

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号： 99999
研究種目： 奨励研究
研究期間： 2023 ~ 2023
課題番号： 23H05370
研究課題名 等温増幅及びラテラルフロー検出による法科学核酸マーカーの簡便なスクリーニング

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、等温増幅反応のLAMP法・RPA法を利用し、唾液の指標となるmRNA（HTN3）及び女性由来の指標となるnon-coding RNA（XIST）を迅速・簡便に検出する方法を開発した。HTN3の検出法は、RPA法とLAMP法を組み合わせた高感度な方法であり、0.5 μL相当の唾液が検出可能であった。XISTの検出法は、RT-LAMP法と目視検出（pH指示薬による色調変化）を組み合わせた方法であり、0.5 μL相当の女性血液が検出可能であった。

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生体試料のスクリーニングは、法科学鑑定において重要な工程である。唾液特異的なmRNAや女性特異的なRNAは、スクリーニング検査の有効な指標となるが、従来法（PCR法）による検出は時間・手間がかかるという課題がある。本研究で開発した方法は、等温増幅反応（LAMP法・RPA法）に基づいており、迅速性・簡便性に優れている。そのため、スクリーニング検査、ひいては法科学鑑定の効率化に貢献できる。

研究分野： 法生物学

キーワード： LAMP RPA 唾液 HTN3 XIST

1. 研究の目的

犯罪現場に遺留される生体試料のスクリーニング検査は、法科学鑑定において重要な工程である。性別特異的な DNA/RNA や体液特異的な mRNA は、スクリーニング検査の有効な指標である。しかし、これらの核酸マーカー(DNA/RNA)を検出するために使用される PCR 法は時間・手間がかかるという課題がある。そこで、等温増幅の反応系である Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法や Recombinase polymerase amplification (RPA) 法を利用し、迅速・簡便なスクリーニング検査法の確立を目的とした。

2. 研究成果

(1) 唾液特異的な mRNA (Histatin3: HTN3) の検出

等温増幅反応の LAMP 法や RPA 法は、PCR 法に比べて検出感度が低いという欠点がある。そこで、2 つの等温増幅反応を組み合わせた方法により高感度化を目指した(図 1)。この方法では、1 段階目に 42°C・20 分の RT-RPA 反応を行い、2 段階目に 65°C・30 分の LAMP 反応を行う。検出試薬としてインターカラーを LAMP 反応溶液に添加し、蛍光シグナルの増幅の有無で判定を行った。

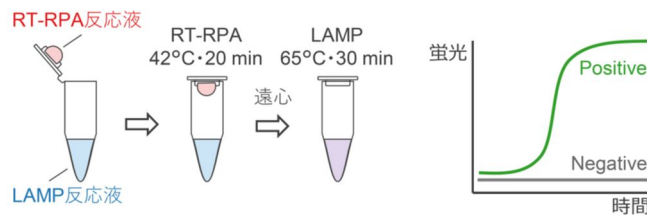


図 1: HTN3 の検出

- ・血液、唾液、精液、膣液を使用して特異性を検討した結果、唾液特異的に HTN3 が検出された。
- ・希釈唾液を使用して検出感度を検討した結果、0.5 μL の唾液から HTN3 が検出された。これは従来の RT-qPCR 法やアミラーゼを指標とした生化学的な検査法と同等の感度である。
- ・混合唾液(血液・精液・膣液を含む唾液)を検査した結果、すべての混合試料から HTN3 が検出され、他体液に由来する非標的 RNA の影響を受けなかった。
- ・実際の法科学的な試料を想定し、吸い殻などの模擬試料を 8 点作製した。この内、7 点から HTN3 が検出された。一方、不検出であった試料 1 点についてアミラーゼ検査を行ったところ、陽性反応を示した。このことから、HTN3 が不検出であることが、必ずしも唾液の存在を否定する結果ではない。mRNA は分解されやすい指標であるため、結果が陰性の場合には慎重な判断が必要になる。

今回開発した方法は、pH 指示薬による色調変化の検出やラテラルフロー検出に対応していなかった。pH 指示薬を使用した場合、RT-RPA の成分により pH 変化が抑制され、明確な結果が得られなかった。ラテラルフロー検出では、非特異的な反応が検出された。今後、反応条件及び検出方法を改善する予定である。

(2) 女性特異的な non-coding RNA (XIST) の検出

RT-LAMP と pH 指示薬 (Neutral Red) を組み合わせた方法 (Colorimetric RT-LAMP 法) を開発した。反応は 65・30 分で進行し、反応後の溶液の色を目視で確認することで結果の判定が可能であった(図 2)。

- ・男女の血液、男女の唾液、精液、膣液を使用して特異性を検討した結果、女性血液から XIST が検出され、女性唾液、膣液、男性体液からは検出されなかった。女性唾液及び膣液から検出されなかった原因として、XIST の発現量が血液と比較して少ないことが考えられた。



図 2: XIST の検出

- ・希釈女性血液を使用して検出感度を検討した結果、0.5 μL の女性血液から XIST が検出された。
- ・混合試料(男性由来体液を含む女性血液)を検査した結果、すべての混合試料から XIST が検出され、男性体液に由来する非標的 RNA の影響を受けなかった。
- ・実際の法科学的な試料を想定し、血痕模擬試料を 6 点作製した。この内、5 点から XIST が検出された。不検出であった試料については、RT-qPCR でも検出されなかったため、XIST の分解が考えられた。上記の HTN3 の場合と同様、XIST が不検出の場合には、慎重な結果の判断が必要である。

今後、ダイレクト法の導入やラテラルフロー検出の適用を検討する。

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 Kubo Seiji, Amai Keito, Tanaka Jin, Niimi Hideki	4. 巻 352
2. 論文標題 One-tube, two-step isothermal amplification of histatin 3 mRNA for saliva screening	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Forensic Science International	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.forsciint.2023.111847	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 Kubo Seiji, Amai Keito, Tanaka Jin, Niimi Hideki	4. 巻 361
2. 論文標題 Female sample screening using colorimetric reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) targeting non-coding RNA XIIST	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Forensic Science International	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.forsciint.2024.112081	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