

익사에서 규조류 검사 방법과 신뢰도의 진전

허기영

부산대학교 의학전문대학원
법의학교실

Received: April 30, 2020
Revised: May 23, 2020
Accepted: May 26, 2020

Correspondence to

Gi Yeong Huh
Department of Forensic Medicine,
Pusan National University School
of Medicine, 49 Busandaehak-ro,
Mulgeum-eup, Yangsan 50612, Korea
Tel: +82-51-510-8058
Fax: +82-51-510-8143
E-mail: gyhuh@pusan.ac.kr

Progress in Method and Reliability of Diatom Test in Drowning

Gi Yeong Huh

Department of Forensic Medicine, Pusan National University School of Medicine, Yangsan, Korea

The forensic significance of the diatom test in diagnosing death due to drowning has been controversial for a long time as diatoms are detected in the non-drowning cases as well. This false positivity may originate from the ante-mortem as well as postmortem penetration of the diatoms into the bodies. Another problem with the diatom test is the lack of standardization among the different kinds of diatom extraction and identification methods. The author first reviewed the progress in the methods used in the diatom test and then studied the historical arguments in the diagnosis of drowning. Lastly, the research trend in the diatom test since 2000 was evaluated by classifying the manuscripts searched using the keyword “drowning and diatom” on PubMed. Recent studies tend to support the reliability of the diatom test in the diagnosis of drowning when quantitative and qualitative analyses are performed properly with maximum possible reduction in contamination during the preparation of the test samples.

Key Words: Diatoms; Drowning; Diagnosis; Research; Review

서 론

수중시체가 발견된 경우 사망원인을 익사로 진단하는 것은 쉽지 않다. 익사의 전형적인 소견인 입, 코 및 기도에 잘고, 흰 포말은 부패가 시작되면 사라지게 되고, 실제로 많은 경우에 부패가 진행된 상태로 발견되는데, 이런 경우 익사 여부에 대한 판단은 더욱 더 힘들어지게 된다. 익사를 진단하기 위한 보조적인 검사 방법으로 조직학적, 혈액학적, 화학적인 방법 등 다양한 도구들을 제시하고 있지만 진단적 한계를 가지고 있다.

한편 익사에서 규조류 검사는 1904년 Revenstorff가 처음

으로 시도한 이후[1], 익사의 진단에 중요한 도구가 되어 오고 있다. 규조류는 2 μ m에서 2 mm까지의 다양한 크기로 분포하는 단세포 조류로, 대표적인 식물성 플랑크톤이며, 독특한 다공성 실리카 껍질(frustules) 형태에 따라 분리하였을 때 약 10만종 이상이 존재하는 것으로 추정된다[2]. 규조류는 염수와 담수에 서식하는 종이 다르며, 통상 수질 오염도를 평가하는 데 이용되기도 한다. 전통적인 규조류 검사는 실리카 껍질이 강산에 쉽게 녹지 않는 성질을 이용한다. 익사로 추정되는 경우 익수매질(drowning media)과 인체 조직에서 동일한 종의 규조류의 검출은 익사 지역을 추정하는 것뿐만 아니라 익사를 진단하는 데 이용되어 오고 있다. 하지만 익사에서

규조류 검사에 대한 논란은 계속되고 있는데, 그 이유를 위음성과 위양성의 문제로 나눌 수 있다. 위음성은 입수 후 매우 짧은 시간 내 사망하거나, 계절의 변화에 따른 규조류 양의 변화로 인해 상당수 익사 사례에서 규조류가 검출되지 않는다는 사실에 근거를 두고 있다. 더 문제가 되는 것은 위양성인데, 수중시체에서 사후 오염에 의해 위양성이 생길 수 있을 뿐만 아니라, 비수중시체에서도 규조류가 검출될 수도 있다는 사실이다. 이러한 위양성 때문에 익사의 진단에 사용할 수 없다고 하는 단정적인 견해도 있었다. 규조류 검사의 또 다른 문제는 방법, 동정 및 해석하는 과정에 대한 표준화가 없이 각 실험실마다 서로 다른 방법들을 사용하고 있어, 연구결과들을 쉽게 비교하기 어려운 점이 있다. 규조류 검사가 가지고 있는 이러한 한계점들을 극복하기 위해 새로운 검사 방법에 대한 연구 결과들이 계속 발표되고 있다.

본 연구는 익사 진단에서 규조류 검사의 방법, 위양성에 대한 논란 및 최신 연구에 대한 문헌을 고찰하여 규조류 검사에 대한 전반적인 이해의 폭을 넓혀 실제 실무에 적용하고자 하였다.

본 론

1. 규조류 검사 방법

익사에서 규조류 검사의 이론적 근거는 생존한 상태에서 입수하여 물을 흡입하게 되면 물에 포함되어 있는 규조류가 폐포에 도착하게 되고, 이후 규조류가 폐포-모세혈관 벽을 뚫고 혈액을 따라 순환하여 전신 장기에 분포한다는 사실을 기반으로 두고 있다[3]. 따라서 규조류 검사는 일차적으로 폐 조직을 대상으로 하며, 이차적으로 주요 순환장기인 간, 신장, 뇌 및 골수에서 규조류를 검출하는 것이다. 이론적으로는 모든 장기에서 규조류를 검출할 수 있지만 이 중 골수가 오염에 의한 영향을 가장 적게 받기 때문에 익사를 증명할 수 있는 가장 좋은 조직으로 알려져 있다[4,5]. 장기 조직에서 규조류를 검사를 하는 것이 통상적이나, 조직이 아닌 체액, 예를 들면 접형동 체액에서 폐 조직에서 보다 많은 규조류를 검출하였다는 보고도 있다[6].

