アルコールの死後産生に関与する細菌叢の網羅的解析

Comprehensive analysis of bacterial flora involved in postmortem alcohol production

福留昭人[1,2]，勇井克也[1)]，工藤利彩[1)]，粕田承吾[1)]
Akihito FUKUDOME[1,2)]，Katsuya YUUI[1)]，Risa KUDO[1)]，Shogo KASUDA[1)]
1) 奈良県立医科大学法医学教室　〒634-8521　橿原市四条町 840
2) 奈良県警察本部刑事部科学捜査研究所　〒630-8444　奈良市今市町 585
1) Department of Legal Medicine, Nara Medical University, Kashihara, 634-8521, Japan
2) Forensic Science Laboratory, Nara Prefectural Police H.Q., Nara, 630-8444, Japan

【Abstract】

In forensic autopsies, postmortem microbial ethanol production makes it difficult to estimate the amount of antemortem alcohol consumption. 1-propanol, which is produced simultaneously with ethanol, has been used as an indicator of postmortem ethanol production. However, it becomes increasingly clear that postmortem ethanol production can occur without 1-propanol production. Therefore, the use of 1-propanol as an indicator of postmortem ethanol production is getting awkward to use and the identification of bacteria accompanied with ethanol production is required to elucidate the mechanism of postmortem ethanol production. In this study, we measured the blood alcohol concentration and analyzed the bacterial flora using the 16SrRNA (16S) gene region by next-generation sequencing to identify the bacteria involved in postmortem alcohol production. The bacterial flora analysis of 88 samples identified 1065 bacterial genera. We divided the 88 samples into 3 groups as follows: Group I (n=27); ethanol (-) and 1-propanol (-), Group II (n=21); ethanol (+) and 1-propanol (-), and Group III (n=40); ethanol (+) and 1-propanol (+). The bacterial content was compared among groups using Linear Discrimination Analysis Effect Size (LEfSe) and 16S copies. The total 16S copies was significantly larger in groups II and III than in group I, demonstrating that postmortem alcohol production is more likely to occur as the bacterial content increases. In the blood of decomposed corpses, anaerobic bacteria such as *Proteus* and *Vagococcus* were involved in ethanol production, while *Morganella*, *Peptoniphilus*, *Anaerosalibacter*, and *Tissierella* were involved in 1-propanol production as well as ethanol production. This study demonstrated that the postmortem alcohol production depended on the amount and type of bacteria. This is the first study that analyzed the relationship between bacterial flora and alcohol production in cadaveric blood. These results may be applicable to the estimation of antemortem ethanol consumption in the practical forensic examination.

Key words: postmortem alcohol production, meta-16S rRNA gene analysis, bacterial flora, ethanol, 1-propanol

【抄録】

法医解剖における血中エタノール濃度測定において，微生物によるエタノールの死後産生が生前の飲酒の有無や飲酒量の推定を困難にしている．これまで，エタノールの死後産生の有無は同時に産生される1-プロパノールが指標とされてきたが，近年，1-プロパノール産生を伴わないエタノール産生も見受けられ，1-プロパノールを指標とすることが問題視されている．したがって，エタノールおよび1-プロパノールの死後産生の機序を解明する上で，死後産生アルコールに関与する細菌の同定が必要である．本研究では，解剖時に採取した心臓血を用いて，血中アルコール濃度測定と次世代シーケンサーによる16SrRNA（16S）遺伝子領域を用いた細菌叢解析（メタ16S解析）を行い，死体血における細菌叢とアルコールの産生との関係性を検討した．

88試料の細菌叢解析により1,065の細

菌属が同定された．Ⅰ群（n=27）：エタノール（-）かつ1-プロパノール（-），Ⅱ群（n=21）：エタノール（+）かつ1-プロパノール（-），Ⅲ群（n=40）：エタノール（+）かつ1-プロパノール（+）に分け，LEfSe解析および16Sコピー数に基づく群間比較を行った．総16Sコピー数はⅠ群と比較してⅡ，Ⅲ群が有意に多く，アルコールの死後産生は細菌量が多いほど起こりやすいことが示された．腐敗死体の血液では，*Proteus*, *Vagococcus*などの嫌気性菌がエタノール産生に関与し，*Peptoniphilus*, *Morganella*, *Anaerosalibacter*, *Tissierella*がエタノール産生と同時に1-プロパノールの産生に関与していると推察された．

以上から，アルコールの死後産生が細菌の量や種類に依存することが明らかとなった．本研究は，死体血における細菌叢とアルコール産生の関係を分析する最初の試みである．

法医実務上，生前の飲酒量の推定への応用が期待される．

【緒言】

エタノールの摂取による酩酊は，暴力による犯罪などの事件の誘因となるほか，転倒・転落，溺水，低体温症，交通事故などによる死亡を引き起こす要因となっている．法医解剖においては，これらの事件や事故とエタノール摂取の関係を調査するため，死体血のエタノール濃度測定を日常的に行っている．しかし，死者が生前に飲酒していない場合においても，死者の体内からエタノールが検出されることがあり，生前の飲酒の有無や飲酒量の推定を困難にし，事件や事故の真相を究明する上で問題となっている．

古くからの研究により，死体に繁殖する微生物がエタノールの死後産生に関与することが知られており，腸内細菌，皮膚の常在菌，外部環境由来の細菌および胃内容中の食品由

来の微生物などがあげられる[1-3]．腐敗死体における微生物の発酵作用により，エタノールが産生され，同時に1-プロパノールが産生されると言われてきた[1-3]．我々の経験でも同じく，1-プロパノールが検出されたすべての剖検例においてエタノールが検出されている．一方，エタノールが検出されなかったすべての剖検例において1-プロパノールは検出されていない．すなわち，これまでの学説どおり，1-プロパノールは死後のエタノール産生の副産物と考えられ，1-プロパノールが検出されれば，エタノールの死後産生が起きていると推測される．このように，1-プロパノールは死後産生エタノールの指標として用いられ，死後に産生されたエタノール量は1-プロパノール量の20倍以下に相当すると考えられていた[2,4]．実際の法医実務においては，剖検例の腐敗の程度，死後経過時間，死体が置かれていた環境および血中1-プロパノールの検出などの要

素を総合的に勘案し，検出された血中エタノールが飲酒によるものか死後産生によるものかを慎重に判断しているが，未だ経験的な要素が多いのが現状である．

一方，死後経過時間が長く腐敗が高度な死体であっても，実務上エタノール産生しつつも 1-プロパノールを産生しない場合が見受けられ，また，真菌において 1-プロパノールを産生することなくエタノールを産生する報告[5)]がなされるなど，現在ではエタノールの死後産生に伴って必ずしも 1-プロパノールが産生されるとは限らないとする説が有力となり，根本的に 1-プロパノールを指標とすることに疑問を呈することとなった．そのため，エタノールの死後産生を科学的に判断できる新たな指標を見出すことが求められている．死体におけるエタノールおよび 1-プロパノール（以下，合わせて「アルコール」と記載する．）の産生は，おそらく体内で増殖する微生物，とりわけ多くを占有する細菌

の種類やその数による影響が大きいと仮定され，それらを証明することはアルコールの死後産生の機序を解明する上で意義がある．近年の次世代シーケンサーの登場により，ヒトマイクロバイオーム研究が急速に発展し，細菌の培養を必要とすることなく，皮膚，口腔内および腸管内などの細菌叢を網羅的に解析することが可能となった[6]．法医学の分野では，死後経過時間の推定や溺死の診断などを目的として，Thanatomicrobiomeと呼ばれる死後の体内の細菌叢に関する研究が行われるようになり，16SrRNA遺伝子領域を利用した細菌叢解析（メタ16S解析）により，体内の臓器や血液の細菌叢を構成する細菌の種類や組成比が報告されている[7-12]．しかし，Thanatomicrobiome研究は歴史が浅く，血液における細菌叢とアルコール産生との関係を調査した報告はない．

　そこで今回，解剖時に採取した心臓血を用

いて，アルコール濃度測定および次世代シーケンサーを用いたメタ16S解析を行い，アルコールの産生菌を探索するためのLinear Discriminant Analysis Effect Size（LEfSe）解析[13]，さらに細菌の16SrRNA数（16Sコピー数）を指標とする定量的な群間比較を行い，死体血における細菌叢とアルコールの産生との関係性を検討した．

【材料および方法】

1．試料

2014年から2019年までの6年間に奈良県立医科大学法医学教室で法医解剖に付された剖検例のうち，年齢20歳以上かつ死後2日以上150日以内の肉眼的に腐敗性変色が確認された剖検例117体を対象とし，その心臓血を試料とした．なお，この117体には，明らかに飲酒していると判明した事例は除外した．

本研究は，奈良県立医科大学医の倫理審査委員会の承認を得て行った（承認番号2593）.

