

法科学核酸マーカーの迅速・簡便な検出法の開発

久保 誠司

目次

1. 緒言	3
1.1. DNA 型検査による個人識別	3
1.2. 法科学的試料のスクリーニング	3
1.3. 男性 DNA の検出	3
1.4. 体液 mRNA マーカーの検出	4
1.5. Recombinase Polymerase Amplification 法	4
1.6. 本研究の目的	5
2. 材料及び方法	8
2.1. Recombinase Polymerase Amplification (RPA) 法による 男性 DNA の迅速・簡便な検出法の開発	8
2.1.1. コントロール DNA	8
2.1.2. 阻害剤	8
2.1.3. 体液試料	8
2.1.4. プライマー及びプローブ	9
2.1.5. RPA アッセイ	9
2.1.6. 増幅産物の確認	10
2.1.7. アルカリ溶解法	10
2.1.8. 模擬試料	10
2.1.9. データ解析	10
2.2. Reverse Transcription-Recombinase Polymerase Amplification (RT-RPA) 法による 血液 mRNA マーカーの迅速・簡便な検出法の開発	11
2.2.1. コントロール核酸	11
2.2.2. 阻害剤	11
2.2.3. 体液試料	12
2.2.4. プライマー及びプローブ	12
2.2.5. 反応条件の検討	14
2.2.6. RT-RPA アッセイ	14
2.2.7. 増幅産物の確認	14
2.2.8. 簡易 RNA 抽出法	15
2.2.9. 模擬試料	15
2.2.10. データ解析	15

3. 結果及び考察	16
3.1. Recombinase Polymerase Amplification (RPA) 法による 男性 DNA の迅速・簡便な検出法の開発	16
3.1.1. Y-RPA 法の確立	16
3.1.2. Y-RPA 法の評価	17
3.1.3. ダイレクト Y-RPA 法の検討	19
3.1.4. 法科学的試料への応用	21
3.2. Reverse Transcription-Recombinase Polymerase Amplification (RT-RPA) 法による 血液 mRNA マーカーの迅速・簡便な検出法の開発	22
3.2.1. <i>HBB</i> プライマー及びプローブの選択	22
3.2.2. RT-RPA 反応条件の最適化	24
3.2.3. RT-RPA 法の評価	26
3.2.4. ダイレクト RT-RPA 法の検討	28
3.2.5. 法科学的試料への応用	30
4. 結言	31
参考文献	32
謝辞	36

1. 緒言

1.1. DNA 型検査による個人識別

ヒトゲノム中には 2-6 塩基の繰り返し配列 (Short Tandem Repeat ; 以下, STR) が存在する。STR の繰り返し回数には個人差があるため, 個人識別に有効である¹。法科学鑑定において, STR を指標とした DNA 型検査は犯罪捜査や身元確認に活用される。市販の DNA 型検査キットである GlobalFiler™ (Thermo Fisher Scientific) は 24 のマーカー (21 の常染色体 STR マーカー, アメロゲニン多型, Y 染色体の Indel 多型, Y 染色体 STR マーカー) をマルチプレックス PCR で検出する²。GlobalFiler™を用いた DNA 型検査は高い識別精度を有し, 日本人集団における最もありふれた DNA 型でも約 565 京人に 1 人という出現頻度となる。

1.2. 法科学的試料のスクリーニング

DNA 型検査は犯罪捜査における被疑者・被害者等の特定に有用であるが, 犯罪現場で採取される生体試料から必ずしも DNA 型が検出されるとは限らない³。犯罪現場は実験室と比べて不衛生な環境であり, 試料は遺留されてから採取されるまでの間に紫外線や熱, 化学物質, DNA 分解酵素等の影響を受ける。また, 皮膚接触痕のような試料では, DNA が含まれていない場合や微量の DNA しか含まない場合も多い³。そのため, DNA 型検査において, DNA の有無を確認するスクリーニングは重要な工程となる^{3,4}。

一方, DNA 型検査だけでは, 特定された人物の犯人性や犯罪の状況は明らかとならない。犯罪現場に遺留される法科学的試料には, 会話や咳などの社会的・日常的な行動に起因する, 犯罪とは無関係な Background DNA も含まれる⁵。そのため, 法科学的試料に含まれる体液種の証明が犯罪の立証に重要である⁶⁻⁹。例えば, 血液は傷害や暴行, 殺人などの関与を示唆し, 精液や膣液は性犯罪の関与を示唆する。

1.3. 男性 DNA の検出

性犯罪では, 男性 DNA の有無がその後の DNA 型検査を行うかどうかの判断基準となる^{10,11}。一般的に, 男性 DNA の確認には Y 染色体上の DNA を指標としたリアルタイム PCR (qPCR) が用いられる^{12,13}。qPCR 法は堅牢な DNA 定量ツールであり, DNA 型検査において PCR の鑄型を調整するために必要である。しかし, qPCR 法は DNA 抽出・精製・増幅の工程が必要であり, スクリーニングとして使用するには時間と手間がかかる。そのため, 迅速・簡便な男性 DNA スクリーニング法の開発が求められる。また, 効率的にスクリーニングを行うために, DNA 精製を必要としないダイレクト法に対応した核酸検出系が理想である^{3,4,14}。

1.4. 体液 mRNA マーカーの検出

mRNA を指標とした体液識別検査は高い特異性、検出感度を備えた方法であり、DNA/RNA 同時抽出法、マルチプレックス検出、免疫学的検査での同定が難しい体液への適用性などの利点がある^{6-9,15-17}。一般的に mRNA は不安定と考えられているが、乾燥等の特定の条件下では安定であることが報告されており、23 年経過した陳旧血痕からも血液 mRNA マーカーを検出した例もある^{18,19}。これまで、RT-qPCR 法^{7,8}、マルチプレックス RT-PCR^{8,9,15-19}、Targeted RNA sequencing²⁰⁻²³を用いた体液 mRNA マーカー検出法の評価が行われている。マルチプレックス RT-PCR や Targeted RNA sequencing は、1 回の検査で 20 種類以上の体液 mRNA マーカーを同時に検出できるため^{17,20-23}、体液の確定検査として利用される。しかし、これらの方法は工程が多く、操作が煩雑である。また、キャピラリー電気泳動装置や次世代シーケンサーのような専用の分析装置・解析ソフトウェアを必要とするため、分析に時間・手間・コストがかかる。

1 種類の体液 mRNA マーカーのみを指標とした検査法は体液識別に不十分であるが^{9,15,16}、推定検査（スクリーニング検査）として有効である。mRNA に基づくスクリーニング検査の結果はマルチプレックス RT-PCR や Targeted RNA sequencing のような確定検査を行うかどうかの指標となる。このようなスクリーニング検査には迅速性・簡便性が求められる。

1.5. Recombinase Polymerase Amplification 法

Recombinase Polymerase Amplification (RPA) 法は等温核酸増幅法である²⁴⁻²⁹。反応は 37-42°C の等温で進行し、20 分以内に終了する。RPA 法による DNA 増幅には、3 つの主要な酵素・タンパク質 (Recombinase, Single-stranded DNA binding protein, Strand-displacing DNA polymerase) が関わる (図 1A)。また、“exo probe”と呼ばれる特殊なプローブと exonuclease III を組み合わせることで、蛍光シグナルのリアルタイム解析が可能である (図 1B)。さらに、RPA 法の増幅・検出に必要な成分と逆転写酵素は同じ温度で機能するため、Reverse Transcription-RPA (RT-RPA) 法では 1 ステップで標的 RNA を検出できる (図 1C)。これらの迅速性・簡便性に加えて、RPA/RT-RPA 法は阻害因子に強く、ダイレクト法が適用された報告もある³⁰⁻³³。

臨床分野では、RPA/RT-RPA 法による細菌やウイルス等の検出技術、さらに、ラテラルフロー検出を組み合わせた Point-of-Care Testing への応用が多数報告されている^{25,26,30-33}。しかし、これまで RPA 法が法科学の分野に適用された例はない。

1.6. 本研究の目的

本研究では、RPA法を利用し、男性DNA及び血液mRNAマーカーの迅速・簡便な検出法の開発を目的とした。それぞれ、Y染色体上のマルチコピー領域³⁴⁻³⁶を標的としたRPA法（以下、Y-RPA法）、血液mRNAマーカーである*Hemoglobin β (HBB)*^{8,15-19}を標的としたRT-RPA法を確立し、法科学的試料に対する有効性を評価した。

なお、本学位論文は、以下の3編の原著論文³⁷⁻³⁹を基礎として作成されたものである。

第1編³⁷

Seiji Kubo, Hideki Niimi, Isao Kitajima

Rapid detection of blood and semen mRNA markers by reverse transcription-recombinase polymerase amplification.

Forensic Science International: Genetics 58 (2022) 102665.

第2編³⁸

Seiji Kubo, Hideki Niimi, Isao Kitajima

Rapid and direct detection of male DNA by recombinase polymerase amplification assay.

Forensic Science International: Genetics 59 (2022) 102704.

第3編³⁹

Seiji Kubo, Hideki Niimi, Isao Kitajima

Improved reverse transcription-recombinase polymerase amplification assay for blood mRNA screening: comparison with one-step RT-qPCR assay.

Forensic Science International: Genetics 63 (2023) 102808.