(1) 직접 검출방법

장기 조직에서 규조류 검사는 먼저 조직의 유기조직을 소화시킨 후 남아 있는 규조류를 직접 검출하여 관찰하는 전통적인 방법과 간접적으로 규조류의 DNA를 대상으로 존재 여부를 확인하는 방법으로 나눌 수 있다. 하지만 대부분의 실무에서는 여전히 전통적인 직접 검출법을 이용하고 있다. 직접 검출하는 방법 중, 조직을 태운 뒤 나오는 재에 포함되어 있는 규조류를 검사하는 회화법(ashing method)도 오래 전에 소

개되었지만[7], 현재 대부분의 규조류 검사는 장기 조직을 화학 및 효소적으로 소화시키는 방법을 적용하고 있다.

1) 추출법

장기 조직에서 규조류 검사 과정은 3가지 단계로 구분된다. 조직을 소화시켜 규조류만 추출하는 단계, 원심분리 또는 막투과를 이용하여 규조류를 포집하는 단계, 광학현미경 또는 주사전자현미경으로 규조류를 확인하고 동정하는 단계로 구성된다. 추출법으로는 질산과 같은 강산으로 조직을 소화시킨 다음 규조류를 추출하는 방법이 가장 먼저 소개되었고, 이후 proteinase K를 이용한 효소성 조직 소화법, 용해보조제(solubilizer)인 Soluene-350 처리법 등이 추가되었다[8]. 조직 소화법 종류에 대한 내용을 Table 1에 정리하였다. 이 중 강산처리법의 단점을 보완하기 위해 규조류 추출만을 위해 틀루엔에 4차 수산화암모늄이 포함된 용액으로 구성된 Soluene-350을 개발하여 규조류 검사에 적용하기도 하였는데, 이 용액은 담수의 규조류 검출에 도움을 주지만 해수 규조류의 실리카 껍질을 용해하는 단점이 있는 것으로 알려져 있어[8,9], 최근 문헌에는 거의 찾아볼 수 없다.

강산처리법 중 질산을 이용한 규조류 추출방법은 1940년대 후반부터 문헌에 기록되어 있을 정도로 오랜 역사를 가지고 있다. 질산 소화법은 경비가 적게 들고, 쉽게 할 수 있고, 좋은 결과를 낼 수 있어 현재에도 세계적으로 널리 사용되고

Table 1. Types of digestion methods used in diatom test

Type	Main constituent	Facilitator ^{a)}	Selected reference	
Strong acid	Nitric acid	-	[7]	
	Nitric acid	Hydrogen peroxide	[8]	
	Nitric acid	Disorganization can	[17]	
	Nitric acid	Microwave, hydrogen peroxide	[18]	
	Hydrochloric acid	-	[10]	
	Sulfuric acid	-	[11]	
	Lefort Aqua Regia solution	-	[12]	
	Enzyme	Proteinase K	-	[13]
		Proteinase K	Hydrochloric acid	[14]
Papain		Hydrochloric acid	[15]	
Solubilizer	Soluene-350	Ultrasonic irradiation	[16]	
	Soluene-350	-	[9]	

^{a)}Facilitators; reagents or instruments facilitate the process of digestion.

있다. 단점으로는 시간이 많이 걸리고 작업자나 실험실에 모두 위험하며 구조류를 일부 파괴할 수 있다. 질산과 함께 과산화수소를 첨가하여 질산의 조직 소화법을 촉진시키는 방법을 사용하기도 한다[8]. 질산 대신에 다른 강산을 사용하기도 하는데, 20% 염산을 이용한 방법이 좀 더 간단하고 조직을 소화하는 데 시간이 적게 걸린다는 연구도 있으며, 황산을 이용해서 조직을 소화하는 방법도 소개되었다[10,11]. 또한 질산과 염산을 3:1로 혼합하여 만든 용액인 Lefort Aqua Regia Solution이 통상의 강산 소화법보다 소화력이 높았으며, 구조류의 구조도 거의 손상이 없이 유지되었다는 보고를 하였다[12].

1993년 Kobayashi 등[13]은 proteinase K를 이용하여 조직을 소화시키는 방법을 처음 소개하였는데, 강산처리법에 비해 단순하고, 안전하며 강산처리법에 의해 파괴되는 동물플랑크톤을 검출하는 데 효과적이었다는 보고를 하였다. Hong 등[19]은 proteinase K 소화법을 적용해서 해수에서 구조류를 검출한 결과 전통적인 강산처리법에 비해 높은 회수율을 보였으며, 구조류의 형태가 잘 보존되었다고 하였다. Ming 등[8]의 연구에 의하면 강산처리법, Soluene-350 처리법, proteinase K 처리법 중 조직 소화 능력에 있어서는 proteinase K법이 가장 효과적이라는 보고를 하였다. 한편 proteinase K 소화법에서 시간이 많이 걸리는 단점을 줄이기 위해 강산인 염산을 추가하여 3시간 내 구조류를 검출할 수 있도록 하는 신속 방법이 고안되기도 했다[14]. 최근에는 papain의 단백분해효소의 능력을 이용해서 조직 소화를 촉진하는 방법을 소개하여 proteinase K 소화법보다 더 우수한 소화력을 보였으며, 전통적인 강산법보다는 시간이 덜 걸리고, 덜 위험하며, 비용도 적게 드는 것으로 소개하고 있어 주목이 된다[15].

