

# 漂着死体における溺死診断のための検査法について —従来法の問題点と新規法の提案

八代正彦<sup>1</sup>, 勝山 碧, 中前琢磨, 肥後恵理, 宮本真智子, 福元明子, 林 敬人

## The method for forensic diagnosis by drowning

Masahiko YATSUSHIRO, Midori KATSUYAMA, Takuma NAKAMAE, Eri HIGO,  
Machiko MIYAMOTO, Akiko FUKUMOTO and Takahito HAYASHI

### 要 約

漂着死体の検案・解剖において、死因の診断および死亡場所の推定は大変重要な意味を持つ。現在、各法医解剖機関では体内の各臓器から水中のプランクトンを検出することで溺死の確定診断を行っている。プランクトンの検出方法には主に3種類あり、それぞれ壊機法・酵素処理法・DNA検出法と呼ばれる。しかし、これらの検査は手技が煩雑・機械が高価等の理由により、年々増える法医解剖の全例で実施することは現実的ではない。そこで我々はダイレクト real-time PCRを用いたより簡便かつ精度の高い新規の検査法を提案した。本稿では従来から実施されている3種類の検査法を中心に手技と問題点について述べる。

**Key words:** Diatom test, Drifting corpse, Drowning, Forensic Autopsy, Postmortem diagnosis

### 背 景

海岸には様々な物体だけでなく、死体も漂着することがある。漂着死体では、まず身元の設定が優先事項となるが、それらは水中あるいは水辺で発見された死体とはいえ、すべてが溺死した死体とは限らないため、死因の診断は重要な事項である。すなわち、漂着死体の中には、何らかの原因で溺死した場合のほか、海岸や岸壁で突然の内因性疾患を発症し、死亡後に海中に転落した場合や、溺死とは異なる手段（絞殺、刺殺等）で殺害された後に海中に遺棄される場合も含まれるため、死因の診断は慎重に行われなければならない。

溺死の法医学的診断方法は、鼻口部や気管・気管支内の細小泡沫、膨隆肺、胸腔内の液体貯留といった溺死を示唆する解剖所見に加え、臓器からプランクトン（珪藻）を検出するプランクトン検査に基づいてなされている。プランクトン検査とは、一般的に河川水や湖水、海水等にはプランクトンが含まれていることから、それらの水を吸引して溺死した場合には、水の浸入によって破綻した肺胞の血管から

水とともにプランクトンが血中に入り、大循環系を介して全身に分布し、肺だけでなく脾臓、肝臓、腎臓等の臓器からプランクトンを検出できるという原理を利用した検査である（Mueller and Gorgs 1949；長尾ほか 2012；青木ほか 2020）。プランクトン検査は、これまで主に2つの方法で行われてきた。1つ目は壊機法と呼ばれる強酸を用いて臓器を溶解し、プランクトンを検出する方法である。2つ目は酵素処理法と呼ばれる酵素により臓器を分解し、プランクトンを検出する方法である。また、近年では、これまでのようにプランクトンを顕微鏡下で観察して検出するのではなく、臓器からプランクトンDNAを抽出し、PCR法にて増幅後に電気泳動により検出する方法も報告されている。その他、心臓血の比重、電解質濃度（Swann and Spafford 1951）、心房性ナトリウム利尿ペプチド濃度（Lorente et al. 1990）、鉄濃度（Grandmaison et al. 2006）、ストロンチウム濃度（Azparren et al. 1998, 2007）といった血液生化学的なもの、肺におけるサーファクタント関連蛋白（Zhu et al. 2002）や水輸送蛋白（アクアポリン）の発現（Hayashi et al. 2009）を免疫組織化学的に

<sup>1</sup>〒890-8544 鹿児島県鹿児島市桜ヶ丘8丁目35-1 鹿児島大学大学院 医歯学総合研究科 法医学分野

<sup>1</sup>Department of Legal Medicine, Graduate School of Medical and Dental Sciences Kagoshima University, 8-35-1 Sakuragaoka, Kagoshima 890-8544, Japan