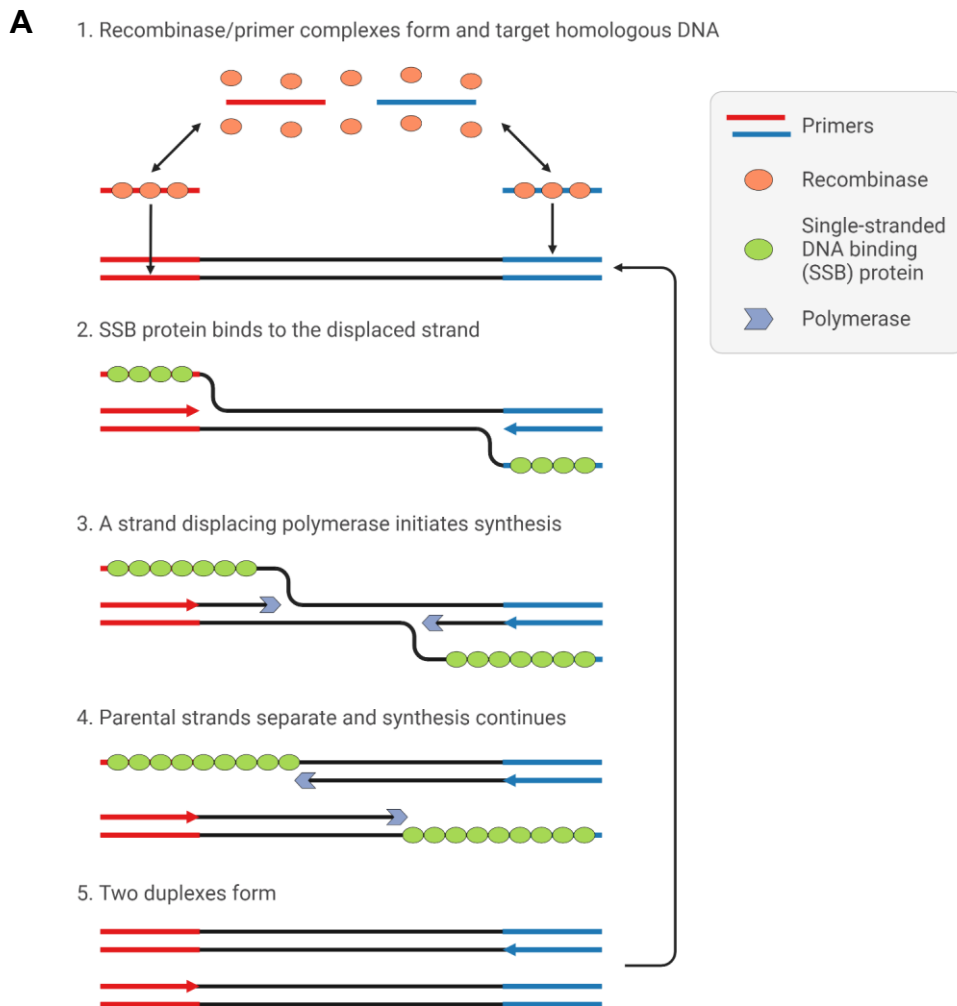


図 1. RPA 法

(A) RPA 法による DNA 増幅. Recombinase, Single-stranded DNA binding (SSB) protein, Strand-displacing polymerase が協調的に作用し、標的 DNA を増幅する. 反応は等温 (37–42°C) で進行する.

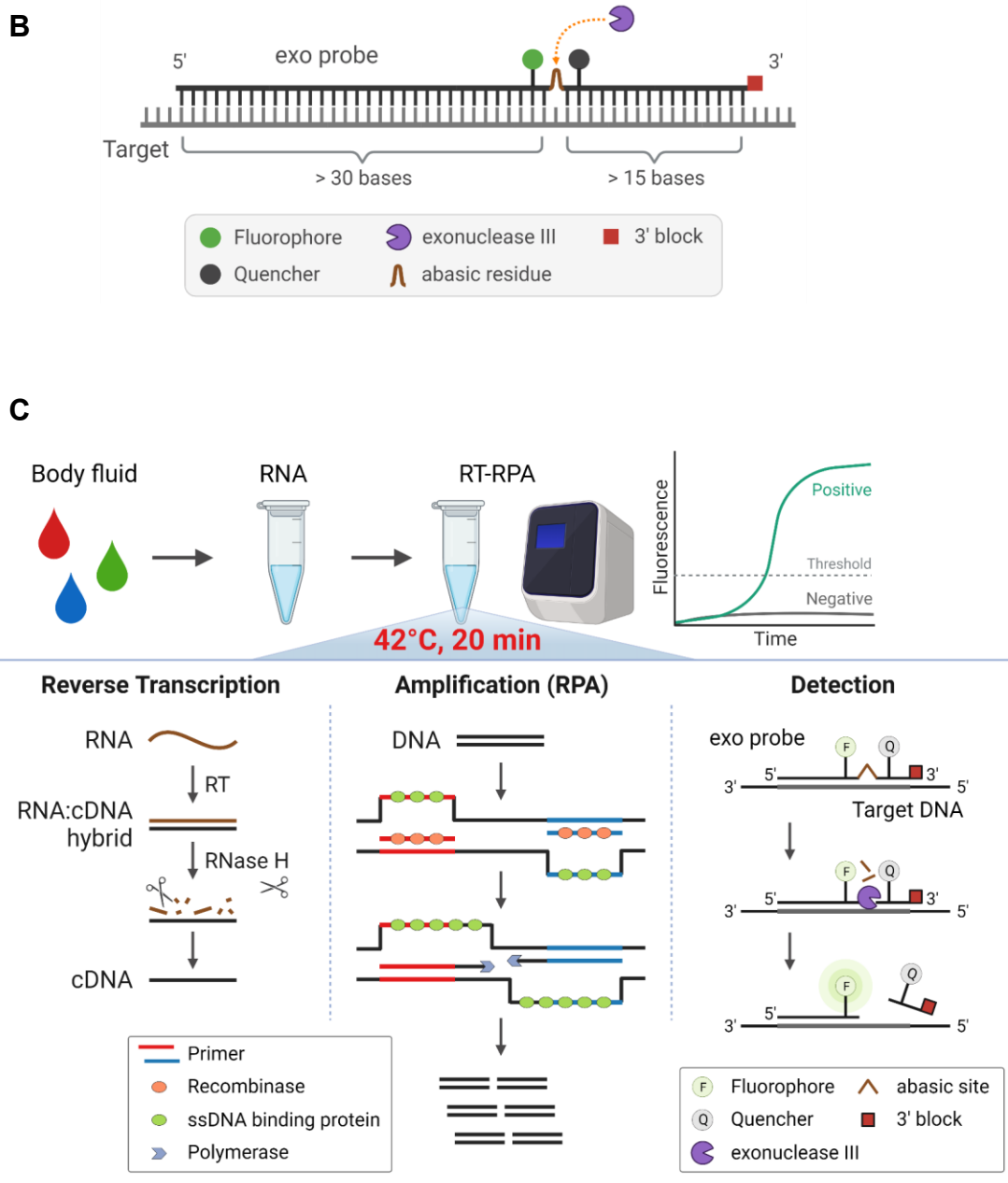


図 1. RPA 法 (続き)

- (B) *exo probe* による蛍光検出. *exo probe* が標的 DNA に結合すると, *exonuclease III* が非塩基部位 (abasic residue) で *exo probe* を切断する. これにより, *exo probe* 内の蛍光色素がクエンチャーから分離し, 蛍光を発する. *exonuclease III* 及び *exo probe* は増幅サイクルの構成要素と同じ温度で機能するため, 増幅と蛍光検出は同一チューブ内で進行する.
- (C) RT-RPA 法. 逆転写, RPA, 蛍光検出に必要なタンパク質・酵素は協調的に作用し, 標的 RNA を 42°C・20 分・1 ステップで検出する.

2. 材料及び方法

2.1. Recombinase Polymerase Amplification (RPA) 法による

男性 DNA の迅速・簡便な検出法の開発

2.1.1. コントロール DNA

Human male genomic DNA G1471 (Promega) を男性コントロール DNA とし, Human female genomic DNA G1521 (Promega) を女性コントロール DNA として使用した. 男性コントロール DNA を TE Buffer (Thermo Fisher Scientific) で 1 ng/μL に希釈し, 陽性コントロールとした. 女性コントロール DNA を TE Buffer で 10 ng/μL に希釈し, 男性特異性の確認に使用した.

男性コントロール DNA の 10 倍段階希釈系列 (テンプレート量: 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg) を検出感度の検討に使用した. また, 男性コントロール DNA と女性コントロール DNA を用いて男女混合 DNA 試料を調製した. 男性コントロール DNA のテンプレート量を 100 pg とした場合の男女混合 DNA 試料 (混合比 1:0, 1:1, 1:10, 1:100, 1:1000), 50 pg とした場合の男女混合 DNA 試料 (混合比 1:0, 1:2000) を検査に使用した.

2.1.2. 阻害剤

フミン酸 (Sigma) をヌクレアーゼフリー水で溶解・希釈した⁴⁰. 1 ng の男性コントロール DNA に 62.5, 125, 250, 500, 1000 ng/μL のフミン酸を含むテンプレートを検査に使用した. また, 1 ng の男性コントロール DNA にヌクレアーゼフリー水を含むテンプレートを検査に使用した.

ヘマチン (Sigma) を 100 mM の水酸化ナトリウム水溶液 (NaOH) で溶解・希釈した⁴⁰. 1 ng の男性コントロール DNA に 125, 250, 500, 750, 1000 μM のヘマチンを含むテンプレートを検査に使用した. また, 1 ng の男性コントロール DNA にヌクレアーゼフリー水あるいは 100 mM の NaOH を含むテンプレートを検査に使用した.