기존의 강산처리법에 의한 조직 소화를 촉진시키기 위해 초음파조사(ultrasonic irradiation)를 추가로 사용하기도 하였다[16]. Yange 등[17]은 열과 압력에 저항하는 테플론 깡통을 제작하여 얇게 자른 조직과 강산을 내부 용기에 넣고 스크루로 닫은 후, 일정 시간 깡통을 120°C에 두어 강산 소화법의 효과를 증강시켰다고 하였다. 최근에는 강산처리법에 특별히 고안한 마이크로파 소화 시스템(microwave digestion system)을 추가하여 조직 소화를 촉진한 방법도 고안되었다[18,20,21].

2) 포집 및 관찰법

통상의 구조류 포집은 조직을 소화시켜 남은 용액에 증류수를 넣고 저속원심분리기로 2,500-4,000 rpm, 15-25분간 원심분리한 다음 상층액을 버리고 남은 침전물을 모으는 순서로 이루어진다. 원심분리를 통한 구조류 포집법이 상당한 양의 구조류 소실을 보일 수 있다는 연구 결과도 있다. 조직 소

화 용액을 4,000 rpm으로 15분간 원심분리를 하여 상층액을 버리면 30% 이상의 구조류의 소실을 보인다는 연구 결과가 있다[20]. 이러한 원심분리로 인한 구조류 소실을 줄이기 위해 자체적으로 고안한 진공 펌프를 이용하여 나일론 막에 구조류를 흡착시켜 주사전자현미경으로 관찰하려는 시도가 있다[18,20,21].

포집된 구조류를 관찰하는 방법은 원심분리 후 침전물을 유리 슬라이드에 도말한 다음나프락스(Naphrax)로 봉입하여 단순 광학현미경 또는 위상차 현미경으로 관찰하는 것이 보통이다. 광학현미경에서 어떤 배율로 관찰해야 하는가에 대한 의견이 많지만 크기가 매우 작은 구조류가 골수에 갈 수 있다는 사실에 입각하여 유침법(oil immersion)으로 1,000배 시야에서 구조류 뚜껑(배각, valve)이나 뚜껑 절편을 동정하여 수를 세고, 최대 길이를 측정하는 방법이 추천된다고 하였다[22]. 광학현미경보다는 주사전자현미경으로 구조류를 관찰하는 것이 해상력이 더 좋으며, 가장 작은 구조류나 구조류 절편을 동정하는 데 장점이 있다는 주장들도 있다[18,20,21,23]. 관찰된 구조류의 종류를 분류하는 일은 통상 경험이 많은 전문가에 의해 이루어지지만, 최근에는 구조류를 도말한 슬라이드를 스캔한 파일을 통해 자동으로 종류를 분류하려는 시도인 Automatic Diatom Identification And Classification (ADIAC) 사업이 진행되기도 하였다[24]. 하지만 대부분의 경우 지지분한 배경을 가지고 있는 법의학적 구조류 시료를 대상으로 자동 분류법을 적용하는 일은 용이하지 않은 것으로 보인다. 최근에는 통상의 강산 처리법으로 만든 구조류 도말 슬라이드 영상을 인공지능으로 분석을 하여 구조류를 동정하는 방법을 시도하였는데, 구조류 정량에 숙련된 5명의 법의병리의사들과 견줄 정도의 수행력을 보였다는 보고를 하고 있어 향후 구조류 동정에서 인공지능의 역할이 주목된다[25].

3) 의사를 진단할 수 있는 양적 기준

의사를 진단하는 구조류의 양적 기준은 연구자마다 다르다. 그리고, 구조류 검사에서 폐 이외에 어떤 장기를 검사해야 하는가에 대한 통일된 의견은 없지만 기본적으로 폐, 혈액 및 골수를 검사해야 하고, 위, 십이지장 내용물, 신장 및 간을 대체 시료로 보존해야 한다는 주장이 있다[22]. 특정 장기에 구조류가 단순히 존재한다는 사실만으로도 큰 의미가 있다는 연구부터 위양성으로 인해 구조류 검사 자체를 부정하는 연구들도 있어 일률적으로 기준을 정하기는 어렵지만 구조류 검사를 옹호하는 연구자들에 의해 제시된 양적 기준을 Table 2에 정리하였다.

Auer와 Mottonen [26]은 폐 조직에서 현미경 슬라이드 개당 20개 이상의 구조류가 관찰되면 의사로 진단할 수 있는 양적 기준을 제시하였다. Farrugia와 Ludes [27]는 폐 조

Table 2. Quantitative criteria of positive diatom test in drowning proposed by researchers

Study	Lung (weight and volume digested)	Bone marrow (weight digested)	Other organs (weight digested)	Digestion/identification method
Auer and Mottonen [26]	≥20/slide (10 g)	–	–	Nitric acid+hydrogen peroxide/LM
Farrugia and Ludes [27]	≥20/100 μL of a pellet sediment (2 g)	>5/100 μL of a pellet sediment with complete diatom (2 g)	>5/100 μL of a pellet sediment in brain, liver, kidney, with complete diatom (each 2 g)	Nitric acid and proteinase K/LM
Pollanen et al. [36]	–	>1/slide (~50 g)	–	Nitric acid/LM
Zhao et al. [28]	L/D ratio >1 (2 g lung, 10–50 mL drowning media)	–	–	Nitric acid+hydrogen peroxide/ MD-VF-Auto SEM method
Shen et al. [29]	–	–	>10 in liver or kidney (each 10 g)	Nitric acid+hydrogen peroxide/MD-VF-Auto SEM method

LM, light microscopy, L/D ratio, the ratio of diatom numbers in the lung tissue (L) and the drowning medium (D); MD-VF-Auto SEM method, microwave digestion-vacuum filtration-automated scanning electron microscopy.