検討するもの等が報告されているが、いずれも未だ実務応用には至っていない。

本稿では従来から行われてきた臓器中のプランクトン検出に基づく検査法として「壊機法」及び「酵素処理法」、そして近年注目されている「DNA 検出法」の手技と問題点について述べる。

## 方 法

### 1) 壊機法

壊機法 (*Disorganization Procedure*) はプランクトン検査のための前処理法として一般的に使用されている。Revenstorf (1904) は珪藻が酸に対して非常に強い抵抗力を有する性質に着目し、濃硝酸と濃硫酸を用いて肺組織から珪藻を検出することに初めて成功した。その後、この方法は改良を加えられ、現在は発煙硝酸と濃硫酸を用いて有機物である臓器を溶解し、珪藻を検出する方法が広く用いられてお



図1 珪藻 *Chaetoceros* 属顕微鏡写真

り (Kasperek 1937), 吾郷ら (2004) は実際の検査手技について報告した。プランクトン検査は、溺

死診断だけではなく、検出したプランクトンの生息場所 (すなわち、海水棲か淡水棲か) によって溺死した場所を推定できるという利点もある。例えば、*Chaetoceros* 属は海水棲であるため、各臓器から検出された場合には、海で溺死したものと特定できる (図1)。日本法医学会の報告では、2008年から2010年における水中死体の発見場所は、河川が最も多く (33%), 次いで海 (30%), 海岸 (8%), 池 (6%), 河川敷 (3%) となっている (神田ほか 2012)。海で発見された水中死体であっても死亡場所が海とは限らず、河川から流れて漂着したものや、他の場所 (湖、

沼、池、浴槽内) で溺死させてから遺棄されたものの可能性もある。犯罪の見逃しを防ぐためには死亡場所の特定が必須である。しかしながら、壊機法を前処理法としたプランクトン検査は、次項の実際の方法を見るとわかるように、手技が煩雑であり時間がかかることに加えて、高温下で強酸を扱う非常に危険な方法であるが故に人体や環境に負荷がかかるという問題点があり、また、手技自体に加えて、プランクトンの種別鑑別にも熟練を要するという指摘もある。

法医解剖は令和元年には19,323件実施されており、その中で水中死体の解剖は1,000例程度である。壊機法によるプランクトン検査の実施率は約60%であり、うち87%で珪藻が検出されている (神田ほか 2012)。水中死体全例で壊機法によるプランクトン検査を実施することは理想的ではあるが現実的ではなく、代替法の開発が望まれている。

### 〈実際の方法〉

細断した各臓器をコニカルビーカーに入れ (肺は各葉10 g, 腎臓, 肝臓, 脾臓はそれぞれ20 g), 発煙硝酸 5 mlを加えると、臓器は茶褐色の煙を出して泡をたてながら溶け始める。10分程度で反応が収まってから、ホットプレート上に置き、加熱すると再び反応が始まって臓器は更に溶解する (図2A)。その後、茶褐色の透明な液体となったところで濃硫酸