2.1.3. 体液試料

体液試料は健常者から採取した. 本研究は, 富山大学遺伝子解析研究に関する倫理審査委員会の承認を得て実施した (整理番号: I2020011, I2020012).

血液 (男性 3 名分, 女性 3 名分) は EDTA-2K 入り採血管 (日本ベクトン・ディッキンソン) に採取した. 唾液 (男性 3 名分, 女性 3 名分) 及び精液 (3 名分) は 50 mL チューブ (Sarstedt) に採取した. 膿液 (3 名分) は医療用滅菌綿棒 (日本綿棒株式会社) で採取した.

2.1.4. プライマー及びプローブ

Y染色体上のマルチコピー領域 (GenBank accession number: AF522078) を指標として、プライマー (Eurofin) 及びプローブ (Eurofin) を設計した (表 1)³⁸. RPA 法には、PCR 法の Primer3 (<https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) や LAMP 法の PrimerExplorer (<https://primerexplorer.jp/>) のようなプライマー設計用のソフトウェアがない^{25,26}. そこで、マニュアル²⁹の推奨条件に従って Forward・Reverse プライマーを各 3 つ (F1-3, R1-3) 設計し、これらの 9 通りの組み合わせの中から最適な組み合わせを検討した.

表 1 男性 DNA 検出用の RPA プライマー及びプローブ

Name	Sequence (5' to 3') ^a	Position ^b
F1	TCCACAACAGCGTGCAAAACGCTTCAAATATGCCC	164-198
F2	CCACAACAGCGTGCAAAACGCTTCAAATATGCCC	165-198
F3	CACAACAGCGTGCAAAACGCTTCAAATATGCCC	166-198
R1	ACTATCTTCGCATGAGAACCAGGCAGAAACATTCT	329-295
R2	AACTATCTTCGCATGAGAACCAGGCAGAAACATTC	330-296
R3	GTGAAAAAGGAACTATCTTCGCATGAGAACCAGGC	340-306
exo probe	AGAGATTCCACAAAAAGAGTGTTCCAAAC (FLUdT)A(Spd)(BHQ1dT)CAAATCAAAAATGA(SpC3)	201-249

^a FLUdT : FAM 標識 T, Spd : dSpacer (脱塩基部位), BHQ1dT : BHQ1 標識 T,
SpC3 : C3 spacer (伸長反応のブロック)

^b Y染色体上のマルチコピー領域 (GenBank accession number: AF522078)

2.1.5. RPA アッセイ

体液試料からの DNA 抽出・精製には、EZ1 DNA Investigator Kit (QIAGEN) を使用した. RPA 法は TwistAmp® exo kit (TwistDx) を使用し、増幅及び検出は QuantStudio® 5 リアルタイム PCR システム (Thermo Fisher Scientific) で行った. 反応は 39°C・20 分で行い、30 秒ごとに蛍光を測定した (1 サイクル=1 分). 蛍光シグナル (ΔRn) が 0.2 を超えた時のサイクル数 (Cq 値) を時間に換算し、Threshold time とした³⁸.

2.1.6. 増幅産物の確認

TwistAmp® exo kit に含まれる exonuclease III はプローブ (exo probe) だけでなく、増幅産物も分解する。増幅産物の解析を行うために、TwistAmp® Basic kit (TwistDx) を使用して RPA 法を行った。増幅は GeneAmp® PCR System 9700 (Thermo Fisher Scientific) を使用し、反応は 39°C・20 分で行った。反応後、増幅産物を FastGene™ Gel/PCR Extraction Kit (日本ジェネティクス) で精製し、Bioanalyzer (Agilent Technologies) による電気泳動解析と 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) によるシーケンス解析を行った。

2.1.7. アルカリ溶解法

体液試料を 100 µL の NaOH (100 mM) で浸出させ、95°C で 5 分加熱した。この溶液を Crude DNA とし、RPA 法に使用した。比較のため、同じ試料から抽出・精製した DNA (Purified DNA) も検査した。

男性単独試料に対する評価のため、PBS で希釈した男性血液、男性唾液、精液 (各 5, 0.5, 0.05 µL 相当) を綿棒に付着させた。男女混合試料に対する評価のため、5 µL の男女混合血液 (男性血液 : 女性血液 = 1 : 9)、5 µL の男女混合唾液 (男性唾液 : 女性唾液 = 1 : 9) を綿棒に付着させた。また、PBS で希釈した精液 (0.5 µL 相当) を、膣分泌液を拭った綿棒に付着させた。これらの体液試料を室温 (23–25°C) で一晩乾燥させた後、Crude DNA 及び Purified DNA を調製した。

2.1.8. 模擬試料

男性血液に由来する試料として、床の血痕 (#1)、ナイフ刃先の血痕 (#2)、デニム上の血痕 (#3)、22 年前に作製された血痕 (#4) を検査した。男性唾液に由来する試料として、使用済みスプーン (#5)、デニム上の唾液斑 (#6)、吸い殻 (#7)、ガム (#8) を検査した。精液に由来する試料として、床の精液斑 (#9)、コンドーム中の精液 (#10)、デニム上の精液斑 (#11)、3 年前に作製された精液斑 (#12) を検査した。

2.1.9. データ解析

QuantStudio® 5 リアルタイム PCR システムから得られたデータは、QuantStudio™ Design & Analysis Software v1.5.1 (Thermo Fisher Scientific) で解析し、GraphPad Prism 9 (GraphPad Software) でグラフ化した。図 1, 10A は BioRender (<https://biorender.com/>) で作成した。

2.2. Reverse Transcription-Recombinase Polymerase Amplification (RT-RPA) 法による 血液 mRNA マーカーの迅速・簡便な検出法の開発

2.2.1. コントロール核酸

Peripheral Blood Leukocyte Total RNA (BioChain) をコントロール RNA として使用した。コントロール RNA を TE Buffer (Thermo Fisher Scientific) で 0.01 ng/ μ L に希釈し、陽性コントロールとした。また、コントロール RNA の 10 倍段階希釈系列 (テンプレート量: 1, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} ng) を検出感度の検討に使用した。

PrimeScript™ RT Master Mix (TaKaRa) を用いてコントロール RNA 50 ng から合成した cDNA を 200 倍希釈し、プライマー及びプローブの最適化に使用した。

3 種類のゲノム DNA (gDNA): Human male genomic DNA G1471 (Promega) を gDNA1, Human female genomic DNA G1521 (Promega) を gDNA2, Standard DNA (Thermo Fisher Scientific) を gDNA3 として使用した。プライマーの特異性を評価するため、20 ng の gDNA1 を検査に使用した。また、DNase 処理の工程が省略可能か検討するため、100 ng の gDNA1-3 を検査に使用した。

2.2.2. 阻害剤

フミン酸 (Sigma) をヌクレアーゼフリー水で溶解・希釈した⁴⁰。0.01 ng のコントロール RNA に 250, 500, 1000 ng/ μ L のフミン酸を含むテンプレートを検査に使用した。

ヘマチン (Sigma) を 100 mM の NaOH で溶解・希釈した⁴⁰。0.01 ng のコントロール RNA に 125, 250, 500 μ M のヘマチンを含むテンプレートを検査に使用した。

タンニン酸 (Sigma) をヌクレアーゼフリー水で溶解・希釈した⁴⁰。0.01 ng のコントロール RNA に 1000, 2000, 4000 ng/ μ L のタンニン酸を含むテンプレートを検査に使用した。

メラニン (Sigma) を 1% (v/v) のアンモニア水で溶解・希釈した⁴⁰。0.01 ng のコントロール RNA に 62.5, 125, 250 ng/ μ L のメラニンを含むテンプレートを検査に使用した。

また、0.01 ng のコントロール RNA にヌクレアーゼフリー水, 100 mM の NaOH, または 1% (v/v) のアンモニア水を含むテンプレートを検査に使用した。

2.2.3. 体液試料

体液試料は健常者から採取した。本研究は、富山大学遺伝子解析研究に関する倫理審査委員会の承認を得て実施した（整理番号：I2020011, I2020012）。

血液（6名分）は EDTA-2K 入り採血管（日本ベクトン・ディッキンソン）に採取した。唾液（6名分）及び精液（6名分）は 50 mL チューブ（Sarstedt）に採取した。膣液（3名分・2回）は医療用滅菌綿棒（日本綿棒株式会社）で採取した。

血液（4名分）の 10 倍段階希釈系列（10, 1, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ μL 相当）から RNA を抽出し、血液量に対する検出感度の検討に使用した。

50 μL の血液（6名分）、50 μL の唾液（6名分）、50 μL の精液（6名分）、膣分泌液を拭った 1 本分の綿棒（6試料：3名分を各 2 回採取）から RNA を抽出し、体液特異性の検討に使用した。

2.2.4. プライマー及びプローブ

HBB mRNA（GenBank accession number: NM000518）を指標として、プライマー（Eurofin）及びプローブ（Eurofin）を設計した（表 2, 図 2）^{37,39}。プローブの最適化のため、3つのプローブ（P1-3）を検証した。プライマーの最適化のため、Forward・Reverse プライマー各 3 つ（F1-3, R1-3）の 9通りの組み合わせを検証した。