직 2 g에서 추출한 침전물 100 μL당 최소 20개 이상의 규조류가 검출될 때, 그리고 뇌, 신장, 간 및 골수 조직 각각 2 g에서 추출한 침전물 100 μL당 완전한 형태의 규조류가 5개 이상일 때 익사로 진단할 수 있다고 하였다. Pollanen [5]는 골수 조직에서 현미경 슬라이드 개당 1개 이상의 규조류만 검출되어도 익사의 가능성이 있다고 하였다. Zhao 등[28]의 연구에 의하면 폐와 익수매질에서 규조류 수를 비교한 L/D ratio가 1 이상인 경우 익사의 의미가 있다고 하였다. Shen 등[29]은 간 또는 신장 각각 10 g에서 10개 이상의 규조류가 검출되면 익사의 가능성이 있다고 하였다.

4) 익수 위치 추정을 위한 질적 분석

규조류 검사를 통한 익사의 진단은 수중시체에서 관찰되는 규조류의 양적 평가뿐만 아니라, 익수매질에 있는 규조류 무리와 질적인 분석을 통해 이루어진다. 즉, 수중시체 내부 장기에서 존재하는 규조류와 익수 추정 장소의 익수매질에 있는 규조류 무리와 비교가 필수적이다. 이러한 목적을 이루기 위해서는 익수 추정 장소의 물이나 돌을 문질러서 얻은 물을 채취하여 검사하는 것이 기본이다. 만약에 물 표본이 여의치 않는 경우에는 지속적으로 물 관리를 하는 기관의 규조류 자료를 이용해서 비교하는 경우도 있다[30,31]. 이런 경우 규조류 농도는 계절적 차이가 있기 때문에 주어진 달에 가장 흔한 5종의 규조류 프로파일을 만들어 폐에서 발견된 규조류와 익수 추정 위치의 규조류 무리와 비교한다. 폐와 익수매질에서 규조류의 질적 분석은 가장 흔히 관찰되는 규조류의 상대적 분포를 단순히 비교하여 일치율(concordance)을 구하는 경우도 있다[31]. 좀 더 심층적인 질적 분석을 위해서는 장기에서의 규조류와 익수매질의 규조류 사이의 유사도 지표를 이용한다. 이러한 유사도 지표로 두 시료사이의 종 유사

도 지표인 종 지수(species index)와 두 시료 사이의 상대적인 발생 유사도 지표인 종우점도 지수(dominance identity index)를 수학적으로 계산해서 비교한다[22].

(2) 기타 규조류 검출 방법

2013년 Seo 등[32]은 심장혈에서 무질서유발제(chaotropic agent)가 존재하는 상황에서 규조류 껍질의 DNA 결합력을 이용하여 혈액에서 규조류를 확인하고 정제하는 방법을 시도하기도 하였다. 직접 규조류를 형태학적으로 관찰하는 대신에 유전적인 특성을 이용하여 간접적으로 확인하기 위한 연구도 하고 있다. 중합효소연쇄반응-변성 구배 젤 전기영동(polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis) 방법으로 실험동물 익사체의 장기에서 플랑크톤 16S rDNA를 검출한 연구도 있으며, 18S rDNA 서열을 바코드 유전자(barcode gene)로 하여 규조류를 종 수준으로 분석하여 분류하는 연구도 있다[33,34].

2. 규조류 검사에 대한 논란

익사에서 규조류 검사의 의의에 대해 오래 전부터 논란이 되어 오고 있다. 규조류 검사에 대한 비판적인 견해와 긍정적인 견해를 연대순으로 고찰하고자 한다.

(1) 비판적인 견해

규조류 검사의 논란에 가장 중요한 쟁점은 익사가 아닌 사례에서도 규조류가 검출된다는 점이다. 1963년 Spitz와 Schneider [35]는 비익사군 22예 중 21예의 간에서 규조류가 검출되었고, 동물실험에서도 규조토가 포함된 사료를 먹인 경우 90%에서 규조류가 검출되었으며, 방사능 검출을 위한

공기 필터 밴드에서도 규조류가 검출되어, 익사에서 규조류 검사는 가치가 없다고 하였다. 1979년 Gylseth와 Mowe [37]는 규조류의 구성 성분인 실리카는 절연체로 광범위한 소비재에 포함되어 있어, 이러한 소비재가 파손되는 경우, 구조도 채광, 생산을 통해 노출되는 경우에 실리카가 폐에 축적될 수 있기 때문에 폐에서 규조류가 검출된다는 사실만으로는 익사의 증거가 될 수 없다고 하였다. 익사에서 규조류 검사에 대해 부정적인 면으로 가장 많이 인용되는 1983년 Foged [38]의 연구에 의하면 익사군 4예, 비익사군 4예 모두에서 폐, 신장, 간, 척추 및 대퇴골 골수에서 규조류가 검출되며, 익사군과 비익사군에서 검출되는 규조류의 무리 구성에 어떤 차이도 없는 소견으로 보아 인체 장기에는 정상적으로 규조류가 존재하기 때문에 규조류 검사가 익사의 진단 도구로서는 사용할 수 없다고 단정적으로 주장하였다.