2．血中アルコール濃度測定

気化平衡ガスクロマトグラフィー（GC）法を用い，血中のエタノールおよび1-プロパノール濃度を測定した.（バイアル瓶に試料0.5 mlをとり，内部標準溶液として2-ブタノール（0.4 mg/ml）0.5 mlを加え，55℃で20分加温し，気相1 mlをGC装置に注入して行った.）測定条件は，装置：SHIMADZU GC-8A（島津製作所），検出器：FID，カラム：Prepack Q 100/200（GL Science），カラム温度140℃，注入口温度180℃，検出器温度180℃，キャリアガスN_2（圧力200 kPa）とした.

3．アルコール検出の有無による分類

血中のエタノールおよび1-プロパノール濃度と細菌叢との関連性を検討するにあたり，血中アルコール濃度測定結果をもとに，各試料を3群に分けた．エタノールおよび1-プロパノール濃度が0.1 mg/ml以上のものを陽性（+）とし，0.1 mg/ml未満のものを陰性（−）とした[14]．3群は，エタノール（−）かつ1-プロパノール（−）の試料をI群（n=55），エタノール（+）かつ1-プロパノール（−）の試料をII群（n=22），エタノール（+）かつ1-プロパノール（+）の試料をIII群（n=40）とした．3群の詳細を表1に示す．

４．次世代シーケンサーによるメタ16S解析

⑴ バクテリアDNAの抽出および精製

心臓血50～250 μlに，前処理としてビーズ（Pathogen Lysis Tube; QIAGEN）を添加し，FastPrep-24

Instrument（MP-Biomedicals）を用いて破砕処理後，QIAamp UCP Pathogen Kit（QIAGEN）を用いてDNAの抽出および精製を行った．各精製DNAについては，まず次項のPCRによる16Sアンプリコンの有無を確認し，16Sアンプリコンが検出された試料は，上記と同様の方法で2回目のDNAの抽出および精製を行った．2回目では，各試料中に16S定量マーカーとしてヒトの細菌叢に存在しないとされる細菌2種（*Intechella halotolerans*，*Allobacillus halotolerans*：ZymoBIOMICS Spike-in Control I；ZYMO RESEARCH）を添加した．なお，16S定量マーカーの添加量は，1回目の16Sアンプリコンの増幅確認結果から，試料に応じて0.2 μl～20 μlとした．

(2) 16Sアンプリコンおよびライブラリ

ー作製

Illumina社のプロトコールに従った[15]．まず，精製DNAについて，16S rRNA遺伝子のv3およびv4領域を含むアダプター付きプライマー（341F/805R）を用いてPCRを行った．PCR反応液は，2×KAPA HiFi HotStart ReadyMix（KAPA BIOSYSTEMS）12.5 μl，各1 μMプライマー5 μl，鋳型DNA2.5 μlとし，PCR増幅は，95℃ 3分の初期変性後，続いて95℃ 30秒，55℃ 30秒，72℃ 30秒を25サイクル行った後，72℃ 5分の最終伸長を行った．なお，陽性コントロールに細菌8種のDNA混合物（ZymoBIOMICS Microbial Community DNA Standard; ZYMO RESEARCH）10 ng，陰性コントロールに滅菌水を用いた．得られた16Sアンプリコンは2%アガロースゲル

を用いて電気泳動法により確認した．次に，16S定量マーカーを含む16SアンプリコンをAgencourt AMPure XP（Beckman Coulter）を用いて精製した後，Nextera XT Index Kit（Illumina）を用いてシーケンスアダプターが付いたサンプルごとの固有のIndex配列をPCRにより付加した．得られたライブラリーをAgencourt AMPure XP（Beckman Coulter）を用いて精製し，2%アガロースゲルを用いて電気泳動法により増幅の確認を行った．各ライブラリーは，KAPA Library Quantification Kit（KAPA BIOSYSTEMS）を用いてStepOnePlus RealTime PCR System（Applied Biosystems）により定量を行い，各サンプルのライブラリー濃度を2 nMに調整後，それぞれ5 µlを分取し，1つにプールした．

(3) シーケンシングおよび菌叢解析

プールしたライブラリーに30%のPhiX Control（Illumina）を混合させ，最終ライブラリー濃度8 pMに調整し，MiSeq v3 600 Cycle Kit（Illumina）を用いてMiSeq FGx（Illumina）によるペアエンドシーケンシンス（2×300 bp）を行った．得られたデータは，クラウド環境BaseSpaceのFASTQ Toolkit app（Illumina）を用いてクオリティスコア（QS）25以下のリードおよび150 bp以下のリードを除外し，さらにリードの3’末端の低品質の塩基を除外した．細菌叢解析は，BaseSpaceの16S Metagenomics app（version1.0.1；Illumina）を用いて行った（分類データベース：2013年5月リリースのGreengenes Consortium Databaseを

Illuminaがキュレーションしたバージョン，分類アルゴリズム：Ribosomal Database Project（RDP）Classifier[16]）．

5．LEfSe解析

細菌の相対的存在量に基づく群間比較法であるLEfSe解析（LDAスコア＞4.0，P＜0.05）を行った[13]．LEfSe解析は，細菌の存在量の差異により生物学有意性を示す細菌を探索する方法であり，1-プロパノールおよびエタノールの産生菌の探索を行った．

6．16Sコピー数の算出

各試料中に添加した16S定量マーカーの細菌2種の相対存在量から，各試料における細菌叢の総16Sコピー数を算出し，さらに同定された細菌の構成比率から，個々の細菌の16Sコピー数を算出した．16Sコピー数は血液1 mlに換算した．なお，16S定量マーカーの細菌2種の組成については，グラ

ム陽性菌である *Intechella halotolerans* は細胞数が 1×10^{6}，その16Sコピー数が 3×10^{6}，グラム陰性菌である *Allobacillus halotolerans* は細胞数が 1×10^{6}，その16Sコピー数が 7×10^{6} であった．

7．統計分析

3群間における細菌叢の総16Sコピー数の比較は，統計解析ソフトウェアEZR[17]を使用し，Kruskal-Wallis 検定を用いて3群間の中央値の比較を行い，有意差が認められた場合，Holm補正のMannWhitneyのU検定による多重比較を行った．検定結果は，危険率5%未満を有意とした．

【結果】

1．16Sアンプリコンの検出

16Sアンプリコンは，アガロースゲル電気泳動法により，適正なアンプリコンサイズ

である530 bp前後にバンドが得られた．Ⅰ～Ⅲ群におけるアンプリコンの検出率は，Ⅲ群において100％（40/40），Ⅱ群において95.5％（21/22）と高く，一方，Ⅰ群では49.1％（27/55）となり，約半数は16Sアンプリコンを確認できなかった（表1）．

2．細菌叢解析

16Sアンプリコンが確認できた88試料における細菌叢解析に使用したリードの総数は5,686,258，1サンプル当たり平均64,617リードであった．88試料の細菌叢から，総数1,065属の細菌が同定され，優勢な上位30属の相対存在量を示した（図1）．最も優勢な細菌属は*Clostridium sensu stricto*属で，次いで*Clostridium* cluster XI属が優勢であり，これらはⅠ群からⅢ群にわたり存在比率が高かった．この2属を含むすべての*Clostridium*属は，88試料の細菌叢全

