

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：99999
研究種目：奨励研究
研究期間：2021～2021
課題番号：21H04294
研究課題名 RPA法による迅速な男性成分スクリーニング法の確立

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） 340,000円

研究成果の概要：本研究では、等温増幅（39℃）かつ短時間（20分）の反応系であるRPA法を利用し、男性特異的なDNAを迅速・簡便に検出する方法を開発した。本法により、10 pgまでの男性DNAを検出することができた。また、簡易的なDNA抽出法を組み合わせたダイレクトRPA法により、試料の処理から男性DNAの検出まで30分程度で行うことができた。これらの結果は、RPA法が男性特異的なDNAのスクリーニング検査として有効であることを示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

男性DNAのスクリーニングは、性犯罪等の法科学鑑定において重要である。しかし、従来の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RPA法は、qPCR法に比べて迅速・簡便な方法であり、30分程度で男性DNAの有無を確認できる。よって、法科学鑑定の効率化に貢献できると考えられる。また、反応温度（39℃）が低いことや作業工程が少ないことから、実験室だけではなく現場での即時検出が期待できる。

研究分野：法生物学

キーワード：RPA法 ダイレクト法 男性DNA

1. 研究の目的

法科学鑑定では、犯罪現場で採取された試料に対してスクリーニング検査を行う。特に、性犯罪においては男性成分の確認が重要な工程となる。法科学的試料における男性成分の確認は、Y染色体上のDNAや精液に存在するmRNA・タンパク質などの検出によって行われる。

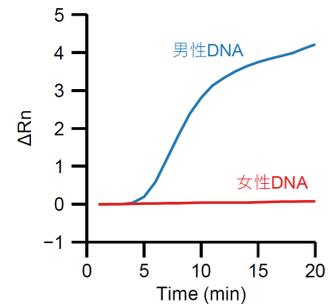
本研究では男性特異的なDNAの検出に着目した。男性が関与した可能性のある試料において、男性特異的なDNAの有無はDNA型検査を行うかどうかの基準となる。しかし、従来のqPCR法による検出は、DNAの抽出・精製とその後の増幅に時間と手間がかかる。本研究では、等温増幅(39℃)かつ短時間(20分)の反応系であるRPA法を利用し、男性DNAを迅速・簡便に検出することを目的とした。

2. 研究成果

(1) 反応の最適化

男性特異的なY染色体上のDNAに対して、6つのプライマー(Fプライマー×3, Rプライマー×3)を設計し、9通りの組み合わせを検証した。この中で最も早く男性DNAを検出できるプライマーの組み合わせを選択し、最適な条件とした。

また、女性DNAを用いて特異性を検討した結果、女性DNAから増幅は認められず、男性DNAに特異的な反応であることが確認された。典型的な増幅曲線は右図に示すとおりである。



(2) 検出感度

男性DNAの希釈系列(テンプレート量: 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg)を用いて検出感度を検討した結果、10 pgまでの男性DNAを検出することができた。しかし、この検出感度は従来のqPCR法よりも10倍程度低いいため、微量試料のスクリーニングには適さない。今後、反応成分や反応条件を更に検討し、検出感度を改善する必要がある。

(3) 混合試料

実際の法科学的試料は、男性DNAと女性DNAが混合している場合がある。そこで、混合DNA試料(男性DNA:女性DNA = 1:1, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:2000)を用いて、女性DNAの存在が男性DNAの検出に与える影響を調べた。その結果、1:1000及び1:2000の混合試料で男性DNAの検出に2分程度の遅れが生じたが、全ての混合試料から男性DNAを検出することができた。

(4) 阻害耐性の検討

RPA法は阻害耐性があることが報告されている。そこで、PCR阻害剤として知られるフミン酸及びヘマチンを用いて、RPA法の阻害耐性を調べた。その結果、RPA法は1000 ng/μLのフミン酸及び500 μMのヘマチンの存在下でも男性DNAを検出することができた。これはqPCR法と同等以上の阻害耐性であり、RPA法はDNA未精製の試料からでも男性DNAを検出できる可能性が示唆された。

(5) ダイレクト法の検討

DNA抽出・精製の工程を簡略化するため、アルカリ溶解法(100 mM水酸化ナトリウム水溶液で5分間加熱)を採用した。この方法を用いて血液、唾液、精液から粗精製DNA試料を調製した。RPA法はこれらの粗精製DNA試料からも男性DNAを検出することができた。

従来の精製DNAを用いたqPCR法は、男性DNAの検出に1~2時間程度要する。一方、本研究で開発したダイレクトRPA法は、試料の処理から男性DNAの検出までの工程が30分程度(5分の溶解と20分のRPA反応)である。以上の結果から、ダイレクトRPA法は男性DNAの迅速・簡便なスクリーニング法となり得ることが示唆された。

本研究では、男性DNAを指標としたRPA法を確立した。今後は、男性組織に遍在するmRNAや精液特異的なmRNAを指標としたRT-RPA法を確立する。さらに、男性DNAとヒトDNAを指標としたDuplex RPA法や、男性特異的なmRNAと体液特異的なmRNAを指標としたMultiplex RT-RPA法の開発を目指す。

主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 59
2. 論文標題 Rapid and direct detection of male DNA by recombinase polymerase amplification assay	5. 発行年 2022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.2022.102704	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
----	--------