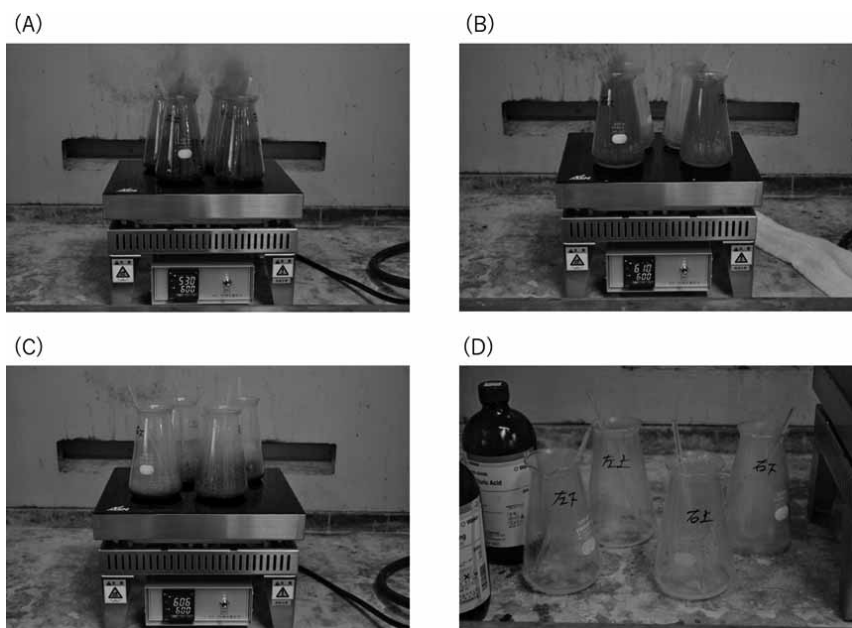


図2 壊機法の操作

- (A) 高熱下で発煙硝酸により臓器を溶解する。
- (B) 高熱下で濃硫酸+発煙硝酸により臓器を溶解する。
- (C) 溶解が進むに伴い、溶解液が黒色へと変化する。
- (D) 発煙硝酸の滴下を続けると、溶解液が透明へと変化する。

4 mlを加える (図 2 B). そのまま加熱を続けると茶褐色の煙は白色となり, 液も黒色に変わる. さらに加熱を続けると白煙は薄くなり, 液面から黒い液が飛沫状に跳ね上がるようになる (図 2 C). 飛沫がコニカルビーカーの半分の高さまで跳ね上がるようになった時点で発煙硝酸を滴下すると, 爆発音とともに激しく茶褐色の煙を発するので, さらに発煙硝酸の滴下を続ける. 液の色が薄くなり黄褐色から無色透明となったら, 滴下を終了する (図 2 D). なお, 硫酸を加えた後, 加熱を長時間続けているとビーカーの内容物が焦げ付くことがあり, この状態で発煙硝酸を滴下すると発火する可能性があるため非常に危険である. この場合はコニカルビーカーを冷却した後発煙硝酸を滴下する.

壊機後の残渣を遠心洗浄し, プレパラートの作製を行う. あらかじめホットプレート上で加熱したカバーグラスに, 一滴ずつ壊機残渣を滴下し乾燥させる. 肺については残渣の1/5量程度を, その他の臓器に関しては全量を滴下する. その後は封入剤を滴下して加熱した後に室温に戻し, スライドガラス上に載せ, カバーグラス上に重石を置いて一晩放置し, プレパラートが安定するのを待ってから検鏡する. 所要時間は, 熟練者であっても臓器の切り出しに約30分, 臓器溶解に約2時間, 洗浄及びプレパラート

作製に約3.5時間, 検鏡に約4~5時間かかる.

## 2) 酵素処理法

酵素処理法 (Enzymatic Digestion) とは, 壊機法の代替法として考案されたプランクトン検査の前処理法であり, 強酸の代わりに酵素を用いて臓器を溶解する方法である. 酵素処理法には, 古くはペプシンを用いた方法があり (Fukui 1980), 近年では Proteinase K を用いた方法が報告されている (Takeichi and Kitamura 2009; 武市ほか 2012). 壊機法と異なり強酸を使用しないため, 安全性が高い. しかしながら, 次項に実際の方法を記載するように, 臓器の溶解にかなりの時間を要する上, 酵素によって溶解されない有機物が夾雑物として混入するため, 顕微鏡下での珪藻の観察が壊機法に比べて困難となる問題点がある. また, 酵素によって溶解される珪藻も存在するため, 溺死であってもプランクトン検査が偽陰性となる可能性もある. 以上の問題点から, 酵素処理法は実用化されていない.