体の約4分の1を占めていた．また，88試料の約7割は1つの細菌属が50％以上を占める細菌叢を形成していた．各群において存在比率の高かった主な細菌属は，Ⅰ群が *Clostridium* *sensu stricto*, *Pseudomonas*, Ⅱ群が *Proteus*, *Clostridium sensu stricto*, Ⅲ群が *Clostridium sensu stricto*, *Clostridium* cluster XI, *Morganella*, *Vagococcus* であった．

3．LEfSe解析による群間比較

Ⅰ群（エタノール陰性群）とⅡ，Ⅲ群（エタノール陽性群）の間のLEfSe解析（LDAスコア＞4.0，P＜0.05）を行ったところ，Ⅱ，Ⅲ群に特徴的な細菌は，LDAスコアが高い順に *Enterobacteriales* 目，*Firmicutes* 門，*Clostridia* 綱のほか，属レベルでは *Morganella*, *Vagococcus*, *Proteus*,

Peptoniphilus, *Tissierella*, 種レベルでは *Proteus mirabilis*, *Vagococcus carniphilus*, *Morganella morganii*, *Clostridium sporogenes* であった（図 2a）. 一方，Ⅰ群に特徴的な細菌は，属レベルでは *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Psychrobacter* など，種レベルでは *Pseudomonas sp.*, *Psychrobacter sp.* などであった．

次に，Ⅱ，Ⅲ群（エタノール陽性群）のうち，Ⅱ群（1-プロパノール陰性群）とⅢ群（1-プロパノール陽性群）の間の LEfSe 解析（LDA スコア＞4.0，P＜0.05）を行ったところ，Ⅱ群に特徴的な細菌は，*Proteus mirabilis*, *Clostridium sporogenes*, *Staphylococcaceae* 科，*Staphylococcus* 属であり，Ⅲ群に特徴的な細菌は，*Tissierella* 属であった

（図2b）．

4．細菌叢における総16Sコピー数の群間比較

各群における総16Sコピー数の中央値は，Ⅰ群（0.02×10^9），Ⅱ群（1.81×10^9），Ⅲ群（3.39×10^9）と増加し，Ⅰ群と比較してⅡ，Ⅲ群は有意に多かった（図3a）．

5．16Sコピー数に基づいたⅠ～Ⅲ群を構成する細菌属の比較

各群を構成する主要な細菌属を調査するため，各群別に同じ細菌属の16Sコピー数を合計し，3群間で比較を行った（図3b）．*Clostridium sensu stricto*属，*Clostridium* cluster XI属はⅠ群からⅢ群にわたり上位を占めるほど存在量が多かった．Ⅱ群およびⅢ群は上位を占める細菌属に共通する傾向が見られ，*Clostridium*の2属のほか，*Vagococcus*，*Proteus*，*Enterococcus*，*Bacteroides*が共

通していた．I群の細菌属では *Pseudomonas* が最も存在量が多く，その他に *Fusobacterium*, *Cetobacterium* などが上位であった．Ⅱ群に特徴的な細菌属は *Staphylococcus*, *Hafnia*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, Ⅲ群に特徴的な細菌属は *Peptoniphilus*, *Morganella*, *Anaerosalibacter*, *Tissierella* であった．

6．Ⅱ，Ⅲ群の各剖検例におけるアルコール産生菌の推定

　LEfSe解析および16Sコピー数に基づいた群間比較の結果，Ⅱ群またはⅢ群もしくはその両群に特徴的な細菌属が複数挙げられた．これらの細菌属に対するエタノールおよび1-プロパノール産生の関与を評価するため，Ⅱ群21例およびⅢ群40例の細菌叢を構成する主要な細菌属の16Sコピー数（表

2，3）と，各細菌属のⅠ～Ⅲ群における16Sコピー数の分布状況（図4a-d）をもとに，個々の細菌叢におけるエタノールおよび1-プロパノールの産生菌の推定を試みた．

Ⅱ群では，図4bに示すⅡ群とⅢ群に共通する*Proteus*，*Vagococcus*，*Enterococcus*，*Bacteroides*，図4cに示すⅡ群に特異的な*Staphylococcus*，*Hafnia*，*Edwardsiella*，*Enterobacter*が，そのいずれかまたは複数の細菌属の16Sコピー数が多く，かつ，存在比率が高いことから，エタノールの産生に関与していると考えられた（表2）．図4bに示す4つの細菌属はⅠ群の16Sコピー数とⅡ，Ⅲ群の16Sコピー数に顕著な差が見られた．図4cで示す4つの細菌属の16Sコピー数の群間比較では，*Enterobacter*はⅠ群と比較してⅡ，Ⅲ群の16Sコピー数が多い分布状況を示したが，その他はⅡ群の試料中に1つだけ

突出して16Sコピー数が多い試料が見られたが，各群の分布状況に顕著な差は見られなかった．

Ⅲ群では，図4bに示すⅡ群とⅢ群に共通する*Vagococcus*, *Proteus*, *Enterococcus*, *Bacteroides*, 図4dに示すⅢ群に特異的な*Peptoniphilus*, *Morganella*, *Anaerosalibacter*, *Tissierella*のいずれかまたは複数の細菌属の16Sコピー数が多く，かつ，存在比率の高いことから，1-プロパノールの産生に関与していると考えられた（表3）．図4dで示す4つの細菌属の16Sコピー数の群間比較では，いずれもⅠ，Ⅱ群の16Sコピー数よりもⅢ群の16Sコピー数が多い試料が多く見られた．

【考察】

今回用いたメタ16S解析は，ヒトの口腔や腸管などの細菌叢を調査するために利用さ

れている方法であり，これら生体試料における個体間の総菌量に大きな差はなく，患者群と健常者群を比較する場合にあっても総菌量に極端な差はないものと考えられる．剖検例では，生前は無菌と考えられている血液において，死後における細菌の存在量は未知であり，死体の置かれていた状況，死後経過時間，死因および外来微生物の侵入などの様々な要因によって個々の細菌量に大きな差が生じることが予想される．実際，16Sアンプリコンは I 群での検出率は低いが，これは死後経過時間が短く，細菌量が少なかったためと考えられる．このような条件下でアルコール産生に関与する細菌を同定するには，微生物マーカーの探索法として一般的に用いられているLEfSe解析だけでは十分とはいえない．なぜなら，LEfSe解析は細菌叢の総菌量が反映されない細菌の相対的存在量に基づく群間比較法であるからである．そこで今回，細菌の16Sコピー数を細菌数に代用した絶対

的存在量に基づく群間比較を検討に加え，アルコールの産生菌の同定を試みた．ここでもⅡ，Ⅲ群の16Sコピー数はⅠ群と比較して高値であったが，これはⅡ，Ⅲ群の死後経過時間がⅠ群よりも長く，腐敗が進行したため，細菌量が増加したと考えられた．

　腐敗死体における死体血の細菌叢では，88試料から属レベルで1,000を超える多くの種類の細菌が同定されたが，88試料の約7割は1つの細菌属が50％以上を占める偏った細菌叢を形成しており，生体試料の腸内細菌叢[6]と異なる結果であることがわかった（図1）．細菌叢を構成する細菌属は，Ⅰ群からⅢ群にわたり*Clostridium sensu stricto*および*Clostridium* cluster XIの存在量が多く，その他の*Clostridium*属も含め，88試料の細菌叢全体の約1/4を*Clostridium*属が占めていた．Thanatomicrobiome研究の報告[12]

においても死体の細菌叢の多くを*Clostridium*属が占有しており，剖検例においては*Clostridium*属が優勢であることが明らかとなった．Ⅱ群およびⅢ群の細菌叢を構成している主な細菌属は，*Clostridium*のほかに，*Proteus*，*Morganella*，*Vagococcus*などの嫌気性菌であるが，Ⅰ群では*Pseudomonas*属を始めとする好気性菌が見られる傾向にあり，この違いは主に好気性菌のアルコール産生への関与は否定的であり，嫌気性菌がアルコール産生に関与していることを示唆している（図3b）．