表 2 *HBB* mRNA 検出用の RPA プライマー及びプローブ

Name	Sequence (5' to 3') ^a	Position ^b
F1	CTGCACGTGGATCCTGAGAACTTCAGGCTCCTG	339-371
F2	CAAGCTGCACGTGGATCCTGAGAACTTCAGGC	335-366
F3	CTGTGACAAGCTGCACGTGGATCCTGAGAACTTCAG	329-364
F4	CTCACCTGGACAACCTCAAGGGCACCTTTGCCACA	280-314
R1	CCCAGTTTAGTAGTTGGACTTAGGGAACAAAGG	563-531
R2	TTTAGTAGTTGGACTTAGGGAACAAAGGAACC	558-527
R3	CATAATATCCCCAGTTTAGTAGTTGGACTTAGGG	573-539
R4	CTGCACTGGTGGGGTGAATTCTTTGCCAAAGTGAT	434-400
P1	TGGCCCACAAGTATCACTAAGCTCGCTTTC (FLUdT)T(Spd)C(BHQ1dT)GTCCAATTTCTATTA(SpC3)	475-524
P2	TGGCAAAGAATTCACCCACCAAGTGCAGGC (FLUdT)G(Spd)C(BHQ1dT)ATCAGAAAGTGGTGG(SpC3)	407-456
P3	TGACAAGCTGCACGTGGATCCTGAGAACT (FLUdT)CA(Spd)GC(BHQ1dT)CCTGGGCAACGT(SpC3)	332-379

^a FLUdT : FAM 標識 T, Spd : dSpacer (脱塩基部位), BHQ1dT : BHQ1 標識 T, SpC3 : C3 spacer (伸長反応のブロック)

^b 血液 mRNA マーカー *HBB* (GenBank accession number: NM000518)

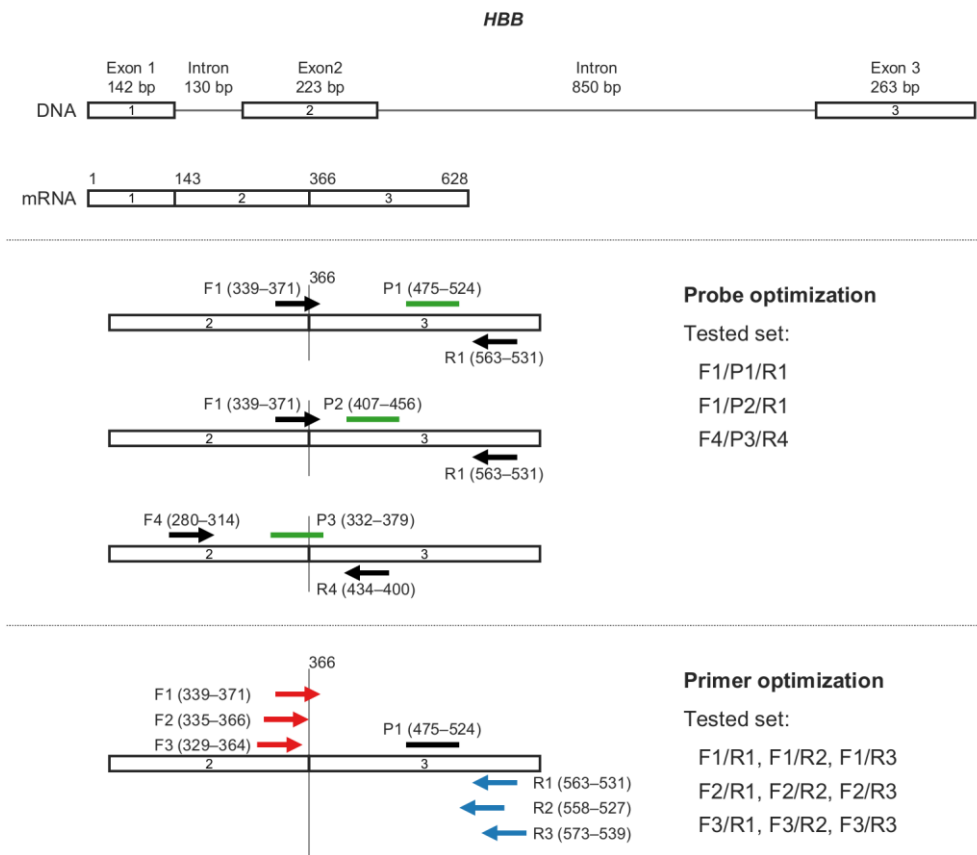


図 2. *HBB* プライマー及びプローブの検討

HBB 遺伝子と検証したプライマー・プローブの組み合わせを示す。

2.2.5. 反応条件の検討

逆転写の過程で生じる RNA:cDNA hybrid は、その後の増幅工程を阻害することが報告されている^{41,42}。そこで、RNA:cDNA hybrid の RNA のみを選択的に分解する RNase H (NEB) の有無で RT-RPA 反応を比較した。

逆転写酵素量の最適化を行うため、5, 10, 20 U の逆転写酵素 SuperScript™ IV Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific) を使用し、RT-RPA 反応を比較した。

RPA 法に採用されている分子クラウディング剤は、プライマーと Recombinase の複合体形成を促進する一方で、その粘性は反応成分の拡散を妨害する^{26,43}。反応成分の局在化・局所的な枯渇を防ぐため、RPA キットのマニュアルでは反応の4分後に反応溶液を攪拌させることが推奨されている²⁸。この影響を調べるため、攪拌工程の有無で RT-RPA 反応を比較した。

2.2.6. RT-RPA アッセイ

体液試料からの RNA 抽出・精製には、RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を使用し、残存するゲノム DNA は RNase-free DNase Set (QIAGEN) で分解した。RT-RPA 法は TwistAmp® exo kit (TwistDx), SuperScript™ IV Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific), RNase H (NEB) を使用し、増幅及び検出は QuantStudio® 5 リアルタイム PCR システム (Thermo Fisher Scientific) で行った。反応は 42°C・20 分で行い、30 秒ごとに蛍光を測定した (1 サイクル = 1 分)。蛍光シグナル (ΔRn) が 50000 を超えた時のサイクル数 (C_q 値) を時間に換算し、Threshold time とした³⁹。

2.2.7. 増幅産物の確認

増幅産物の解析を行うために、TwistAmp® Basic kit (TwistDx) を使用して RT-RPA 法を行った。増幅は GeneAmp® PCR System 9700 (Thermo Fisher Scientific) を使用し、反応は 42°C・20 分で行った。反応後、増幅産物を FastGene™ Gel/PCR Extraction Kit (日本ジェネティクス) で精製し、Bioanalyzer (Agilent Technologies) による電気泳動解析と 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) によるシーケンス解析を行った。

2.2.8. 簡易 RNA 抽出法

体液試料を 10 mM TCEP (FUJIFILM) 及び 1 mM EDTA (Thermo Fisher Scientific) を含む水溶液で浸出させ、95°C で 5 分加熱した^{41,44}。この溶液を遠心分離 (12,000 × g, 2 min) し、上清を Crude RNA として、RT-RPA 法に使用した。比較のため、同じ試料から抽出・精製した RNA (Purified RNA) も検査した。

検出感度の検討のため、PBS で 10 倍段階希釈した血液 (5, 0.5, 0.05, 0.005, 0.0005 µL 相当) を綿棒に付着させた。特異性の検討のため、10 µL の血液 (3 名分)、20 µL の唾液 (3 名分)、20 µL の精液 (3 名分) を綿棒に付着させた。また、膣分泌液を拭った綿棒の半分 (3 名分) を使用した。混合試料の検討のため、PBS で希釈した血液 (0.5 µL 相当) を 20 µL の PBS, 20 µL の唾液 (3 名分)、20 µL の精液 (3 名分) と混合し、綿棒に付着させた。また、PBS で希釈した血液 (0.5 µL 相当) を、膣分泌液を拭った綿棒の半分 (3 名分) に付着させた。これらの体液試料を室温 (23–25°C) で一晩乾燥させた後、Crude RNA 及び Purified RNA を調製した。

2.2.9. 模擬試料

血液に由来する試料として、デニム (#1)、ハンカチ (#2)、マスク (#3)、肌着 (#4)、ゴム手袋 (#5)、床 (#6)、壁 (#7)、木製机 (#8)、ナイフ刃先 (#9)、スマートフォン (#10)、眼鏡 (#11) に付着した血痕を検査した。

2.2.10. データ解析

QuantStudio® 5 リアルタイム PCR システムから得られたデータは、QuantStudio™ Design & Analysis Software v1.5.1 (Thermo Fisher Scientific) で解析し、GraphPad Prism 9 (GraphPad Software) でグラフ化した。図 1, 10B は BioRender (<https://biorender.com/>) で作成した。

3. 結果及び考察

3.1. Recombinase Polymerase Amplification (RPA) 法による

男性 DNA の迅速・簡便な検出法の開発

3.1.1. Y-RPA 法の確立

Y-RPA 法用のプライマーを検討した結果、男性 DNA は全てのプライマーの組み合わせで検出され、F2/R3 の組み合わせで最も早く検出された (図 3A)。また、F2/R3 を用いて女性 DNA を検査した結果、蛍光シグナルの増加及び増幅産物は認められなかった (図 3B)。以上の結果から、迅速性及び男性特異性にに基づき、F2/R3 を Y-RPA 法の最適なプライマーとした。