### 〈実際の方法 (Proteinase K を用いた方法)〉

ホルマリン固定した各臓器を水洗し, 10 g を切り出す. 切り出した組織は50mlの遠沈管に入れ, 蒸留水を加えて激しく振盪洗浄する (図 3 A). ホルマ

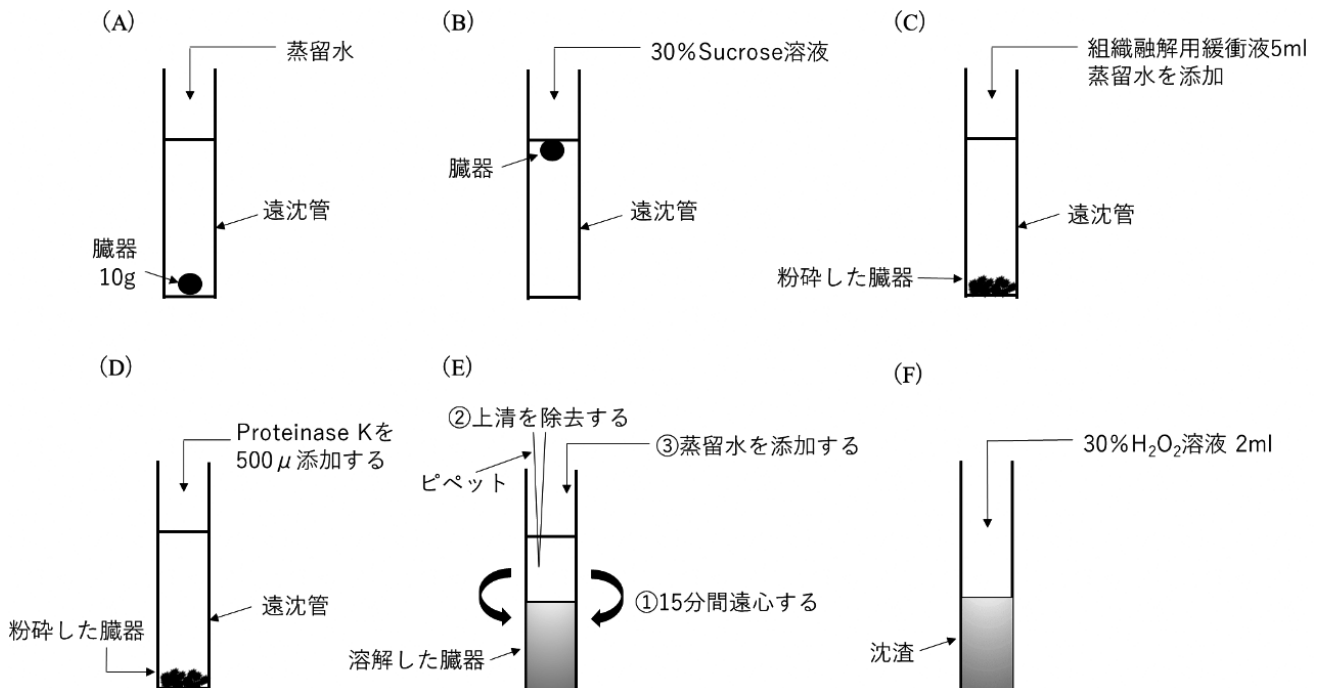


図 3 酵素処理法の操作

- (A) 臓器を蒸留水で洗浄する. (B) 臓器を Sucrose 内で -20°C で凍結する.  
 (C) 臓器をホモジナイザーで粉碎し, 121°C で加熱処理する.  
 (D) Proteinase K を加え, 50°C で一晩インキュベートする. (E) 臓器を蒸留水で洗浄する.  
 (F) 沈渣に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を加え, 80°C でインキュベートする.



リンを蒸留水で十分に洗浄した後に蒸留水を排水し、20mlの30%Sucrose溶液により組織を浮遊させた状態で-20°Cにて凍結する(図3B)。凍結後、ホモジナイザーにて粉碎し、組織融解用緩衝液5ml、蒸留水を添加して計50mlとし、121°Cで10分間の加熱処理を行う(図3C)。冷却した後10ng/mlのProteinase Kを500 $\mu$ l添加し、緩やかに振盪させながら50°Cにて一晩インキュベートする(図3D)。その後、15分間遠心し上清を除去した後、蒸留水を合計50mlまで加えるという操作を3回繰り返す(図3E)。沈渣に30% $H_2O_2$ を2ml添加し80°Cで6時間のインキュベートを行う(図3F)。十分に冷却した後に15分間遠心して上清を除去し、この沈渣をカバーグラスに滴下してホットプレート上にて乾燥後、検鏡を行う。