(2) 긍정적인 견해

1967년 Neidhart와 Greendyke [39]는 익사체 43예 중 36예의 폐에서, 익사체 19예 중 8예에서 간 또는 신장에서 규조류가 검출되었으나, 비익사체 15예에서는 폐 또는 다른 장기에서 규조류가 검출되지 않았다고 하였다. 1978년 Peabody [40]는 골수에서 검출되는 규조류의 수는 항상 매우 적기 때문에 골수에 규조류가 존재하는 것은 익사에 의한 사망을 의미한다고 하였다. 1988년 Auer와 Mottonen [26]는 익사하였거나 익사로 추정되는 107예, 대조군 15예를 대상으로 규조류 검사를 한 결과 폐를 제외한 장기에서 규조류가 발견되면, 폐에서도 규조류가 발견되었고, 폐에 규조류가 없으면 다른 장기에서도 규조류가 없었으며, 질병으로 사망한 대조군에서는 규조류가 검출되지 않았다고 하였다. 1994년 Ludes 등[7]은 부패된 침수(immersed) 시체의 대부분에서 규조류가 존재하였지만 익사 외 다른 원인으로 사망한 대조군 모두에서 규조류가 검출되지 않았다고 하였다.

단일 사례 연구로 가장 많은 예를 분석한 1997년 Pollanen 등[36]의 연구에 의하면 738예의 담수 익사, 33예의 생활용수 익사 사례를 대상으로 대퇴골 골수에서 규조류를 검사한 결과, 담수 익사 사례의 28%, 생활용수 익사의 12%에서 대퇴골 골수에서 규조류가 검출되었으며, 규조류 검출 빈도는 익수매질의 월별 규조류 양의 변이와 상관이 있었다고 하였다. 이 연구에서 보이는 높은 위양성은 오히려 위양성이 드물다는 것을 반증하고, 규조류가 없거나 거의 없는 생활용수 익사 예에서는 음성 결과를 보였으며, 동일한 물에 익사한 경우 골수에서 동일한 규조류 종을 보인다는 근거를 들어 익사의 진단에 규조류 검사의 타당성을 지지하였다.

2011년 Bortolotti 등[41]은 수중시체 20예를 조사한 결과 모든 예의 폐에서 규조류가 검출되었고 6예에서는 흉골에서 검출되었지만, 비익사군 45예 모두에서 폐와 흉골에서 규조

류를 검출하지 못하였다고 하였다. 2013년 Lunetta 등[42]의 연구에 의하면 비익사군 14예 중 6예에서 단지 9개의 규조류를 검출하였는데, 6예 모두 단일 장기에 양성을 보였다. 9개의 규조류 중 6개는 골수, 2개는 폐, 1개는 흉수에서 검출되었으며, 뇌, 간, 신장, 혈액에서는 검출되지 않았다고 하였다. 2019년 Shen 등[29]은 MD-VF-Auto SEM (microwave digestion-vacuum filtration-automated scanning microscopy) 방법으로 규조류 검사를 시행하여 비익사군 20명 중 6명의 간에서 규조류가 검출되었고, 신장에서는 20명 중 7명에서 검출되었으나, 익사군에서 검출된 규조류 숫자와 분명한 통계학적 차이가 있기 때문에, 비익사군에서의 위양성 문제가 규조류 검사의 적용에 장애가 되지 않는다고 하였다.

(3) 위양성의 원인

규조류 검사에서 나타나는 위양성은 생전에 규조류가 개체에 침투하는 경우와 사망 후 침수되는 동안 규조류에 오염되는 것과 규조류 검사 준비 과정으로 나눌 수 있다. 생전에 규조류는 다양한 경로를 통해 인체 조직에 접근할 수 있다. 규조류 함량이 높은 음식을 섭취하거나, 오염된 공기를 호흡하면서 폐를 통해서도 가능하다. 채소나 조개류와 같이 규조류가 풍부한 음식물이나 규조류가 풍부한 음료를 섭취함으로써 위장관 흡수를 통해 인체에 들어올 수가 있다고 알려져 있다[43]. 단순히 물을 마심으로 인해 규조류가 위장관을 통해 흡수가 가능하다는 가설이 쥐를 이용한 동물실험을 통해 제시되었지만, 실제 이러한 사실이 발생한다는 결정적인 증거는 없는 것으로 보인다[42].

공기에서는 어느 정도의 규조류가 존재한다고 알려져 있다 [35,38]. 호기성 규조류나 비활성 화학물질로 사용되는 규조토를 흡입하거나, 규조류가 포함된 시가를 피움으로 인해 인체 내 들어올 수 있다는 보고들이 있다[39,44]. 규폐증 노동자들의 폐에서 규조류가 검출된다는 보고가 있지만, 규조류를 흡입하고 폐에 국소화되어 진폐증은 생기지만 규조류가 말초 장기로 확산이 된다는 증거는 없는 것으로 보인다[42]. 수영이나 잠수하는 사람들이 반복적으로 물을 흡입하는 경우에 익사가 아닌 원인으로 사망한 경우에 규조류가 검출될 수 있다는 보고들이 있다[45,46].

