

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号： 99999

研究種目： 奨励研究

研究期間： 2022 ~ 2022

課題番号： 22H04399

研究課題名 ダイレクト法及び等温核酸増幅による体液特異的mRNAの迅速な検出

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） 330,000円

研究成果の概要：本研究では、等温増幅（42℃）かつ短時間（20分）の反応系であるRT-RPA法を利用し、血液の指標となるHemoglobin beta (HBB) mRNAを迅速・簡便に検出する方法を開発した。本法により、100 fg相当の白血球RNAあるいは1 nL相当の血液からHBBを検出することが可能であった。また、簡易的なRNA抽出法を組み合わせたダイレクトRT-RPA法により、30分程度でHBBの有無が判定可能となった。これらの結果から、RT-RPA法が血液のスクリーニング検査として有効であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

犯罪現場に遺留される試料について、体液種の証明は犯罪の立証に重要である。mRNAは体液識別の有用なマーカーであるが、従来のRT-qPCR法による工程は時間と手間がかかる。本研究で開発したRT-RPA法は、RT-qPCR法に比べて迅速・簡便な方法であり、法科学鑑定に貢献できると考えられる。また、反応温度（42℃）が低く、精密な温度管理が不要であることから、実験室だけではなく現場での利用が期待できる。

研究分野： 法生物学

キーワード： RPA法 ダイレクト法 血液 ヘモグロビン mRNA

1. 研究の目的

犯罪現場に遺留される試料について、体液種の証明は犯罪の立証に重要である。mRNA は体液種を識別するための有用なマーカーであるが、mRNA の検出に一般的に利用される RT-PCR 法は時間と手間がかかる。本研究では、等温増幅 (42) かつ短時間 (20 分) で標的 RNA を検出可能な RT-RPA 法を利用し、血液の指標となる mRNA (Hemoglobin beta : HBB) の迅速・簡便な検出法の確立を目的とした。

研究代表者は HBB mRNA を指標とした RT-RPA 法を既に報告しているが、検出感度の低さが課題であった。そこで、反応条件を改善することで高感度化を目指した。また、HBB mRNA 検出の更なる迅速化・簡便化のため、簡易 RNA 抽出法を導入し、未精製 RNA に対する RT-RPA 法 (ダイレクト RT-RPA 法) の検討を行った。

2. 研究成果

(1) 反応条件の最適化

RNase H は RNA:cDNA ハイブリッドの RNA のみを選択的に分解し、cDNA の増幅を促進することが報告されている。そこで、RT-RPA 反応溶液に RNase H を添加したところ、反応時間の短縮が確認された。また、逆転写酵素の量を検討した結果、5 U から 20 U に増加させることで反応が促進した。さらに、反応開始 4 分後に反応溶液を攪拌させることで、反応時間が短縮した。

(2) 検出感度

白血球 RNA の希釈系列を用いて検出感度を検討した結果、100 fg 相当の白血球 RNA から HBB mRNA が検出された。また、血液の希釈系列を用いて検出感度を検討した結果、1 nL 相当の血液から HBB mRNA が検出された。これらの感度は、研究代表者が先行研究で報告した RT-RPA 法よりも約 200 倍高感度であり、従来の RT-PCR 法と同程度であった。

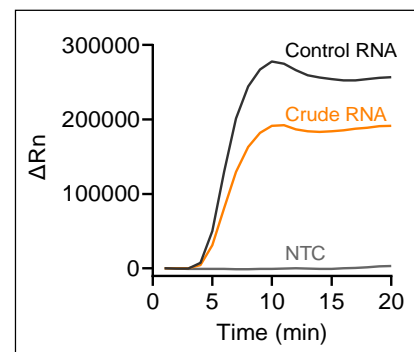
(3) 阻害耐性の検討

RT-RPA 法は高い阻害耐性を有することが報告されている。そこで、PCR の阻害剤として知られるフミン酸、ヘマチン、タンニン酸、メラニンを用いて、RT-RPA 法の阻害耐性を調べた。結果、フミン酸 500 ng/μL、ヘマチン 250 μM、タンニン酸 4000 ng/μL、メラニン 125 ng/μL まで耐性を示した。この高い阻害耐性から、RT-RPA 法は RNA 未精製の試料に対しても有効であることが示唆された。

(4) ダイレクト法の検討

RNA の簡易抽出法として、還元剤 TCEP 及びキレート剤 EDTA を用いて加熱する方法が報告されている。この方法により、血液から未精製の RNA (Crude RNA) を調製し、RT-RPA 法を行った。結果、Crude RNA からも HBB mRNA が検出可能であった (右図。Control RNA は精製 RNA、NTC は陰性対照)。

また、血液と他体液 (唾液等) の混合試料や、布片やナイフの刃先に付着した模擬血痕試料からも HBB mRNA が検出され、実際の法科学的試料に対するダイレクト RT-RPA 法の適用性が示された。



同様に、精液の指標となる mRNA (Protamine 1 : PRM1) についても検討を行った。現状、PRM1 mRNA を指標とした RT-RPA 法は概念実証モデルであり、今後更なる検証が必要である。

従来の RT-PCR に基づく方法は mRNA の検出に 2~3 時間程度要する。一方、本研究で開発した方法では 30 分程度 (10 分の簡易 RNA 抽出と 20 分の RT-RPA) で mRNA が検出可能である。よって、RT-RPA 法による体液特異的な mRNA のスクリーニングは、体液識別検査の迅速化・簡便化に貢献できる。

主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Seiji Kubo, Hideki Niimi, Isao Kitajima	4. 巻 63
2. 論文標題 Improved reverse transcription-recombinase polymerase amplification assay for blood mRNA screening: comparison with one-step RT-qPCR assay	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Forensic Science International: Genetics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.fsigen.2022.102808	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Seiji Kubo, Hideki Niimi, Isao Kitajima	4. 巻 670
2. 論文標題 Sperm mRNA screening by reverse transcription-recombinase polymerase amplification (RT-RPA) assay: Decision-making for differential extraction	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Analytical Biochemistry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ab.2023.115121	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔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