肺に関しては夾雑物が多いため、 $H_2O_2$ 処理後にポアサイズ5 $\mu$ mのsyringe filterにて濾過し、10mlの20%エタノールにより洗浄する。洗浄後、50mlの20%エタノールによりフィルターから吸着物を回収し、遠心後に、上清を除去した沈着物をカバーグラスに滴下して乾燥後に検鏡する。

### 3) DNA 検出法

臓器からプランクトンそのものではなく、植物プランクトンのDNAを検出し、プランクトン検査の代替法とする方法がこれまで報告されている(Suto et al. 2003, He et al. 2008)。抽出対象となる植物プランクトンは、ラン藻類のピコプランクトンで、ターゲットは23S rRNA gene (rDNA) や16S rDNAである。ピコプランクトンは淡水、海水を問わず広域に生息し、細胞サイズが小さいという特徴を有する。そのため、肺胞内に流入した溺死水から血管内に流入しやすく、臓器から検出されやすいと考えられている。例えば、Kane et al. (1996) は、溺死と診断された死体から採取した肺からピコプランクトンのPCR産物が検出されたと報告している。PCR検査を一般業務として導入する場合の問題点としてはDNA抽出の煩雑さ、抽出・検出に関わる機器調達や各法医解剖実施機関での習熟度の違いが挙げられる。例えば、Zhonghaoら(2021)は溺死体から23S rDNAや珪藻の葉緑体geneであるrbcLをSYBR greenを用いたreal-time PCR法により検出する方法を報告したが、DNA抽出の手技が煩雑であるという難点がある。一方、Tieら(2010)は、DNA抽出の必要が無い16S rDNAをダイレクトPCR法にて検出する手法を報告した。しかしながら、16S rDNA

ダイレクトPCR検出法は、PCR産物を電気泳動法で検出する方法しか考案されておらず、煩雑さや習熟度の問題は未だ解決されていない。以下の〈実際の方法〉では、一般的なPCR法、SYBR greenを用いたreal-time PCR法及びダイレクトPCR法について紹介する。

#### 〈実際の方法〉

##### 1) 一般的なPCR法

壊機法と同様、溺死体から肺(左肺上葉・下葉、右肺上葉・下葉)、腎臓(左腎、右腎)、肝臓、脾臓の各臓器を摘出する。各臓器からは最大30mg切り出し、organic抽出法・スピニング法・磁性ビーズ法のいずれかの方法によりDNAを抽出する。抽出後、ラン藻のピコプランクトン16S rDNAの塩基配列に基づいてプライマーを作成し、PCRにて増幅反応を行う(94°C 30秒, 60°C 30秒, 72°C 30秒, 30サイクル)。プライマーの一例(鉄ほか2010)を表1に示す。PCR後は電気泳動法にて目的の16S rDNAのバンドを目視で確認し、バンドが存在していれば溺死、バンドがなければ溺死ではないと判定する。

##### 2) SYBR greenを用いたreal-time PCR法

溺死体から肺、腎臓、肝臓の各臓器を摘出し、最大200mg切り出す。Proteinase Kにより臓器を56°C、3時間インキュベートし、溶解する。溶解液を遠心分離し、上清からPowerSoil™ DNA Isolation Kit (Qiagen, USA) を使用してDNAを抽出する。抽出したDNAをtemplateとして、QuantStudio™ 7 flex real-time PCR system (Thermo Fisher Scientific, USA) を用いてreal-time PCRを実施する。増幅された遺伝子産物はリアルタイムに確認できるため、PCR後の電気泳動法は必要ない。

##### 3) ダイレクトPCR法

溺死体から肺、腎臓、肝臓の各臓器を摘出し、最大30mg切り出す。各臓器を界面活性剤及びProteinase Kを含むDigest bufferで溶解し、その溶液をPCR反応の試料としてPCRを実施する。増幅