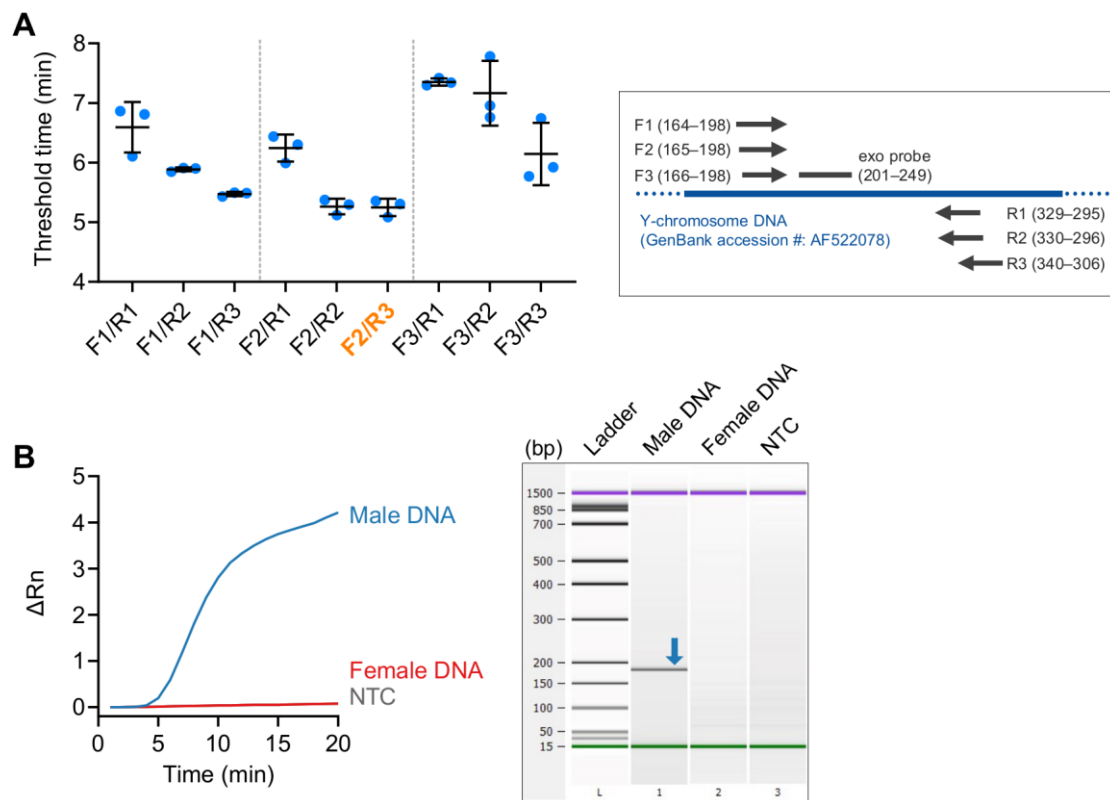


図 3. Y-RPA 法の確立

(A) プライマーの最適化. 9通りの組み合わせ (F1-3 × R1-3) の検討結果.

Threshold time (平均値 ± 標準偏差, n = 3) を示す.

(B) 反応の確認. 男性 DNA (Male DNA), 女性 DNA (Female DNA), テンプレートなしの陰性コントロール (NTC) に対する Y-RPA. 典型的な増幅曲線 (左) と電気泳動図 (右) を示す. 矢印は特異的な増幅産物 (176 bp) を示す.

3.1.2. Y-RPA 法の評価

Y-RPA 法の検出感度を検討した結果、男性 DNA 100 pg までは全ての検査 (n = 8) で検出され、10 pg では 8 回のうち 6 回の検査で検出された (図 4A)。男性 DNA 1 pg からは検出されなかった。Y-RPA 法の検出感度は qPCR 法に比べて 10 倍程度劣るが^{12,13}、DNA 型検査において必要な感度 (完全な DNA 型を得るための感度) を上回っている¹²。そのため、Y-RPA 法は高い検出感度を有すると判断される。Y-RPA 法の検出感度を qPCR 法のレベルまで向上させるためには、プライマー・プローブの更なる最適化、反応条件の改善等が必要になる。

男女混合 DNA 試料を検査した結果、全ての試料から男性 DNA は検出された (図 4B)。女性 DNA が男性 DNA に対して 1,000 倍を超えると、検出時間に遅れが生じた。市販の qPCR キットでは、男性 DNA に対して 200,000 倍の女性 DNA が混合していても、男性 DNA の検出に影響しないことが示されている¹³。これらの結果は、qPCR 法と比較して、RPA 法は非標的 DNA の影響を受けやすい検出系であることを示している。

Y-RPA 法の阻害耐性を検討した結果、最大で 1000 ng/μL のフミン酸または 500 μM のヘマチンを含むテンプレートからも男性 DNA は検出された (図 4C)。また、フミン酸の濃度を増加させても増幅産物の量は変わらなかったことから、フミン酸は蛍光検出の工程を阻害すると推定された。一方、ヘマチンの濃度を増加させると増幅産物の量が減少したことから、ヘマチンは DNA 増幅の工程を阻害すると推定された。

Quantifiler™ Trio (Thermo Fisher Scientific) は阻害に強い qPCR キットで、男性 DNA 検出に関して 400 ng/μL のフミン酸または 500 μM のヘマチンに阻害耐性がある^{4,12}。このキットとの比較から、Y-RPA 法は Quantifiler™ Trio と同等の高い阻害耐性を有していると判断される。さらに、Quantifiler™ Trio はダイレクト qPCR 法としての使用も報告されている^{4,10}。これらの知見は、Y-RPA 法がダイレクト法として使用できる可能性を示唆するものである。

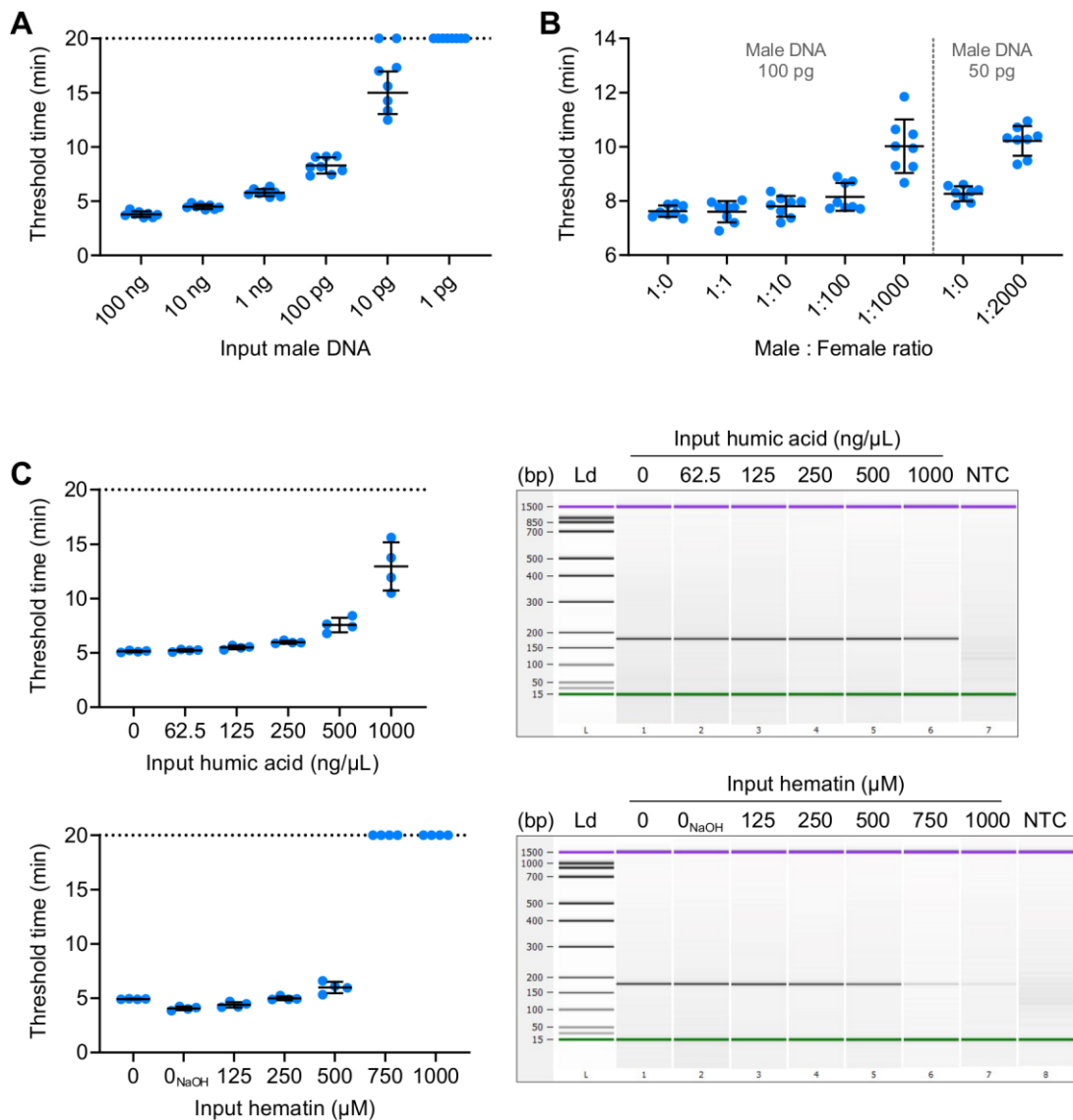


図 4. Y-RPA 法の評価

- (A) 検出感度の検討. 男性 DNA の希釈系列 (100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg) の検査結果. Threshold time (平均値 ± 標準偏差, n = 8) を示す.
- (B) 混合試料の検討. 男女混合 DNA 試料 (男性 DNA 100 pg 固定で男女比 1:0, 1:1, 1:10, 1:100, 1:1000, 男性 DNA 50 pg 固定で男女比 1:0, 1:2000) の検査結果. Threshold time (平均値 ± 標準偏差, n = 8) を示す.
- (C) 阻害因子の影響. フミン酸 (62.5, 125, 250, 500, 1000 ng/μL) またはヘマチン (125, 250, 500, 750, 1000 μM) の検査結果. (左) Threshold time (平均値 ± 標準偏差, n = 4) と (右) 典型的な電気泳動図を示す. Threshold time = 20 のプロットは不検出のサンプル.