사후에는 오랫동안 침수된 경우, 수압이 높은 곳에 시체가 놓여 있는 경우, 부패된 시체에 상처가 있는 경우에 규조류가 침투될 수 있다. 사후 침수로 인해 규조류가 폐에 들어갈 수 있기 때문에 폐에 규조류가 존재한다고 해서 침수 전에 희생자가 생존하였다고 단정하는 것은 어렵다고 하였다[39]. 하지만 다른 연구자들은 폐에서 규조류가 검출되는 소견은 익사의 강한 증거이며, 폐에서 슬라이드당 20개 이상의 규조류가 있으면 익사의 진단이 가능하다고 하였다[4,26]. 사후 규

조류의 침투 여부를 알기 위해 실제 시체를 대상으로 실험을 한 Lunetta 등[42]의 연구에 의하면 5구의 시체에 배양된 규조류를 기관지절개술을 통해 주입하여 관찰한 결과 흉막강과 왼쪽 심장 혈액에서는 규조류가 소수 보였으나, 내부 장기에서는 관찰되지 않아 사후 규조류가 혈액까지는 갈 수 있으나 말초 장기까지는 도달하지 않는 것으로 결론지었다.

규조류 검사를 준비하는 전 과정에서 오염이 될 수 있다. 희생자의 의류, 체표면, 내부 장기 사이에 부주의한 시료채취 과정, 분취액 또는 소화된 조직을 슬라이드에 옮기는 과정에서도 오염될 수 있다. 시료를 준비하는 과정에서의 오염원으로 실험 기구, 장갑, 종이, 물, 시약, 수돗물 등이 인정되고 있다[22,42,47]. 실험에 사용되는 시약에 있어서의 오염 정도는 연구자마다 차이는 있지만 대체적으로 제한적인 것으로 보인다[4,7,26,47,48]. 검사 과정에서의 규조류에 의한 오염을 피하는 것이 규조류 검사의 신뢰도를 높이는 길이기 때문에, 모든 시료는 부검 시작할 때 미리 정해진 순서대로 채취되어야 한다[22]. 희생자의 옷이나 피부로부터 장기를 보호해야 하며, 모든 시약과 유리 용기는 사용하기 전에 규조류가 없다는 것을 확인해야 하고, 오염이 안 된 시료를 수집해야 한다. 규조류의 외피골격(exoskeleton)은 염기 복합물에 민감하기 때문에 시료 유리 용기는 수산화나트륨으로 사용하기 전에 세척해서 오염을 피해야 한다고 하였다[49].

3. 최근 연구 경향

2000년부터 2019년까지 PubMed에서 “drowning and diatom”으로 검색된 논문은 총 106편으로 본문이 영어가 아닌 논문, 수의학과 관련된 논문, 초록이 없는 것, 논평(comment), 오자(erratum)를 제외한 74편의 논문을 유형, 주제 및 연대별로 분류하여 Table 3에 정리하였다. 74편 중 규조류 검사가 포함된 논문은 56편이며, 규조류 외 다른 수중 미생물을 대상으로 연구한 논문은 18편이었다. 규조류에 관한 논문은 2000년부터 2004년도까지 5년 동안 5편에 불과하였으나 2015년도에서 2019년도까지 5년간 23편으로 증가하였다. 논문의 유형을 보면 원저 45편, 증례 8편, 종설 3편이었다. 원저 45편 중 3편은 규조류와 직접적으로 관계없는 논문이었으며, 규조류 검사에 대한 내용을 포함하고 있는 논문은 42편이었다. 42편을 세분해서 보면 추출방법에 대한 논문이 12편으로 가장 많았으며, 다량의 사례 분석을 통한 규조류 검사의 의의를 다룬 논문이 8편, 익수매질에서 규조류 데이터베이스에 대한 논문이 6편, 규조류 확인에 유전적인 방법을 적용한 논문이 5편, 새로운 동정 기술에 관한 논문 4편, 다량의 익사 사례에서 규조류 검사를 단순 적용한 논문 3편, 시료 준비 과정에 대한 논문 2편, 규조류 검사의 해석에 대한 논문이 2편으로 나타났다.

종설 3편 중 2편이 익사에 대한 전반적인 내용을 다루고 있으며 그 내용 중에 규조류 검사가 포함되어 있는데, 규조류 검사는 한계는 있지만 부검 소견과 함께 규조류 검사를 익사의 진단에 보조적인 방법으로 간주하고 있다[50,51]. 익사에

Table 3. Analysis of research papers indexed on PubMed searched as “drowning and diatom” during the year 2000–2019

Type of manuscript	Main content	No. of articles during the year 2000–2019				Subtotal	Total
		2000–2004	2005–2009	2010–2014	2015–2019		
Review							3
	Drowning	–	1	–	1	–	
	Diatom test	1	–	–	–	–	
Original article							45
	Digestion method	–	3	3	6	12	
	Multi-case analysis with diatom test	1	0	3	4	8	
	Diatom database	1	–	3	2	6	
	Genetic identification	–	–	3	2	5	
	New identification technique	–	–	1	3	4	
	Simple diatom test in multi-case study	–	1	1	1	3	
	Sample preparation technique	1	–	1	–	2	
	Interpretation	–	1	–	1	2	
	Others	–	1	–	2	3	
Case report		1	3	3	1	–	8
Total		5	10	18	23	–	56

서 규조류 검사에 대한 종설 논문에서는 기존의 알려진 위양성 문제에 대한 객관적인 소개를 하고 있으면서, 규조류 검사의 판독에 있어서 주사전자현미경의 도입을 강조하는 점이 눈에 띈다[23]. 원저에서는 규조류 검사 중 오염에 주의를 요하는 연구도 있지만, 대량 사례 분석 및 시체 실험을 통한 연구들은 위양성의 문제는 있지만 전반적으로 규조류 검사의 신뢰도를 지지하는 경향을 보인다[11,28,29,41,42]. 한편 역사에서 규조류 검사가 음성인 경우에 보완적인 의미를 두기 위해 규조류 외 다른 수중 미생물의 검출에 대한 연구가 꾸준히 계속되고 있다.