表1 ラン藻ピコプラント16S rDNAのプライマーリスト

Forward: 5'-CGTCTGATTAGCTAGTTGGT-3'  
Reverse: 5'-CCCAATAATTCGCGATAACG-3'

鉄 堅ほか. 2010. 直接PCR法による臓器からの植物プランクトンDNA検出について. DNA多型 18: 215-18

された遺伝子産物は5%のポリアクリルアミドゲルを用いて300Vで30分間電気泳動を行い、バンドを目視で確認する。

## 考 察

### 1) 従来の検査法の問題点

本稿では溺死診断のための検査法として、壊機法及び酵素処理法によるプランクトン検査、並びにDNA検出法を紹介した。各検査法の長所としては、壊機法では溺死診断だけではなく溺水場所の推定も可能であること、酵素処理法やDNA検出法は安全な手技であることが挙げられる。一方、各検査法の短所としては、壊機法では手技の煩雑さ、作業に長時間かかること、並びに作業の危険性があり、酵素処理法では時間がかかる割に夾雑物が多く、プランクトンが検出しにくい場合があること、DNA検出法は操作や手技が煩雑であり、機器が高価であること等が挙げられる。さらに、これまで報告されている方法では溺死か否かを判断するには有用であるが、溺水場所を特定することはできない。溺水場所を特定するためには、川・海・用水路・池等に特異的に生息していることが報告されている植物プランクトン（主に珪藻）のDNAを検出する必要がある。これら検査法は解剖と同時に実施することが理想であるが、年々水中死体の解剖数は増加傾向にあり、人員の限られる法医学では全例実施することは現実的ではない。そのため、簡便に実施可能かつ精度が高く、溺水場所が推定可能な代替法の開発が望まれており、筆者らは珪藻類のダイレクト real-time PCR法（図4）を候補の一つとして考えており、2) 新たな検査法の提案で具体的に紹介する。

### 2) 新たな検査法の提案

従来のPCR法の手順はDNAの抽出、PCRの実施及び電気泳動法による目視でのバンドの確認であったが、DNAの抽出及び電気泳動の操作が煩雑であることから、DNAの抽出が必要ないダイレクトPCR及び電気泳動が必要ないreal-time PCRが開発された。しかしながら、ダイレクトPCRとreal-time PCRを組み合わせた方法を植物プランクトン検出に用いた報告は未だなされていない。そこで我々は、溺死体の溺水

場所推定が可能な新規簡易検査法としてダイレクト real-time PCR法を提案する。

#### 〈実際の手法〉

溺死体から肺（左肺上葉・下葉，右肺上葉・下葉），腎臓（左腎，右腎），肝臓，脾臓の各臓器を摘出する。各臓器からは最大30mg切り出し，SYBR Green Extract-N-Amp™ Plant PCR Kit（Sigma-Aldrich, USA）のExtract Solution 100µlに浸漬しボルテックス，95°C，10分間インキュベートする。その後，浸漬液をtemplateとしてreal-time PCRを実施する。Real-time PCRのreaction mixture（全量20µl）は以下の通りである；template 4µl，SYBR Green Extract-N-Amp PCR Ready Mix 10µl，プライマー（Forward, Reverse）2µl，reference dye 1µl，RNase DNase free water 1µl。現在作製済みのプライマーは*Nitzschia* 18S rRNA, *Fragilaria α-tubulin*, *Navicula IBP*, *Navicula β-actin*, *Fragilaria β-tubulin*, *rbcL*, 23S rRNAであり，海・川両方に多数生息する植物プランクトンをターゲットとしている。以上のプライマーを用いた検討で有用であると証明された後には，例えば海水棲である*Chaetoceros*等の海・川にそれぞれ特異的な植物プランクトン種のプライマーを作製し，溺水場所推定を試みる予定である。これにより，溺死者から検出される植物プランクトンの種構成がある程度復元可能となると考える。なお，対照として溺死体が発見された場所の水を採取し，増幅効率に差が出ないか確認を行う。最終的には，複数の植物プランクトン種のDNA部分配列を配置したマイクロアレイを作製することで，プランクトン種構成が高精度に復元可能と考える。