エタノール産生菌を同定するため，LEfSe解析および16Sコピー数に基づいた群間比較を行ったところ，*Proteus*，*Vagococcus*，*Staphylococcus*，*Enterococcus*，*Hafnia*，*Bacteroides*，*Edwardsiella*，*Enterobacter*がエタノールの産生に関

与していると推測された．

また，実務的に最も注意が必要とされるのは，1-プロパノールの産生を伴わず，エタノールのみ産生する細菌の存在である．その候補として，Ⅱ群に特異的な細菌属として挙げられた *Staphylococcus*, *Hafnia*, *Edwardsiella*, *Enterobacter* が考えられる．しかし，これらの細菌属は，図4c の 16S コピー数の分布状況に示すように，Ⅱ群の試料中でも1つだけ突出して16S コピー数が多い試料が存在し，その影響によりⅡ群に特異的な細菌属に分類されたものと考えられる．したがって，今回の検討ではこれらの細菌属が1-プロパノールの産生を伴わないエタノール産生菌であるかどうかの評価は難しい．しかし，現時点においては，これらの細菌属が1-プロパノールの産生を伴わないエタノール産生菌になり得る可能性を否定できず，実際の剖検例において死体血から1-プロパノールが検出されなかっ

た場合でもエタノールの死後産生に関与している可能性があり，死後産生エタノールの判断には注意が必要である．

1-プロパノール産生菌の同定についても，LEfSe解析および16Sコピー数に基づいた群間比較を行ったところ，*Vagococcus*，*Proteus*，*Enterococcus*，*Bacteroides*，*Peptoniphilus*，*Morganella*，*Anaerosalibacter*，*Tissierella*が1-プロパノールの産生に関与していることが推測された．その中でも，16Sコピー数に基づいた群間比較（図3b，4d）により，*Peptoniphilus*，*Morganella*，*Anaerosalibacter*，*Tissierella*が1-プロパノールの産生に最も関与している細菌属であると推測される．微生物による1-プロパノールの生化学的な生成経路では，酵母においてトレオニンからα-ケト酪酸の分解産物として生成されるEhrlich経路

が知られており，細菌においても同様の経路を経て，*Zymomonas sp.*[18]や，*Clostridium sp.*[19]，*Bacillus subtilis*，*Pseudomonas putida*，*Enterococcus faecalis*などの細菌が関与する可能性がある[20]．また，1-プロパノールがグリセロールから1,2-プロパンジオールを経て生成される経路では，*Escherichia coli*，*Clostridium sphenoides*などの細菌が関与している可能性や，アセトンから1,2-プロパンジオールを経て生成される経路においても細菌が関与している可能性がある[20]．このように，1-プロパノールの産生菌がエタノールの産生を伴うとは限らない可能性が考えられるが，実際は1-プロパノールが検出されれば必ずエタノールが検出されており，同じ細菌が両者を生成する場合と，別々の細菌がそれぞれエタノールまたは1-プロパノールを生成する場合が想定される．今回の群間比較

においては，Ⅱ群とⅢ群を構成する上位の細菌属は共通する傾向にあることから，1-プロパノールの産生に関与する細菌は，エタノールの産生を伴うものと推測される．

先行研究では，死体から分離培養した細菌や，ごく一部の限られた菌株を血液などの培地に移植してエタノールおよび 1-プロパノールを産生させるなど[3,21]，経時的にアルコール量の測定実験を行っている．また，Boumba ら[21]は，細菌の移植実験によるアルコール産生が，細菌の種類，グルコース含有量および培地組成などに影響されるとしている．我々の研究の主たる目的は，死体血の細菌叢から網羅的にアルコール産生菌を同定することであるが，今後は推測されたエタノールおよび 1-プロパノール産生菌を血液存在下に培養し，血液成分や外部環境がアルコール産生に及ぼす影響を調査する必要がある．

以上の結果から，アルコールの死後産生は

細菌の量が多いほど起こりやすく，増殖する細菌の種類の違いがエタノールや1-プロパノールの産生に影響しているものと推測された．また，多くの場合，死体血から1-プロパノールが検出されればエタノールの死後産生が起きていると判断しても差し支えないことが示された．1-プロパノールが検出されない場合は，検出されたエタノールが死後産生であるかを評価するため，まず死体血の細菌量を明らかにする必要がある．つまり，エタノールの死後産生が起きない細菌量のカットオフ値が決定できれば，生前に飲酒がないことを証明できる可能性がある．今回の16SrRNA遺伝子のv3-v4領域のPCRによる16Sアンプリコンの検出の有無は，細菌量のカットオフ値を設定する簡易検査法の一つになり得るが，リアルタイムPCR法により16Sアンプリコンを定量する方がより正確である．今後さらに，細菌のDNA抽出方法や16SrRNA遺伝子のターゲット領

域などの条件検討が必要になるが，少なくとも細菌に限っては，16Sアンプリコンの検出の有無が，エタノールの死後産生が起こっていないと判断できる材料になり得ると考えられた．また，16Sアンプリコンのカットオフ値を超えた場合は，今回判明した死体血の細菌叢データから増殖する細菌を絞り，ターゲットとなる複数の細菌の特異プライマーを用いて一斉に定量できれば，細菌叢を構成する細菌の種類や量が分かり，その情報をもとに死後産生が起きているかを推定できる可能性がある．このような細菌検査法を構築できれば，より客観的に死後産生エタノールの有無を判別できるものと考えられる．

【結語】

　次世代シーケンサーによるメタ16S解析により死体血の細菌叢を網羅的に解析することができ，アルコールの死後産生が細菌の量や種類に依存することが明らかとなった．腐

敗死体の血液においては，*Proteus*, *Vagococcus* 属などの嫌気性菌がアルコール産生に関与し，特に *Peptoniphilus*, *Morganella*, *Anaerosalibacter*, *Tissierella* 属菌種がエタノールの産生とともに 1-プロパノールの産生に関与していると推測される．また，1-プロパノールの産生を伴わず，エタノールを産生する細菌は特定できなかったが，その可能性を有する細菌の存在は否定されず，実際の剖検例における死後産生エタノールの評価の際には注意が必要である．本研究は，死体血における細菌叢とアルコール産生の関係を分析する最初の試みであり，アルコールの死後産生機序を解明する手がかりとして有用なデータとなり，生前の飲酒の有無や飲酒量の推定の一助になることが期待される．

【謝辞】

　次世代シーケンサーの使用にご協力いただいた科学警察研究所，ご指導いただいた同研究所附属鑑定所藤井宏治鑑定官，生物第五研究室中原弘明室長に深謝いたします．

【利益相反について】

　本研究に関し，開示すべきCOIはありません．

【文献】

1) 小酒洋一．死体Alcoholに関する研究．日法医誌 1970; 24 (1): 32-47.

2) 何川 涼．アルコールに関する法医学的研究．日法医誌 1972; 26: 316-327.

3) 藤東俊雄．死体ならびに保存血におけるEthanolおよび関連物質の産生に関する研究．十全医会誌 1974; 83 (5): 577-596.

4) 何川 涼. 法医学. 東京；日本医事新報社, 1977. p.239-260.
5) Yajima D, Motani H, Kamei K, et al. Ethanol production by *Candida albicans* in postmortem human blood samples: Effect of blood glucose level and dilution. *Forensic Sci Int* 2006; 164: 116-121.
6) 服部正平. ヒト腸内マイクロバイオーム解析のための最新技術. 日臨免疫会誌 2014; 37 (5): 412-422.
7) Kakizaki E, Ogura Y, Kozawa S, et al. Detection of diverse aquatic microbes in blood and organs of drowning victims: First metagenomic

approach using high-throughput 454-pyrosequencing. *Forensic Sci Int* 2012; 220: 135-146.

8) Hyde ER, Haarmann DP, Lynne AM, et al. The Living dead: bacterial community structure of a cadaver at the onset and end of the bloat stage of decomposition. *PLoS ONE* 2013; 8: e77733.

9) Can I, Javan GT, Pozhitkov AE, et al. Distinctive thanatomicrobiome signatures found in the blood and internal organs of humans. *J Microbiol Methods* 2014; 106: 1-7.