결 론

역사의 진단에 규조류 검사가 소개된 이후 수십 년 동안 신뢰도 측면에서 논란이 지속되어 왔다. 규조류 검사에 대한 문헌들을 고찰해보면 여전히 규조류 검사의 신뢰성을 제고하기 위한 검사 방법의 개선을 위한 연구가 지속적으로 이루어지고 있다. 규조류 검사가 논란의 중심에 있는 가장 중요한 이유는 위양성의 문제인데 사례 분석을 통한 최근 대부분의 연구자들은 위양성의 문제가 역사에서 규조류 검사의 장애가 되지 않는다는 견해를 보인다. 하지만 역사에서 규조류 검사가 의미를 가지기 위해서는 검사 전 과정에서 오염을 방지할 수 있는 대책을 마련하는 것이 필수적이다. 부검을 할 때 규조류 오염을 피하기 위한 술식에 따라 조직을 채취해야 하며, 규조류 추출 과정에 사용되는 기구, 시약 및 물에 대한 체크리스트를 작성하여 주기적으로 오염 여부를 확인하는 것이 요망된다. 이와 같이 위양성의 가능성을 낮출 수 있는 부검 과정이나 실험실 조건하에, 골수와 같이 오염의 영향을 덜 받을 것으로 생각되는 심부 장기에서 일정 수준의 규조류가 검출되면 역사의 진단에 충분히 의의가 있는 것으로 생각된다. 따라서 법의병리의사들은 검사 방법의 진전, 위양성에 대한 논란 및 최근 연구경향을 잘 이해하면서 규조류 검사를 역사의 진단에 적극적으로 활용할 필요가 있다.

ORCID: Gi Yeong Huh: <https://orcid.org/0000-0002-4948-9877>

Conflict of Interest

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

Acknowledgments

This study is supported by Pusan National University 2-Year Research Grant.

References

1. Saukko P, Knight B. Knight's forensic pathology. 4th ed. Boca Raton, FL: CRC Press; 2016. p. 399-413.
2. Jang EK, Shin HK, Paek SP. Recent researches for diatom as inorganic and bioenvironmental materials. Korean Soc Biotechnol Bioeng J 2014;29:9-21.
3. Lunetta P, Penttila A, Hallfors G. Scanning and transmission electron microscopical evidence of the capacity of diatoms to penetrate the alveolo-capillary barrier in drowning. Int J Legal Med 1998;111:229-37.
4. Timperman J. The diagnosis of drowning: a review. Forensic Sci 1972;1:397-409.
5. Pollanen MS. The diagnostic value of the diatom test for drowning, II. Validity: analysis of diatoms in bone marrow and drowning medium. J Forensic Sci 1997;42:286-90.
6. Lin CY, Yen WC, Hsieh HM, et al. Diatomological investigation in sphenoid sinus fluid and lung tissue from cases of suspected drowning. Forensic Sci Int 2014;244:111-5.
7. Ludes B, Quantin S, Coste M, et al. Application of a simple enzymatic digestion method for diatom detection in the diagnosis of drowning in putrified corpses by diatom analysis. Int J Legal Med 1994;107:37-41.
8. Ming M, Meng X, Wang E. Evaluation of four digestive methods for extracting diatoms. Forensic Sci Int 2007;170:29-34.
9. Sidari L, Di Nunno N, Costantinides F, et al. Diatom test with Soluene-350 to diagnose drowning in sea water. Forensic Sci Int 1999;103:61-5.
10. DiGiancamillo A, Domeneghini C, Gibelli D, et al. Diatom extraction with HCl from animal tissues: a technical note. Leg Med (Tokyo) 2011;13:268-71.
11. Krstic S, Duma A, Janevska B, et al. Diatoms in forensic expertise of drowning: a Macedonian experience. Forensic Sci Int 2002;127:198-203.
12. Wang H, Liu Y, Zhao J, et al. A simple digestion method with a Lefort aqua regia solution for diatom extraction. J Forensic Sci 2015;60 Suppl 1:S227-S30.
13. Kobayashi M, Yamada Y, Zhang WD, et al. Novel detection of plankton from lung tissue by enzymatic digestion method. Forensic Sci Int 1993;60:81-90.
14. Kakizaki E, Yukawa N. Simple protocol for extracting diatoms from lung tissues of suspected drowning cases within 3h: first practical application. Forensic Sci Int 2015;251:179-85.
15. Kakizaki E, Sonoda A, Shinkawa N, et al. A new enzymatic method for extracting diatoms from organs of suspected drowning cases using papain: optimal digestion and first practical application. Forensic Sci Int 2019;297:204-16.
16. Fukui Y, Hata M, Takahashi S, et al. A new method for detecting diatoms in human organs. Forensic Sci Int 1980;16:67-74.
17. Yange L, Chuanying H, Chengxing W, et al. Development of can for destruction of organic material in use for forensic diatom examination. Forensic Sci Int 1999;101:163-6.
18. Hu S, Liu C, Wen J, et al. Detection of diatoms in water and tissues by combination of microwave digestion, vacuum filtration and