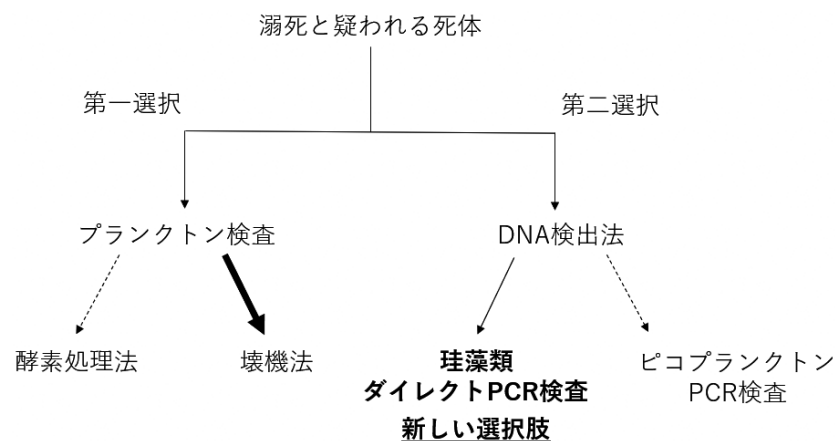


図4 溺死診断のための珪藻の検出方法

## 結 語

本稿では従来から行われてきた臓器中のプランクトン検出に基づく検査法として壊機法及び酵素処理法, そして近年注目されている DNA 検出法の手技と問題点について述べた. いずれも長所と短所があり, 現状では画一された検査法として普及しておらず, 各法医機関は独自の方法で検査を行っている. そこで我々は新規簡易検査法としてダイレクト real-time PCR 法を考案した. ダイレクト PCR 法, real-time PCR 法のいずれも植物プランクトン検出に成功しており, ダイレクト real-time PCR 法も実現可能と思われる. この方法が有用であると確認されれば, 今後法医機関における溺死体の死因・溺水場所推定法として普及すると考えられる. 一方で, 法医解剖で溺死体から検出された植物プランクトン種に関する詳細な報告はなされておらず, 法医実務に応用可能な植物プランクトンライブラリーは作製されていない. ダイレクト real-time PCR 法の更なる有効活用のためには, 溺死体から検出された植物プランクトンライブラリーの作製及び海水域から淡水域までに生息する植物プランクトンを網羅する DNA ライブラリーの作製が必要であり, それには植物プランクトン研究者との協力体制の構築が重要であると考えられる.

## 引用文献

吾郷一利・吾郷美保子・小片 守. 2004. 砂皿上壊機法によるプランクトン検査手技. 法医病理 10, 35-39.

青木康博・近藤稔和・木下博之. 2020. 窒息死体の見方. 死体検案ハンドブック 第4版. 100pp., 金芳堂, 京都.

Azparren J.E., Perucha E., Martínez P., Muñoz R., Vallejo G. 2007. Factors affecting strontium absorption in drownings. *Forensic Sci. Int.* 168: 138-42.

Azparren J.E., Vallejo G., Reyes E., Herranz A., Sancho M. 1998. Study of the diagnostic value of strontium, chloride, haemoglobin and diatoms in immersion cases. *Forensic Sci. Int.* 91: 123-32.

Fukui Y., Hata M., Takahashi S., Matsubara K. 1980. A new method for detecting diatoms in human organs. *Forensic Sci. Int.* 16: 67-74.

Grandmaison G.L., Leterreux M., Lasseguette K., Alvarez J.C., Mazancourt P., Durigon M. 2006. Study of the diagnostic value of iron in fresh water drowning. *Forensic Sci. Int.* 157: 117-20.