10) Hyde ER, Haarmann DP, Petrosino JF, et al. Initial insights into bacterial succession during human decomposition. *Int J Legal Med* 2015; 129: 661-671.

11) Javan GT, Finley SJ, Can I, et al. Human thanatomicrobiome succession and time since death. *Sci Rep* 2016; 6: 29598.

12) Javan GT, Finley SJ, Smith T, et al. Cadaver thanatomicrobiome signatures: the ubiquitous nature of Clostridium species in human decomposition. *Front Microbiol* 2017; 8: 2096.

13) Segata N, Izard J, Waldron L, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol* 2011; 12 (6): R60.

14) 鈴木修，屋敷幹雄 編．薬毒物分析実践ハンドブックークロマトグラフィーを中心としてー．東京；じほう，2002．118-120．

15) 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation, Part # 15044223 Rev. B, 2013, available from [https://jp.support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_document

ation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf], accessed Feb 16, 2020.

16) Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, et al. Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73 (16): 5261-5267.

17) Kanda Y. Investigation of the freely available easy-to-use software ‘EZR’ for medical statistics. *Bone Marrow Transplant* 2013; 48: 452–458.

18) Swings J. and Ley J. D. The biology of *Zymomonas*.

Bacteriol 1977; 41: 1-46.

19) Janssen PH. Propanol as an end product of threonine fermentation. *Arch Microbiol* 2004; 182: 482-486.

20) Boumba VA, Ziavrou KS and Vougiouklakis T. Biochemical pathways generating post-mortem volatile compounds co-detected during forensic ethanol analysis. *Forensic Sci Int* 2008; 174: 133-151.

21) Boumba VA, Economou V, Kourkoumelis N, et al. Microbial ethanol production: Experimental study and multivariate evaluation. *Forensic Sci*

Int 2012; 215: 189-198.

【図・表のタイトル】

表1.　Ⅰ～Ⅲ群における16Sアンプリコンの検出率

図1.　88試料の細菌叢における最も優勢な上位30属の相対存在量

図2a.　Ⅰ群とⅡ，Ⅲ群の間のLEfSe解析

図2b.　Ⅱ群とⅢ群の間のLEfSe解析

図3a.　Ⅰ～Ⅲ群の細菌叢における総16Sコピー数の比較

図3b.　Ⅰ～Ⅲ群別の16Sコピー数が多い上位10細菌属

表2.　Ⅱ群21例の細菌叢を構成する主要な細菌属の16Sコピー数（×10^9/ml）

表3.　Ⅲ群40例の細菌叢を構成する主要な細菌属の16Sコピー数（×10^9/ml）

図4a.　Ⅰ群～Ⅲ群に共通する細菌属の16Sコピー数の分布

図4b.　Ⅱ群とⅢ群に共通する細菌属の16Sコピー数の分布

図4c.　Ⅱ群に特異的な細菌属の16Sコピー数の分布

図4d.　Ⅲ群に特異的な細菌属の16Sコピー数の分布

Group	Postmortem interval (d)	Alcohol test		PCR amplicon		Detection rate
		Ethanol	1-propanol	+	−	
I (n=55)	2 – 30	−	−	27	28	49.1 %
II (n=22)	5 – 75	+ (0.1−1.0 mg/ml)	−	21	1	95.5 %
III (n=40)	2 – 150	+ (0.2−1.5 mg/ml)	+ (0.1−0.3 mg/ml)	40	0	100.0 %

表1

Sample ID	Total 16S Copies	*Clostridium sensu stricto*	*Proteus*	*Vagococcus*	*Staphylococcus*	*Clostridium Cluster XI*	*Enterococcus*	*Hafnia*	*Bacteroides*	*Edwardsiella*	*Enterobacter*	*Other*
11	0.126775	0.005487	0.052558	0.000035	0.001568	0.000539	0.000238		0.003583		0.000014	*Akkermansia* 0.018833
12	6.883171	5.094419	1.538110	0.004076	0.000199	0.000894	0.002981	0.000099	0.031317		0.003877	
18	1.608188	0.003126	0.009087	0.001381	0.000073	0.002035	0.001781	0.000036	0.000400	1.467127	0.001054	
19	2.720760	0.006380	0.635675	0.007039	0.000152	0.003342	0.001064	0.000101	1.350403	0.000557	0.000101	*Peptostreptococcus* 0.371165
20	1.813385	0.271188	1.502764	0.002117	0.000879	0.000320	0.000919	0.000040	0.000480	0.000160	0.001358	
23	7.924167	5.891080	0.005683	0.010579	0.002448	0.002623	0.003497	0.000175	0.000962	0.000612	0.000087	*Psychrosinus* 0.685914 *Pseudomonas* 0.565081
24	2.035667	0.003649	0.001686	0.002894	0.000226	0.000352	1.997621		0.000151	0.000025		
27	0.053801	0.000037	0.000029	0.000016	0.000022	0.051557	0.000015	0.000009	0.000017		0.000003	
28	4.527049	1.021244	0.011198	0.921503	0.001440	0.009678	0.002000	1.868681	0.000720	0.000080	0.001600	*Buttiauxella* 0.229476
29	1.243895	0.021775	0.034718	0.344505	0.002760	0.002484	0.000497	0.000690	0.000055	0.000055	0.002594	*Klebsiella* 0.703003 *Morganella* 0.064082
32	3.598592	0.069073	0.002952	0.017604	3.482719	0.000698	0.000376	0.001234	0.000054		0.000590	
38	2.307771	1.024170	0.188981	0.437756	0.000099	0.309422	0.000428		0.017694	0.000033	0.000691	*Peptoniphilus* 0.149778
39	2.606526	0.001874	0.002291	0.000729	0.010204	2.328725	0.003436				0.023063	*Klebsiella* 0.147803
41	0.034696	0.000104	0.000406	0.000104		0.000550	0.000005				0.000169	*Aeromonas* 0.030647
43	7.004266	0.005144	4.308519	2.310440	0.002494	0.016054	0.021354		0.000312		0.004520	
45	1.261630	0.000334	0.001033	0.004376	0.000699	0.004376	0.000334	0.000030	0.000030		1.006776	*Lactobacillus* 0.140222
47	1.734351	1.577850	0.116971	0.012730	0.000223	0.000223	0.000112			0.000084		
49	5.908541	4.346022	1.071754	0.052337	0.000185	0.000371	0.002964	0.000093	0.070308		0.000834	
50	0.117467	0.000076	0.109114	0.001592	0.000030		0.000020				0.000005	
51	0.082746	0.000038	0.040264	0.012181	0.000004	0.000201	0.000863				0.000004	*Morganella* 0.019154
60	0.023304	0.000008	0.000001	0.000003	0.000041	0.000004	0.000003		0.000001			*Lactobacillus* 0.021525

各細菌叢を構成する細菌属の相対存在量が5%以上であった16Sコピー数を灰色で示す.