3.1.3. ダイレクト Y-RPA 法の検討

男性単独試料の Crude DNA を使用してダイレクト Y-RPA 法を行った結果、いずれの体液からも男性 DNA が検出され、その検出感度は Purified DNA を使用した Y-RPA 法と同等であった (図 5A)。混合体液試料の Crude DNA を使用してダイレクト Y-RPA 法を行った結果、男女混合血液及び男女混合唾液から男性 DNA が検出されたが、混合精液では検出が阻害された (図 5B)。

膣分泌液成分の阻害効果を低減させるため、混合精液から抽出した DNA を 2 倍段階希釈し、再度検査を行った。結果、希釈した全ての試料から男性 DNA が検出された (図 5C)。本検討では最適な希釈倍率は 8 倍であった。

Crude DNA の希釈あるいは溶解する試料自体の量を減らすことは阻害効果を低減させるために有効であるが、同時に、反応させる男性 DNA の量も減少させる。そのため、女性体液の阻害効果による偽陰性と男性 DNA の希釈による偽陰性はトレードオフの関係にあることに注意する必要がある。

以上の結果から、体液試料に対するダイレクト Y-RPA 法の適用可能性が示された。

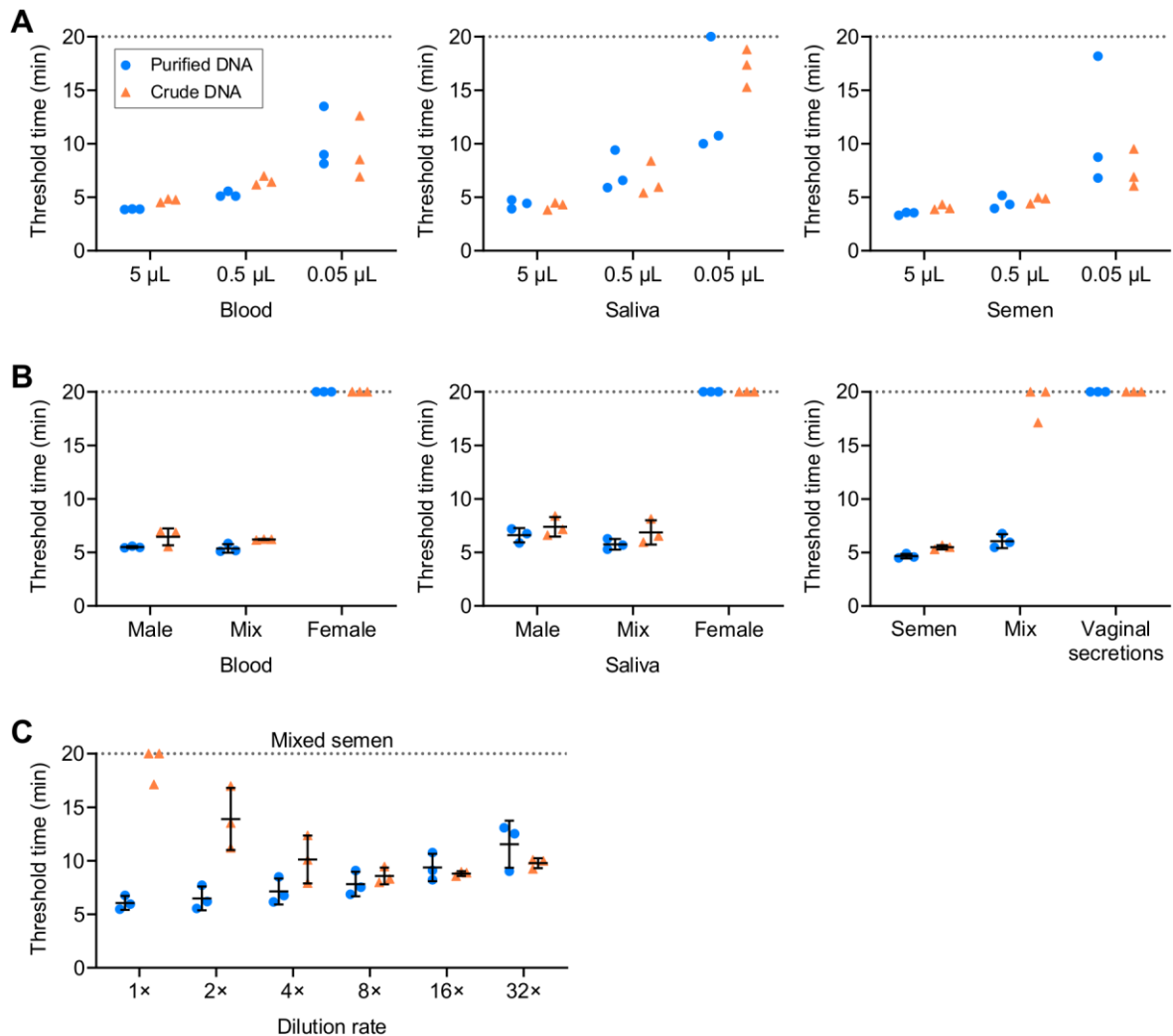


図 5. ダイレクト Y-RPA 法の検討

- (A) 男性単独試料の検討。血液、唾液、精液の希釈系列 (5, 0.5, 0.05 μ L) から抽出した Purified DNA 及び Crude DNA の検査結果。Threshold time ($n = 3$ 人分) を示す。
- (B) 混合体液試料の検討。混合血液 (男性血液 : 女性血液 = 1 : 9), 混合唾液 (男性唾液 : 女性唾液 = 1 : 9), 混合精液 (10 倍希釈精液と膣分泌液を拭った綿棒の混合) から抽出した Purified DNA 及び Crude DNA の検査結果。Threshold time (平均値 \pm 標準偏差, $n = 3$) を示す。
- (C) Crude DNA の希釈の影響。混合精液から得られた Purified DNA 及び Crude DNA の希釈系列 (2, 4, 8, 16, 32 倍希釈) の検査結果。Threshold time (平均値 \pm 標準偏差, $n = 3$) を示す。
- Threshold time = 20 のプロットは不検出のサンプル。

3.1.4. 法科学的試料への応用

作製した模擬試料及び Y-RPA 法の結果を表 3 に示す。Purified DNA と Crude DNA のいずれの使用でも全ての模擬試料から男性 DNA が検出された。Crude DNA には体液成分に加えて染料等の材料成分が含まれるが、今回検証した試料では明らかな阻害効果は認められなかった。よって、Y-RPA 法の法科学的試料への適用可能性が示唆された。

実際の法科学的試料は衣類、食品、砂土、あるいは微生物等に由来するさまざまな物質を含むことが多く、これらの物質がアルカリ溶解法・Y-RPA 法の阻害要因となる可能性がある。今後、より多くの法科学的試料を用いた広範的な検証が必要になる。

表 3 模擬試料を用いた Y-RPA 法の検討

#	試料	体液量 ^a	期間 ^b	DNA 抽出 ^c	Threshold time (min)	
					Purified DNA	Crude DNA
1	床の血痕	5 µL	46 日	綿棒	3.90	5.70
2	ナイフ刃先の血痕	5 µL	42 日	綿棒	4.05	5.09
3	デニム上の血痕	5 µL	58 日	5 × 5 mm	3.85	5.09
4	コットン上の血痕	unknown	22 年	5 × 5 mm	4.30	6.16
5	使用済みスプーン	unknown	7 日	綿棒	4.86	5.79
6	デニム上の唾液斑	5 µL	29 日	5 × 5 mm	4.03	5.14
7	吸い殻	unknown	3 日	5 × 5 mm	8.71	12.77
8	ガム	unknown	16 日	30 mg	4.50	7.94
9	床の精液斑	5 µL	46 日	綿棒	3.50	3.90
10	コンドーム中の精液	50 µL	42 日	綿棒	3.35	3.75
11	デニム上の精液斑	5 µL	58 日	5 × 5 mm	3.54	4.21
12	コットン上の精液斑	unknown	3 年	5 × 5 mm	3.51	4.33

^a 試料の作製に使用した体液量。unknown: 体液量を決定できないもの

^b 試料の作製から DNA 抽出までの期間

^c 綿棒: 綿棒で採取後、綿球の半分を使用

3.2. Reverse Transcription-Recombinase Polymerase Amplification (RT-RPA) 法による血液 mRNA マーカーの迅速・簡便な検出法の開発

3.2.1. *HBB* プライマー及びプローブの選択

HBB mRNA のプローブを検討した結果、P1 のみが cDNA に特異的な蛍光シグナルを示し、P2 及び P3 はネガティブコントロール (NTC) に対して非特異的な蛍光シグナルを示した (図 6A)。よって、P1 を最適なプローブとした。