Hayashi T., Ishida Y., Mizunuma S., Kimura A., Kondo T. 2009. Differential diagnosis between freshwater drowning and saltwater drowning based on intrapulmonary aquaporin-5 expression. *Int. J. Legal Med.* 123: 7-13.

He F., Huang D., Liu L., Shu X., Yin H., Li X. 2008. A novel

PCR-DGGE-based method for identifying plankton 16S rDNA for the diagnosis of drowning. *Forensic Sci. Int.* 176: 152-6.

Kane M., Fukunaga T., Maeda H., Nishi K. 1996. The detection of picoplankton 16S rDNA in cases of drowning. *Int. J. Legal Med.* 108: 323-6.

Kasperek B. 1937. Beiträge zur Diagnose des Ertrinkungstodes durch den Nachweis von Planktonorganismen in Lunge und Duodenum. *Dtsch. Z. Gesamte. Gerichtl. Med.* 27: 132-42.

神田芳郎・玉木敬二・上野康弘・大澤資樹・妹尾 洋・羽竹勝彦・山崎健太郎. 2012. 水中死体事例の調査. 日本法医学会課題調査報告. 12pp. 日本法医学会, 東京.

Lorente J.A., Villanueva E., Hernández-Cueto C., Luna J.D. 1990. Plasmatic levels of atrial natriuretic peptide (ANP) in drowning. A pilot study. *Forensic Sci. Int.* 44: 69-75.

Mueller B. and Gorgs D. 1949. Studien über das Eindringen von corpusculären Wasserbestandteilen aus den Lungenalveolen in den Kreislauf während des Ertrinkungsvorganges. *Dtsch. Z. Gesamte. Gerichtl. Med.* 39: 715-25.

長尾正崇・加藤秀章・佐藤善宣. 2012. 窒息(溺死). 臨床法医学テキスト 第2版136pp., 中外医学社, 東京.

Revenstorf V. 1904. Der nachweis der aspirierten ertränkungsflüssigkeit als kriterium des todes durch ertrinken [The proof of aspirated drowning fluid as a criterion of death by drowning]. *Vierteljahresschr. Gerichtl. Med.* 27: 274-9.

Suto M., Abe S., Nakamura H., Suzuki T., Itoh T., Kochi H., Hoshiai G., Hiraiwa K. 2003. Phytoplankton gene detection in drowned rabbits. *Leg. Med.* 5 Suppl 1: 142-4.

Swann H.G. and Spafford N.R. 1951. Body salt and water changes during fresh and sea water drowning. *Tex. Rep. Biol. Med.* 9: 356-82.

Takeichi T. and Kitamura O. 2009. Detection of diatom in formalin-fixed tissue by proteinase K digestion. *Forensic Sci. Int.* 190: 19-23.

武市敏明・王 璐・北村 修. 2012. ホルマリン固定臓器の酵素処理によるプランクトン検査におけるフィルター濾過の応用. 法医学の実際と研究. 55: 99-103.

Tie J., Uchigasaki S., Haseba T., Ohno Y., Isahai I., Oshida S. 2010. Direct and rapid PCR amplification using digested tissues for the diagnosis of drowning. *Electrophoresis* 31: 2411-5.

鉄 堅・内ヶ崎西作・飯酒盃 勇・押田茂貫・長谷場 健・大野曜吉・堤 博文・伊澤 光・小室歳信. 2010. 直接 PCR 法による臓器からの植物プランクトン DNA 検出について. *DNA 多型* 18: 215-18.

Zhonghao Y., Quyi X., Cheng X., Huan L., Weibin W., Weian D., Jian Z., Hong L., Huijun W., Chao L. 2021. SYBR green real-time qPCR method: Diagnose drowning more rapidly and accurately. *Forensic Sci. Int.* 321: 110720

Zhu B.L., Ishida K., Quan L., Li D.R., Taniguchi M., Fujita M.Q., Maeda H., Tsuji T. 2002. Pulmonary immunohistochemistry and serum levels of a surfactant-associated protein A in fatal drowning. *Leg. Med.* 4: 1-6.

(Received Sept. 10, 2021; accepted Oct. 30, 2021)