.004

Kudo K, Usumoto Y, Kikura-Hanajiri R, Sameshima N, Tsuji A, Ikeda N. A fatal case of poisoning related to new cathinone designer drugs, 4-methoxy PV8, PV9, and 4-methoxy PV9, and a dissociative agent, diphenidine. *Leg Med (Tokyo).* 2015; 17: 421-426.

DOI:10.1016/j.legalmed.2015.06.005

Kudo K, Usumoto Y, Usui K, Hayashida M, Kurisaki E, Saka K, Tsuji A, Ikeda N. Rapid and simultaneous extraction of acidic and basic drugs from human whole

blood for reliable semi-quantitative NAGINATA drug screening by GC-MS. *Forensic Toxicol* 2014; 32: 97-104.

DOI:10.1017/s00414-013-0853-4

Hata Y, Mori H, Tanaka A, Fujita Y, Ikeda N, Nishida N. Identification and characterization of a novel genetic mutation with prolonged QT syndrome in an unexplained postoperative death. *Int J Legal Med* 128: 105-115, 2014

DOI:10.1017/s11419-013-0215-4

Maeda S, Kamishiraki E, Starkey J, Ikeda N. Why are autopsy rates low in Japan? Views of ordinary citizens and doctors in the case of unexpected patient death and medical error. *Journal of Healthcare Risk Management.* 2013; 33: 18-25. 査読あり、<http://www.thompsonreuters.com.au>

Atsuchi M, Tsuji A, Usumoto Y, Yoshino M, Ikeda N. Assessment of some problematic factors in facial image identification using a 2D/3D superimposition technique. *Legal Med.* 2013; 15: 244-248.

DOI:10.1016/j.legalmed.2013.06.002

[学会発表](計5件)

白元洋介, 鮫島直美, 工藤恵子, 奥村美紀, 辻 彰子, 池田典昭. 高濃度のトルエンが検出された腐敗の進行した1剖検例. 第3回法医中毒研究会勉強会. 2015, 高知.

辻彰子, 佐藤和雄, 池田典昭. 死体腸内容の16S rRNA メタゲノム解析. 日本DNA多型学会第24回学術集会. 学術集会抄録集. 2015; p95, 岡山.

奥村美紀, 鮫島直美, 臼元洋介, 辻 彰子, 工藤恵子, 池田典昭. 胸腔鏡下左肺部分切除術中に死亡した1剖検例. 第65回日本法医学会学術九州地方集会. 要旨集.

2015; p.23, 宮崎.

奥村美紀, 臼元洋介, 辻 彰子, 工藤恵子, 池田典昭. 浣腸後のS状結腸穿孔による急性腹膜炎で死亡した一例. 第15回日本法医学会学術北日本地方集会(法医学談話会第101回例会). 抄録集.

2014; p.15, 山形.

臼元洋介, 鮫島直美, 辻 彰子, 工藤恵子, 池田典昭. 医療過誤が疑われた胃幽門輪潰瘍穿孔の1例. 第31回日本法医学会学術中四国地方集会. 口演要旨集.

2014; p.28-29, 高松.

〔図書〕(計1件)

— 池田典昭: 日本医学放射線学会厚生労働科学研究班編集, 死後画像読影ガイドライン 2015年版. 東京: 金原出版; 2015

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.kyushu-u.ac.jp/forensic/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田典昭 (IKEDA Noriaki)

九州大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号: 60176097