HBB mRNA のプライマーを検討した結果、R2 を使用した組み合わせが cDNA に特異的な蛍光シグナルを示し、R1 及び R3 のプライマーはゲノム DNA に対して非特異的な蛍光シグナルを示した (図 6B)。R2 を使用した組み合わせのうち、F3/R2 で最も早く *HBB* が検出された (図 6C)。よって、F3/R2 を最適なプライマーとした。

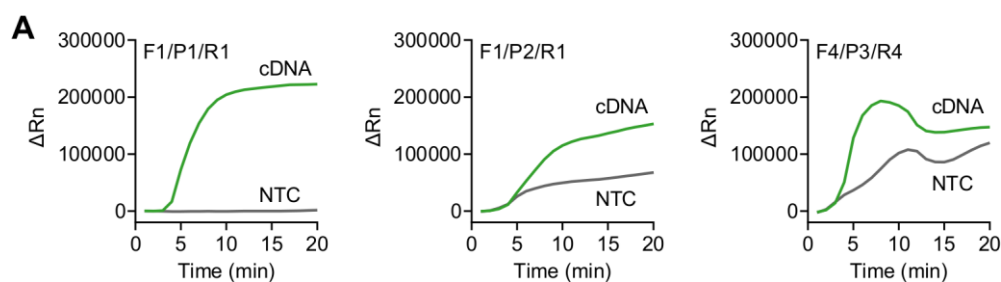


図 6. *HBB* プライマー及びプローブの選択

(A) プローブの最適化. cDNA 及びテンプレートなしの陰性コントロール (NTC) に対する 3 つのプローブ (P1, P2, P3) の検討結果. 典型的な増幅曲線を示す.

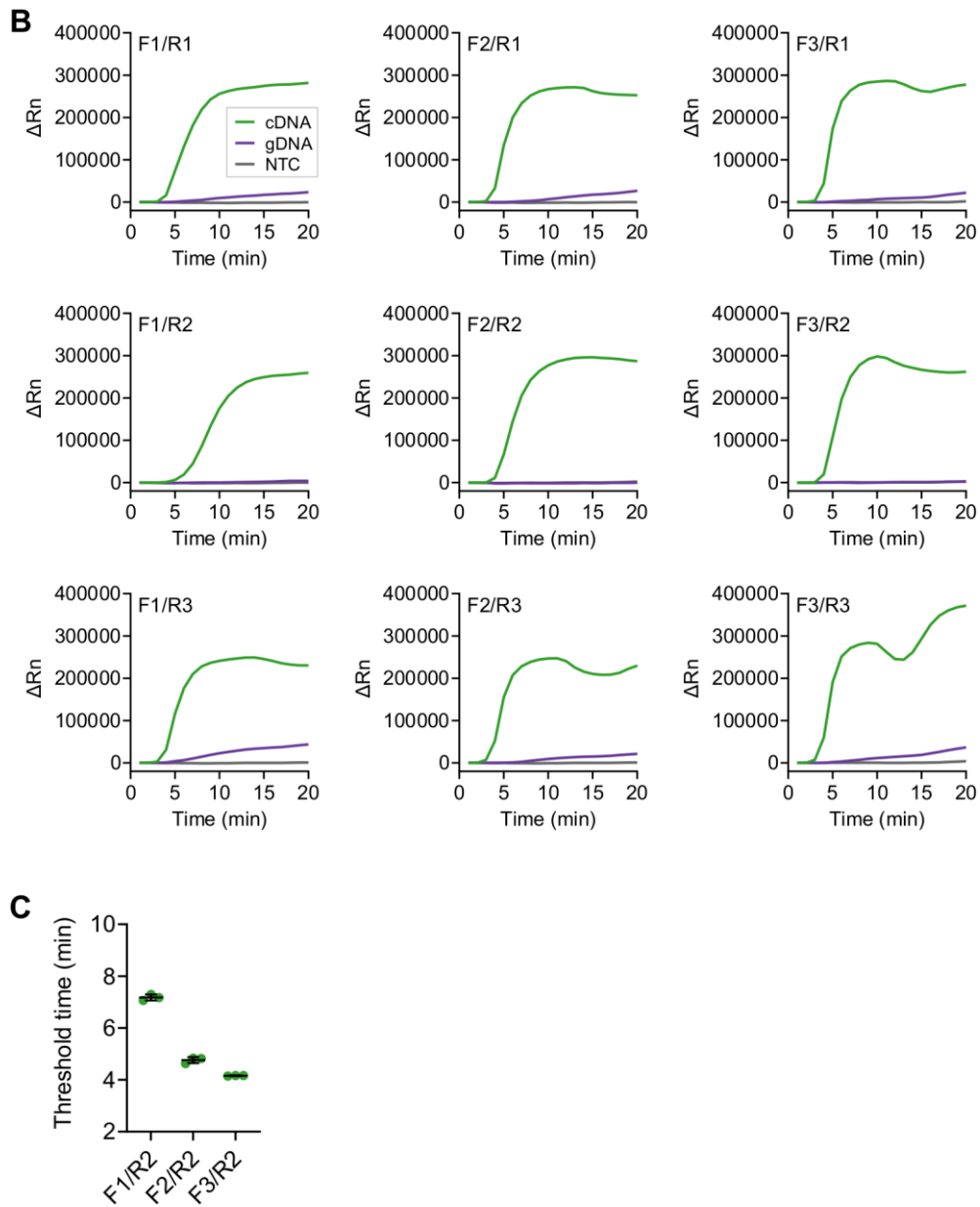


図 6. *HBB* プライマー及びプローブの選択 (続き)

(B) プライマーの最適化. cDNA, ゲノム DNA (gDNA), NTC に対する 9 通りのプライマーの組み合わせの検討結果. 典型的な増幅曲線を示す.

(C) F1/R2, F2/R2, F3/R2 の Threshold time (平均値 ± 標準偏差, n = 3) を示す.

3.2.2. RT-RPA 反応条件の最適化

RNase H の有無で RT-RPA 反応を比較した結果、RNase H の添加で *HBB* の検出時間が早くなることが確認された (図 7A)。この結果は、RT-RPA 法における RNase H の反応促進効果を調べた先行研究と一致した^{41,42}。次に、逆転写酵素の量を検討した結果、20 U を使用した場合に最も早く *HBB* が検出された (図 7B)。よって、RNase H の添加及び 20U の逆転写酵素の使用を最適な反応溶液の条件とした。

反応途中における反応溶液の攪拌の影響を検討した結果、攪拌工程の省略により、反応が遅れが生じた (図 7C)。攪拌工程は、(1) 反応開始から 4 分後に一時停止、(2) 反応溶液の混合・遠心、(3) 反応の再開という作業を伴い、検査者は反応開始後も攪拌工程を行うために装置の近くで待機する必要がある。これらの工程の省略は作業の簡便化につながるが、本研究では反応効率を優先し、攪拌工程を導入した。

最適な反応条件での典型的な増幅曲線を図 7D に示す。また、電気泳動及びシーケンス解析の結果、*HBB* mRNA 特異的な増幅産物が確認された (図 7E)。

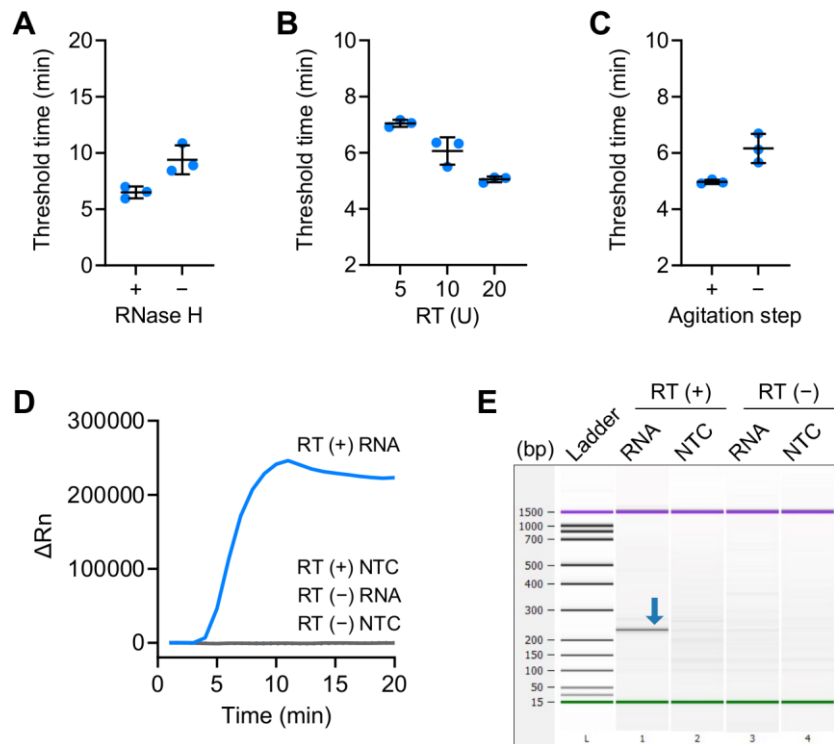


図7. RT-RPA 反応条件の最適化

- (A) RNase H の有無 (+/-) の影響. RNase H の添加 (+) によって反応が促進する.
- (B) 逆転写酵素 (RT) 量の影響. 20 U の使用で最も早い検出を示す.
- (C) 攪拌工程の有無 (+/-) の影響. 攪拌工程 (+) によって反応が促進する.
- (D) 典型的な増幅曲線. 逆転写酵素の有無 (RT (+/-)) で, コントロール RNA (RNA) 及びテンプレートなしの陰性コントロール (NTC) に対する反応.
- (E) 典型的な電気泳動図. 矢印は特異的な増幅産物 (230 bp) を示す.
- (A-C) Threshold time (平均値 ± 標準偏差, n = 3) を示す.

