

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：99999
研究種目：奨励研究
研究期間：2020～2020
課題番号：20H01127
研究課題名 RT-RPA法による迅速・簡便な体液種同定法の開発

研究代表者

久保 誠司 (Kubo, Seiji)

石川県警察科学捜査研究所・・・公務員

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 360,000円

研究成果の概要：本研究では、体液特異的なmRNA（血液：HBB、精液：PRM1）を指標としたRT-RPA法を開発した。反応条件を検討した結果、42℃の反応で20分以内に指標mRNAを検出できた。HBBの検出感度は0.02 ng、PRM1の検出感度は0.4 ngであった。また、他体液を含む混合試料からもHBB・PRM1を特異的に検出できた。以上の結果から、RT-RPA法は体液特異的なmRNAの迅速・簡便な検出法として利用できることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

法科学鑑定において体液識別検査は、犯罪の立証に極めて重要である。近年、高い特異性と検出感度を有するmRNAが体液識別の指標として注目されている。しかし、従来法（RT-qPCR法・エンドポイントRT-PCR法）は工程が多く、煩雑であるため、mRNA検出に時間と手間がかかる。本研究で開発したRT-RPA法はこういった問題を克服し、mRNAを指標とした体液識別検査の迅速化・簡便化に貢献できると考えられる。

研究分野：法生物学

キーワード：RT-RPA法 体液識別 mRNA

1. 研究の目的

犯罪現場で採取される法科学的試料について、体液種の同定は犯罪の立証に極めて重要である。例えば、被害者の膣内から精液が検出されれば、性交を証明する有力な証拠となりえる。近年、体液種同定の指標として、体液特異的に発現する mRNA が注目されている。一般的に、mRNA は RT-qPCR 法やエンドポイント RT-PCR 法によって検出されるが、これらの方法は作業工程が多く、操作も煩雑であるため、時間と手間がかかる。

RT-RPA 法は、37～42 の等温増幅による核酸検出法で、20 分以内に反応が終了する。また、RNA を 1 ステップで検出できるため、試薬の準備や反応溶液の移動等の工程を最小限に抑えることができる。さらに、RT-RPA 法は阻害因子に強いことが報告されており、簡易的に処理した試料から精製なしで標的核酸を検出できる。本研究では、RT-RPA 法を利用し、mRNA を指標とした体液識別検査の迅速化・簡便化を目的とした。

2. 研究成果

(1) 反応の最適化

RT-RPA 法の標的 mRNA として、血液特異的な HBB、精液特異的な PRM1 を選択した。RT-RPA 法には、Primer3 (qPCR 法) や PrimerExplorer (LAMP 法) のようなプライマー設計のソフトウェアがない。そこで、RPA キット (TwistDx) のマニュアルに従い、複数のプライマーを設計し、スクリーニングを行った。検出の速さ及び mRNA に対する特異性に基づいて、最適なプライマーを決定した。

(2) 検出感度

HBB の検出感度は白血球由来の total RNA (1～0.001 ng/μL)、PRM1 の検出感度は精液由来の total RNA (5～0.04 ng/μL) を用いて検討を行った。HBB は 0.01 ng/μL (input: 0.02 ng)、PRM1 は 0.2 ng/μL (input: 0.4 ng) まで検出された (図 1)。

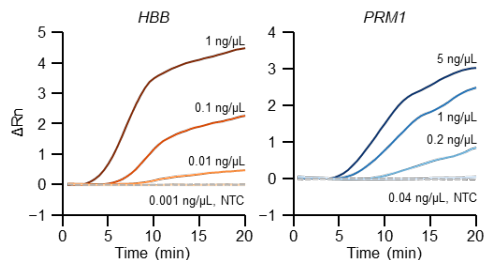


図 1 検出感度

(3) 特異性

血液、唾液、精液、膣液 (各 3 人分) から RNA を抽出し、HBB の血液特異性、PRM1 の精液特異性をそれぞれ確認した。RT-RPA 法によって偽陽性・偽陰性は生じなかった。

(4) 混合

血液 0.5 μL を、唾液 50 μL、精液 50 μL、膣液綿棒 1 本分とそれぞれ混合し、血液混合試料を作成した。同様に、精液 0.5 μL を、唾液 50 μL、血液 50 μL、膣液綿棒 1 本分とそれぞれ混合し、精液混合試料を作成した。これらの混合試料から RNA を抽出し、RT-RPA 法を行った。HBB・PRM1 は各混合試料から特異的に検出された。

(5) ダイレクト法

血液を細胞溶解・DNase 処理し、RNA 粗抽出液を調製した。RT-RPA 法によってこの粗抽出液からも HBB を検出することができた。一方、この方法では精液成分の阻害効果により PRM1 を検出することはできなかった。今後は、簡易処理法及び RT-RPA 法の更なる最適化を行い、検出感度の改善と PRM1 のダイレクト検出について検討を行う。

主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

研究組織（研究協力者）

氏名	ローマ字氏名
----	--------