- scanning electron microscopy. *Forensic Sci Int* 2013;226:e48-51.
19. Hong JW, Lee KL, Kim YS. The comparison of plankton detection by two analysis methods in the seawater of Gageo Island. *Korean J Leg Med* 2012;36:144-50.
 20. Zhao J, Liu C, Hu S, et al. Microwave digestion: vacuum filtration-automated scanning electron microscopy as a sensitive method for forensic diatom test. *Int J Legal Med* 2013;127:459-63.
 21. Zhao J, Wang Y, Wang G, et al. Application of the microwave digestion-vacuum filtration-automated scanning electron microscopy method for diatom detection in the diagnosis of drowning. *J Forensic Leg Med* 2015;33:125-8.
 22. Hurlimann J, Feer P, Elber F, et al. Diatom detection in the diagnosis of death by drowning. *Int J Legal Med* 2000;114:6-14.
 23. Bortolotti F, Tagliaro F, Manetto G. Objective diagnosis of drowning by the "diatom test": a critical review. *Forensic Sci Rev* 2004;16:135-48.
 24. ADIAC: Automatic Diatom Identification and Classification [Internet]. Edinburgh: Royal Botanic Garden Edinburgh; 1999 [cited 2020 Apr 24]. Available from: <https://rbg-web2.rbge.org.uk/ADIAC/index.html>.
 25. Zhou Y, Zhang J, Huang J, et al. Digital whole-slide image analysis for automated diatom test in forensic cases of drowning using a convolutional neural network algorithm. *Forensic Sci Int* 2019;302:109922.
 26. Auer A, Mottonen M. Diatoms and drowning. *Z Rechtsmed* 1988;101:87-98.
 27. Farrugia A, Ludes B. Diagnostic of drowning in forensic medicine. In: Vieira DN, ed. *Forensic medicine from old problems to new challenges*. Rijeka: Tech; 2011. p. 53-60.
 28. Zhao J, Ma Y, Liu C, et al. A quantitative comparison analysis of diatoms in the lung tissues and the drowning medium as an indicator of drowning. *J Forensic Leg Med* 2016;42:75-8.
 29. Shen X, Liu Y, Xiao C, et al. Analysis of false-positive results of diatom test in the diagnosis of drowning-would not be an impediment. *Int J Legal Med* 2019;133:1819-24.
 30. Ludes B, Coste M, Tracqui A, et al. Continuous river monitoring of the diatoms in the diagnosis of drowning. *J Forensic Sci* 1996;41:425-8.
 31. Ludes B, Coste M, North N, et al. Diatom analysis in victim's tissues as an indicator of the site of drowning. *Int J Legal Med* 1999;112:163-6.
 32. Seo Y, Sato S, Kuroki K, et al. A simple DNA coprecipitation method for the detection of diatoms in heart blood. *Forensic Sci Int* 2013;232:154-9.
 33. He F, Huang D, Liu L, et al. A novel PCR-DGGE-based method for identifying plankton 16S rDNA for the diagnosis of drowning. *Forensic Sci Int* 2008;176:152-6.
 34. Li Z, Liu X, Yu Y, et al. Barcoding for diatoms in the Yangtze River from the morphological observation and 18S rDNA polymorphic analysis. *Forensic Sci Int* 2019;297:81-9.
 35. Spitz WU, Schneider V. The significance of diatoms in the diagnosis of death by drowning. *J Forensic Sci* 1964;9:11-8.
 36. Pollanen MS, Cheung C, Chiasson DA. The diagnostic value of the diatom test for drowning, I. Utility: a retrospective analysis of 771 cases of drowning in Ontario, Canada. *J Forensic Sci* 1997;42:281-5.
 37. Gylseth B, Mowe G. Diatoms in lung tissue. *Lancet* 1979;2:1375.
 38. Foged N. Diatoms and drowning: once more. *Forensic Sci Int* 1983;21:153-9.
 39. Neidhart DA, Greendyke RM. The significance of diatom demonstration in the diagnosis of death by drowning. *Am J Clin Pathol* 1967;48:377-82.
 40. Peabody AJ. Diatoms in forensic science. *J Forensic Sci Soc* 1978;17:81-7.
 41. Bortolotti F, Del Balzo G, Calza R, et al. Testing the specificity of the diatom test: search for false-positives. *Med Sci Law* 2011;51 Suppl:S7-10.
 42. Lunetta P, Miettinen A, Spilling K, et al. False-positive diatom test: a real challenge? A post-mortem study using standardized protocols. *Leg Med (Tokyo)* 2013;15:229-34.
 43. Yen LY, Jayaprakash PT. Prevalence of diatom frustules in non-vegetarian foodstuffs and its implications in interpreting identification of diatom frustules in drowning cases. *Forensic Sci Int* 2007;170:1-7.
 44. Langer AM, Mackler AD, Rubin I, et al. Inorganic particles in cigars and cigar smoke. *Science* 1971;174:585-7.
 45. Calder IM. An evaluation of the diatom test in deaths of professional divers. *Med Sci Law* 1984;24:41-6.
 46. Taylor JJ. Diatoms and drowning: a cautionary case note. *Med Sci Law* 1994;34:78-9.
 47. Pachar JV, Cameron JM. The diagnosis of drowning by quantitative and qualitative diatom analysis. *Med Sci Law* 1993;33:291-9.
 48. Antonenko NE, Ferris JA. Diatom analysis in the determination of death by drowning. *Can Soc Forensic Sci J* 1987;20:1-11.
 49. Houck MM, Crispino F, McAdam T. *The science of crime scenes*. 2nd ed. London: Academic Press; 2018. p. 323-39.
 50. Piette MH, De Letter EA. Drowning: still a difficult autopsy diagnosis. *Forensic Sci Int* 2006;163:1-9.
 51. Stephenson L, Van den Heuvel C, Byard RW. The persistent problem of drowning: a difficult diagnosis with inconclusive tests. *J Forensic Leg Med* 2019;66:79-85.