表 2

Sample ID	Total 16S Copies	*Clostridium Cluster XI*	*Clostridium sensu stricto*	*Vagococcus*	*Peptoniphilus*	*Morganella*	*Anaerosalibacter*	*Tissierella*	*Proteus*	*Enterococcus*	*Bacteroides*	*Other*	
1	3.040292	0.002611	0.002390	0.386736	1.566463	0.050588	0.000265	0.340707	0.000841	0.001461	0.560940		
2	0.698122	0.000047	0.001609	0.000520	0.000260	0.673425	0.000047	0.000284	0.001585	0.000095			
3	3.502671	0.037344	1.104637	0.009606	0.885919	0.003782		0.002402	0.034222	1.301982	0.000360		
5	4.725620	0.001654	0.233116	0.438873	2.641621	0.003308	0.000382	0.008017	0.010752	0.003690	0.042500	*Peptostreptococcus*	1.197263
6	3.504314	0.001245	0.002488	0.960182	0.001478	0.091472	0.000233	0.000544	0.357440	1.044286	0.010828	*Klebsiella*	0.494108
7	0.870913	0.000412	0.003839	0.000304	0.000347	0.004836		0.000022	0.002104	0.006029	0.000108	*Citrobacter* *Kluyvera*	0.664191 0.091498
8	1.696045	0.000037	0.054598	0.002185	0.000222	0.002815			0.042597	0.002667	0.000037	*Enterobacter* *Streptococcus*	0.485822 0.857968
9	11.016970	0.001683	1.167780	4.088302	0.094230	0.660070	0.000153	1.446494	0.075109	0.013003	0.023405	*Dysgonomonas*	3.045346
10	3.242945	0.000421	0.001892	0.850846	0.000281	1.423778	0.001402	0.000210	0.088316	0.002734	0.000771	*Lactobacillus*	0.541110
13	3.148215	1.720684	0.005210	0.002175	0.003642	0.002832	0.000202	0.000506	0.000556	0.000759	0.000354	*Clostridium XIVa* *Romboutsia*	0.689488 0.647761
14	10.595392	0.004379	5.006915	0.005510	0.001272	0.021900	3.330505	0.001271	1.842290	0.001412	0.000706		
15	2.947188	0.005271	0.003850	0.003790	0.001007	0.656786	0.000237	0.006455	0.335145	1.761893	0.000237		
17	1.093458	0.001114	0.001414	0.002422	0.002207	0.008230	0.001329	0.000257	1.023400	0.000579	0.000429		
21	6.103385	0.001453	0.005463	0.287712	4.794208	0.014938	0.001744	0.225868	0.010695	0.003545	0.421105		
30	2.976702	1.815618	0.003354	0.217504	0.000373	0.044022	0.000053	0.000213	0.636329	0.177899	0.006122		
31	5.384930	0.766492	4.481679	0.001134	0.000071	0.002055	0.000071	0.000071	0.002551		0.000142		
33	1.457569	0.000204	0.002580	1.041810	0.000102	0.006207		0.000026	0.240459	0.002861	0.021073	*Escherichia/ Shigella*	0.103448
34	0.990753	0.000016	0.941654	0.000543	0.000224	0.000032		0.000080	0.001118	0.012838	0.000287		
37	3.349186	2.167192	0.000911	0.855331	0.000391	0.000304	0.000043	0.000174	0.000911	0.015669	0.000564		
40	7.869388	7.077909	0.003343	0.004422	0.000647	0.000431	0.000324	0.000539	0.002157	0.001078			
48	6.218000	0.001431	0.005983	1.270185	0.082589	0.019639	0.000650	2.873718	0.886632	0.005202	0.689718		
52	2.225905	0.002155	0.001102	0.889960	0.053886	0.080470	0.217940	0.893839	0.022273	0.002874	0.002108		
54	6.194853	0.003154	0.006402	0.001299	0.000835	0.278797	3.625099	2.112082	0.005103	0.000742			
55	0.750568	0.000209	0.477878	0.000253	0.000045	0.259049	0.000089	0.000224	0.006216	0.000045			
56	1.156084	0.000025	0.000582	0.493740		0.527623	0.000051	0.000101	0.021205	0.085149	0.000101		
58	1.143585	0.534258	0.000279	0.000152	0.000076	0.001217	0.000025	0.000051	0.000380			*Leuconostoc*	0.577281
59	0.924604	0.000029	0.000287	0.000201	0.000057	0.879651	0.000086	0.013922	0.000832	0.000086	0.000287		
62	1.047372	0.000392	0.002223	0.000490	0.000163	0.997645	0.000065		0.001569	0.000294	0.000229		
63	5.326265	4.147731	1.069734	0.000459	0.000367	0.006702	0.000551	0.000367	0.003581	0.000551	0.000184		
64	7.389677	0.004079	0.005038	4.747517	0.005638	1.472106	0.000360	0.028550	0.971407	0.011756	0.016194		
65	5.859130	5.742229	0.003404	0.000537	0.001612	0.000179	0.000806		0.000537	0.000269			
66	3.704842	1.583070	1.111641	0.001257	0.000343	0.000286	0.000114	0.000057	0.003944	0.546818	0.000743	*Lactobacillus*	0.376949
67	5.234394	4.539943	0.010786	0.000453	0.000181	0.001269	0.002175	0.000181	0.000725	0.003082		*Escherichia/ Shigella*	0.547984
83	4.768133	0.000976	3.747076		0.003661	0.000814	0.000163	0.000325	0.003824	0.000081		*Anaerococcus*	0.854596
84	9.076279	0.591526	5.752037	0.000221	0.000221	0.000221	0.000110	0.000662	0.001435	0.000773		*Romboutsia*	1.617647
85	1.312130	0.000084	0.005647	0.694566	0.000042	0.433152	0.000125		0.119205	0.003388	0.000753		
86	2.782450	0.107769	0.005582	0.325585	0.000057	1.607360	0.000057		0.000570	0.002165		*Paenibacillus*	0.598197
87	3.437561	0.000361	0.108076	0.141715	0.000361	1.014930	0.000060	0.000060	0.593938	0.088639	0.003009	*Ignatzschineria*	1.311599
88	7.837852	0.259613	0.077297	1.583758	2.988371	0.004699	0.003172	0.474587	0.349009	0.015741	1.763608		
89	15.132308	0.005296	0.011439	0.003601	3.504471	0.005931	4.062001	0.004872	0.019488	0.000635	0.556047	*Clostridium XIVa* *Citrobacter*	1.740797 1.756684

各細菌叢を構成する細菌属の相対存在量が5%以上であった16Sコピー数を灰色で示す．

表 3

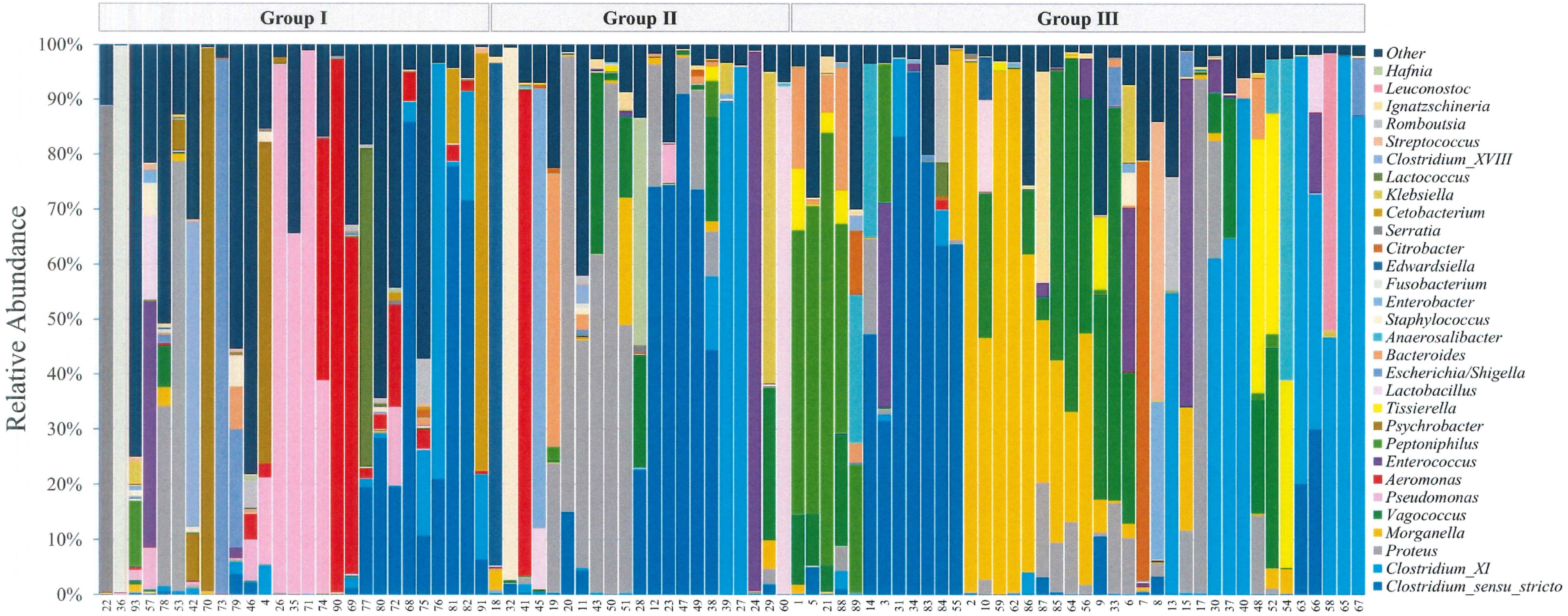

Group I
Group II
Group III
Relative Abundance
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
22 36 93 57 78 53 42 70 73 79 46 4 26 35 71 74 90 69 77 80 72 68 75 76 81 82 91
18 32 41 45 19 20 11 43 50 51 28 12 23 47 49 38 39 27 24 29 60
1 5 21 88 89 14 3 31 34 83 84 55 2 10 59 62 86 87 85 64 56 9 33 6 7 8 13 15 17 30 37 40 48 52 54 63 66 58 65 67
Other
Hafnia
Leuconostoc
Ignatzschineria
Romboutsia
Streptococcus
Clostridium_XVIII
Lactococcus
Klebsiella
Cetobacterium
Serratia
Citrobacter
Edwardsiella
Fusobacterium
Enterobacter
Staphylococcus
Anaerosalibacter
Bacteroides
Escherichia/Shigella
Lactobacillus
Tissierella
Psychrobacter
Peptoniphilus
Enterococcus
Aeromonas
Pseudomonas
Vagococcus
Morganella
Proteus
Clostridium_XI
Clostridium_sensu_stricto

図1

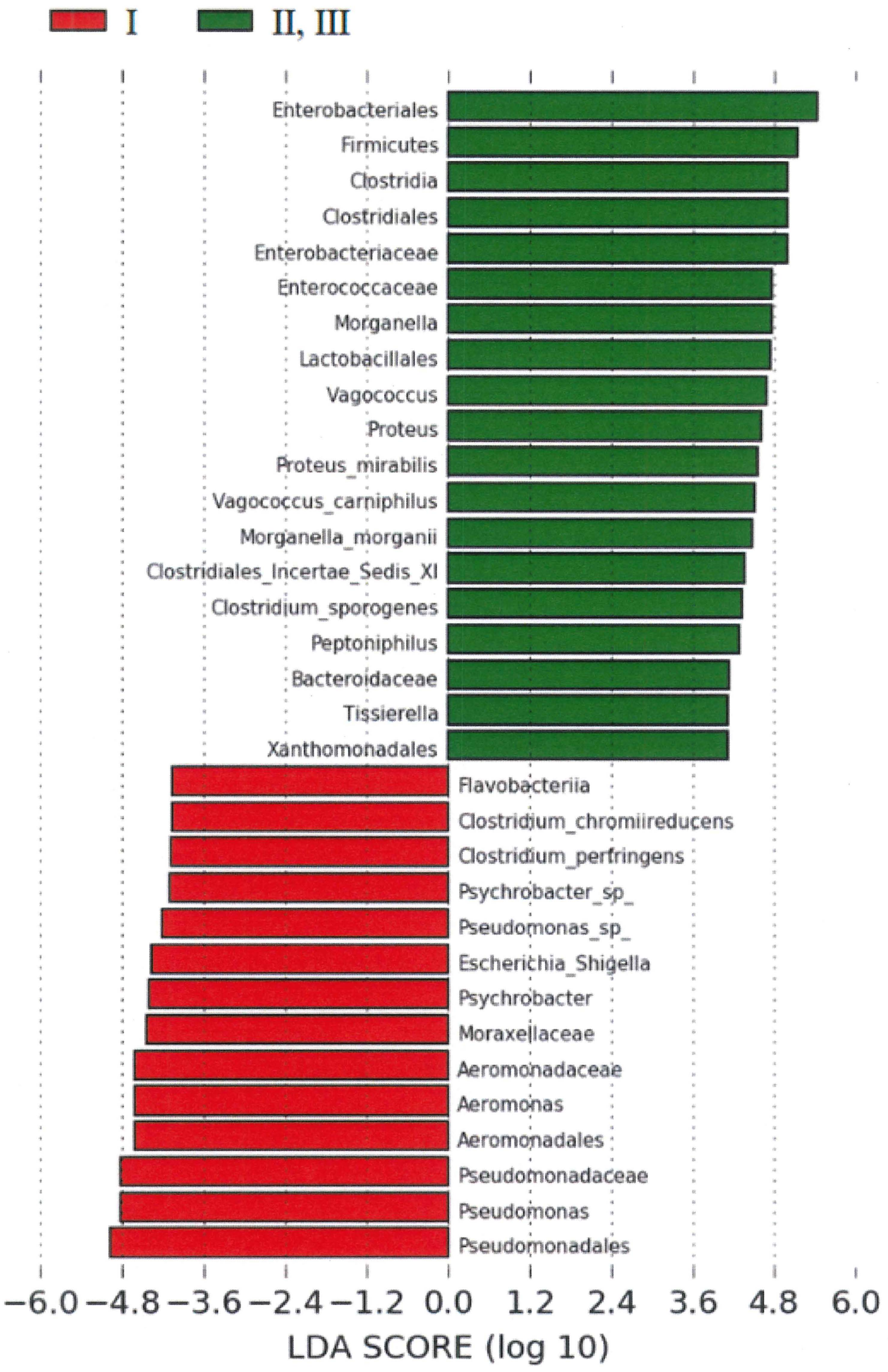

I
II, III
Enterobacteriales
Firmicutes
Clostridia
Clostridiales
Enterobacteriaceae
Enterococcaceae
Morganella
Lactobacillales
Vagococcus
Proteus
Proteus_mirabilis
Vagococcus_carniphilus
Morganella_morganii
Clostridiales_Incertae_Sedis_XI
Clostridium_sporogenes
Peptoniphilus
Bacteroidaceae
Tissierella
Xanthomonadales
Flavobacteriia
Clostridium_chromiireducens
Clostridium_perfringens
Psychrobacter_sp_
Pseudomonas_sp_
Escherichia_Shigella
Psychrobacter
Moraxellaceae
Aeromonadaceae
Aeromonas
Aeromonadales
Pseudomonadaceae
Pseudomonas
Pseudomonadales
−6.0 −4.8 −3.6 −2.4 −1.2 0.0 1.2 2.4 3.6 4.8 6.0
LDA SCORE (log 10)

図2a

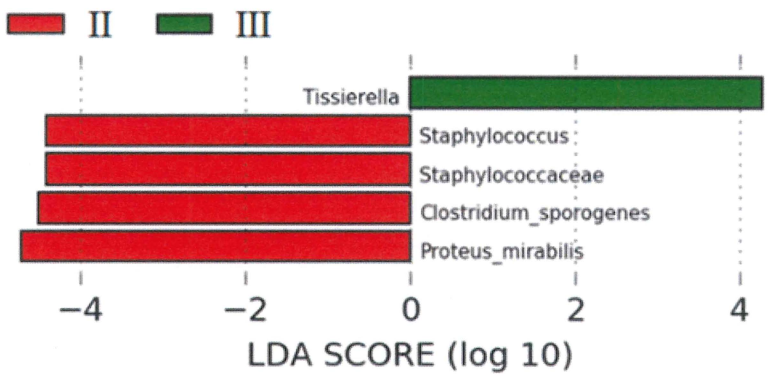

II
III
Tissierella
Staphylococcus
Staphylococcaceae
Clostridium_sporogenes
Proteus_mirabilis
−4
−2
0
2
4
LDA SCORE (log 10)

図2b

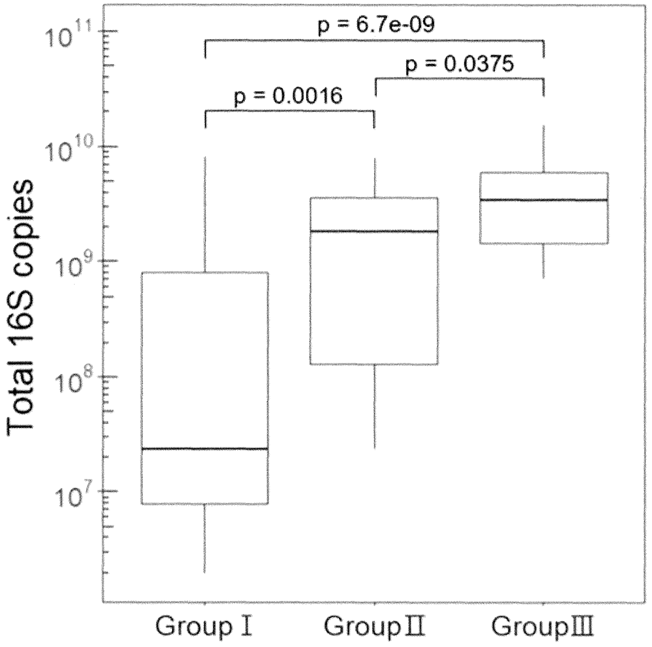
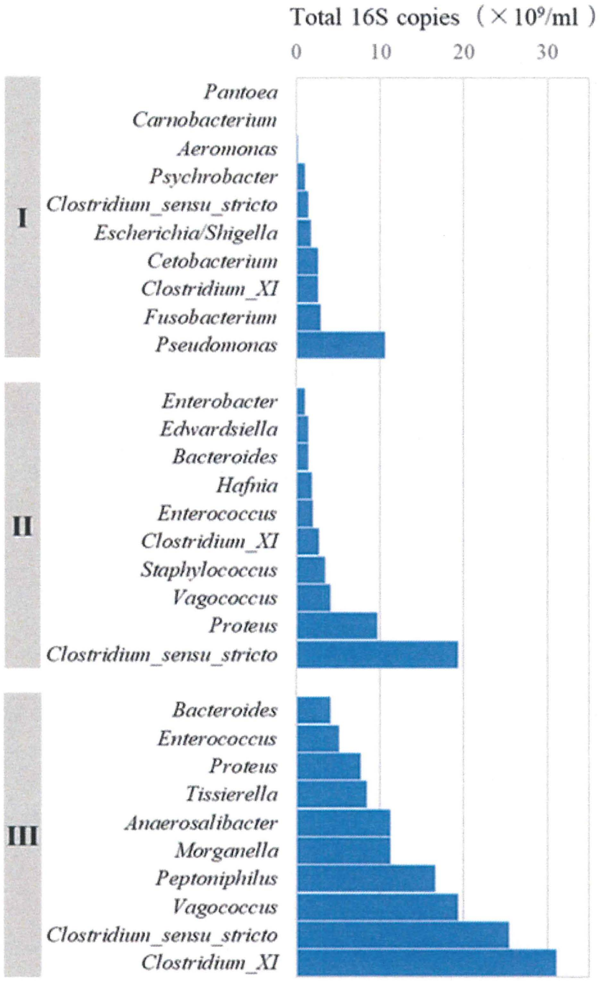

Total 16S copies
10^11
10^10
10^9
10^8
10^7
p = 6.7e-09
p = 0.0375
p = 0.0016
Group I
Group II
Group III

図3a



Total 16S copies（×10⁹/ml）
0
10
20
30
I
Pantoea
Carnobacterium
Aeromonas
Psychrobacter
Clostridium_sensu_stricto
Escherichia/Shigella
Cetobacterium
Clostridium_XI
Fusobacterium
Pseudomonas
II
Enterobacter
Edwardsiella
Bacteroides
Hafnia
Enterococcus
Clostridium_XI
Staphylococcus
Vagococcus
Proteus
Clostridium_sensu_stricto
III
Bacteroides
Enterococcus
Proteus
Tissierella
Anaerosalibacter
Morganella
Peptoniphilus
Vagococcus
Clostridium_sensu_stricto
Clostridium_XI

図3b

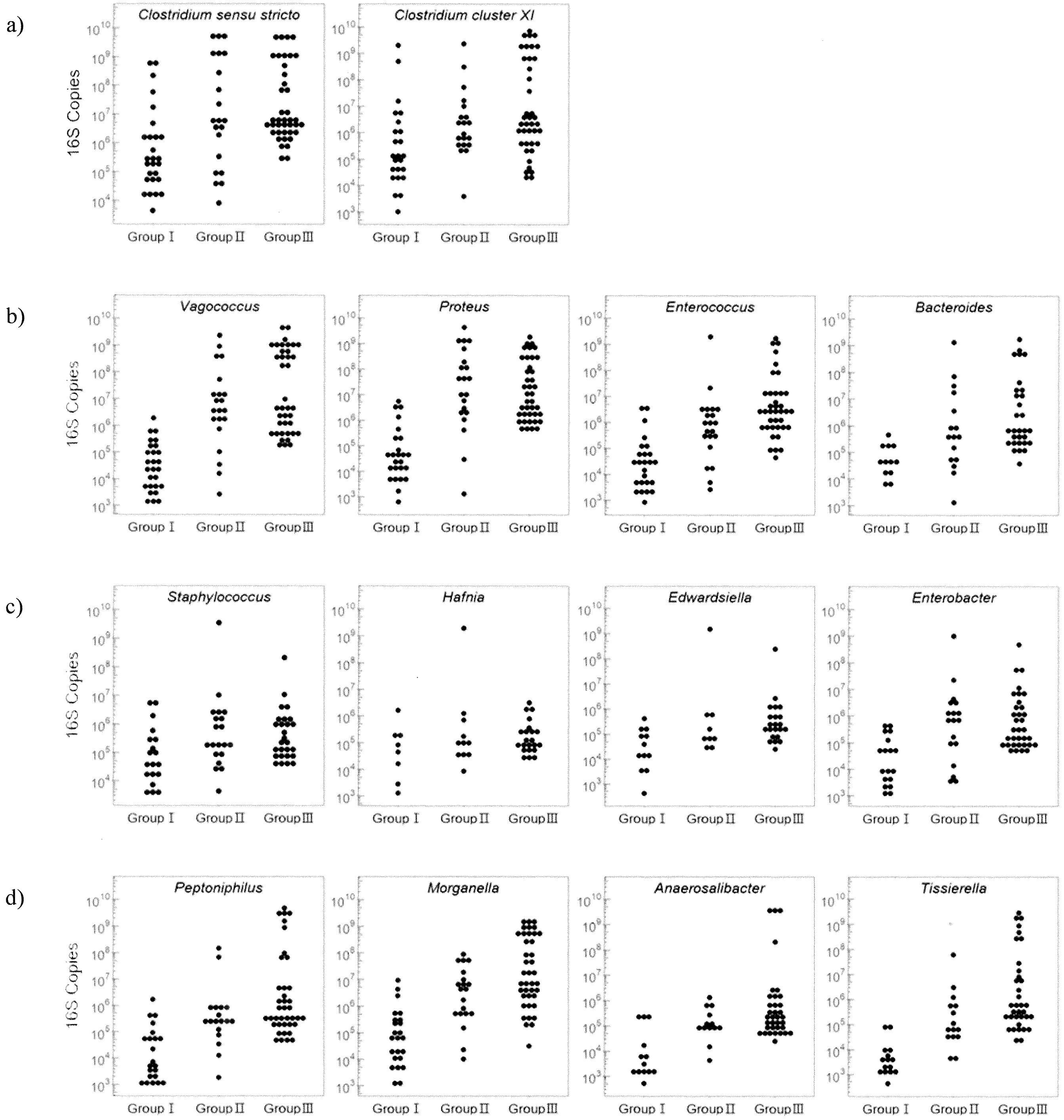

a)
Clostridium sensu stricto
Clostridium cluster XI
b)
Vagococcus
Proteus
Enterococcus
Bacteroides
c)
Staphylococcus
Hafnia
Edwardsiella
Enterobacter
d)
Peptoniphilus
Morganella
Anaerosalibacter
Tissierella
16S Copies
Group I
Group II
Group III

図4