3.2.3. RT-RPA 法の評価

RT-RPA 法の白血球 RNA 量に対する検出感度を検討した結果、白血球 RNA 10^{-3} ng までは全ての検査 ($n = 8$) で *HBB* が検出され、 10^{-4} ng では 8 回のうち 6 回の検査で検出された (図 8A)。白血球 RNA 10^{-5} ng から *HBB* は検出されなかった。また、血液量に対する検出感度を検討した結果、血液 10^{-2} μ L までは全てのサンプル ($n = 8$) で *HBB* が検出され、 10^{-3} μ L では 7 サンプルで検出され、 10^{-4} μ L では 2 サンプルで検出された (図 8A)。これらの検出感度は、これまで報告されているマルチプレックス RT-PCR (10^{-3} ng の血液トータル RNA または 10^{-2} – 10^{-3} μ L の血液) や Targeted RNA sequencing (1 ng の血液トータル RNA) の検出感度よりも高い^{8,15–17,22}。よって、RT-RPA 法はスクリーニング検査として十分な検出感度を有する。

RT-RPA 法の体液特異性を検討した結果、全ての血液サンプルから *HBB* が検出されたが、一部の唾液サンプル ($n = 1/6$)、精液サンプル ($n = 1/6$)、膿液サンプル ($n = 3/6$) から *HBB* が検出された (図 8B)。唾液、精液、膿液にも血液 (あるいは白血球) に由来する mRNA が存在することが報告されており^{7,22}、これらの非標的体液中の微量な *HBB* が検出された可能性がある。この結果は、RT-RPA 法が高い検出感度を有することを実証している。一方、本検討で使用した体液は比較的多量 (50 μ L) で新鮮 (-80°C 保存) であったが、犯罪現場に遺留される体液は微量なことが多く、環境要因によって RNA の分解が進行している可能性も高い。よって、実際の法科学的試料において、血液以外の非標的体液から *HBB* が検出される可能性は低い、あるいは *HBB* が検出される非標的体液試料は少ないと推定される。

ゲノム DNA を用いて mRNA に対する特異性を検討した結果、ゲノム DNA から非特異的な増幅は検出されなかった (図 8C)。よって、RNA テンプレート調製において DNase 処理の工程が省略できることが示された。

RT-RPA 法の阻害耐性を検討した結果、白血球 RNA に 500 ng/ μ L のフミン酸、250 μ M のヘマチン、4000 ng/ μ L のタンニン酸、125 ng/ μ L のメラニンを含む RNA テンプレートからも *HBB* が検出された (図 8D)。これらの結果から、RT-RPA 法は高い阻害耐性を有することが確認された^{12,13}。

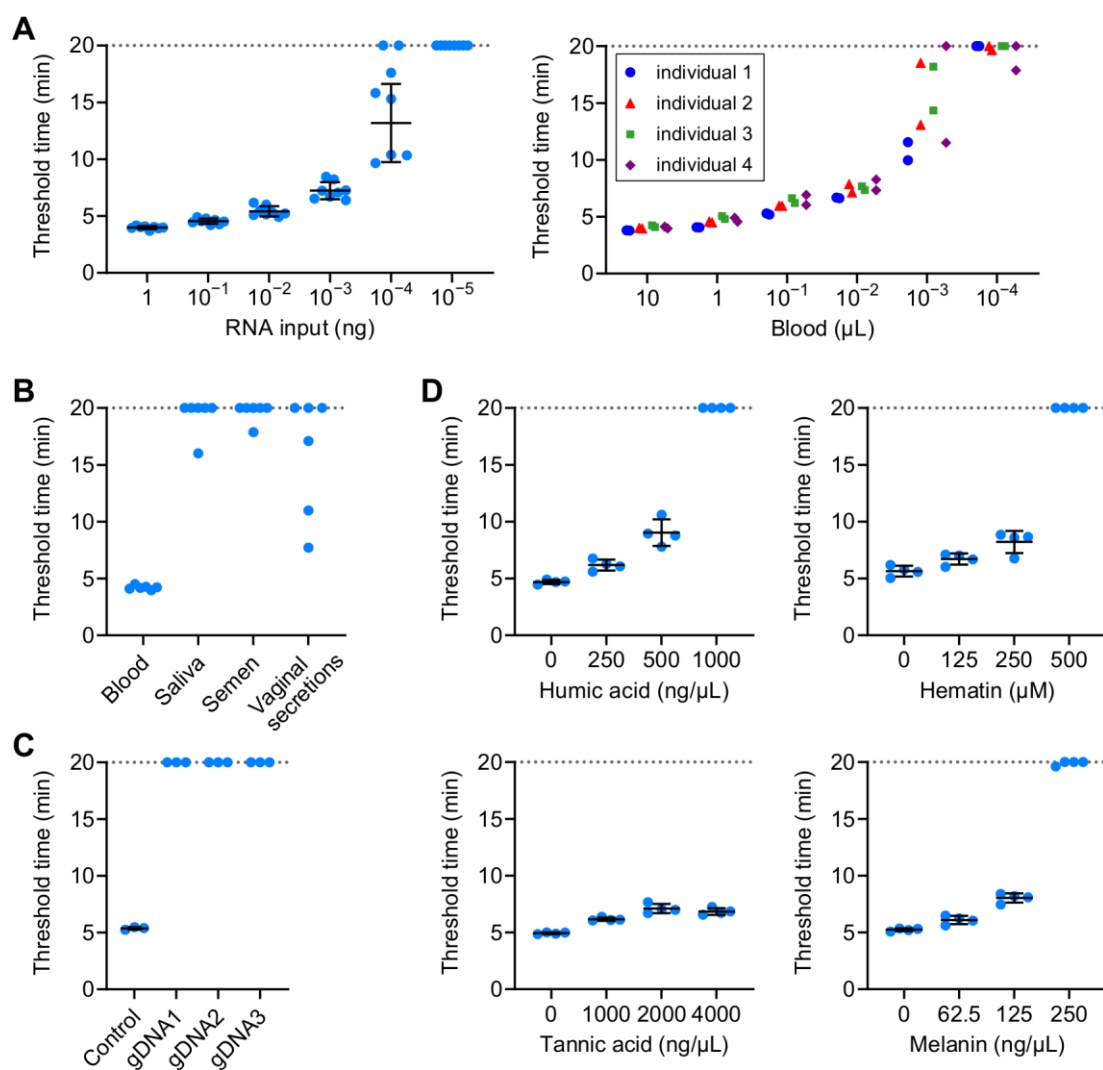


図 8. RT-RPA 法の評価

- (A) 検出感度の検討. (左) 白血球 RNA の希釈系列 (1, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} ng) の検査結果. Threshold time (平均値 ± 標準偏差, n = 8) を示す. (右) 血液の希釈系列 (10, 1, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} μ L) の検査結果. Threshold time (n = 4 人分 \times 2 replicates) を示す.
- (B) 体液特異性の検討. 血液, 唾液, 精液, 膣液から抽出した RNA の検査結果. Threshold time (n = 6 biological replicates) を示す.
- (C) ゲノム DNA の影響. gDNA1-3 (各 100 ng) の検査結果. Threshold time (平均値 ± 標準偏差, n = 3) を示す.
- (D) 阻害因子の影響. フミン酸 (250, 500, 1000 ng/ μ L), ヘマチン (125, 250, 500 μ M), タンニン酸 (1000, 2000, 4000 ng/ μ L), メラニン (62.5, 125, 250 ng/ μ L) の検査結果. Threshold time (平均値 ± 標準偏差, n = 4) を示す. Threshold time = 20 のプロットは不検出のサンプル.

3.2.4. ダイレクト RT-RPA 法の検討

血液から調製した Crude RNA に対してダイレクト RT-RPA を行った結果、蛍光検出及び特異的な増幅産物が確認された (図 9A)。すなわち、Crude RNA 中に *HBB* mRNA が放出されていること、RT-RPA 法は Crude RNA からも *HBB* を検出できることが示された。また、Crude RNA を室温 (23–25°C) で 12 日間放置した後も安定的に *HBB* が検出された (図 9B)。よって、Crude RNA 中の RNase は不活性化されていることが確認された。

ダイレクト RT-RPA 法の検出感度を検討した結果、0.5 μ L 相当の血液が検出限界であった (図 9C)。Purified RNA を使用した場合、0.0005 μ L 相当の血液からも *HBB* が検出された。

次に、ダイレクト RT-RPA 法の特異性を検討した結果、血液のみから *HBB* が検出された (図 9D)。Purified RNA を使用した場合、唾液 ($n = 2/3$) 及び精液 ($n = 3/3$) からも *HBB* が検出された。この結果は、Crude RNA の検出感度が Purified RNA よりも低いことに加えて、唾液や精液の体液成分が簡易 RNA 抽出または RT-RPA 反応を阻害したためと考えられる。

さらに、血液と非標的体液の混合試料を検査した結果、*HBB* 検出は唾液成分によって著しく阻害され、精液成分によって完全に阻害された (図 9E)。Purified RNA を使用した場合、全ての混合試料から *HBB* が検出された。

以上の結果から、*HBB* の確実な検出には RNA 精製が必要である。しかし、RNA 抽出・精製工程は反応チューブの開閉、溶液の移動、遠心操作を繰り返し行う必要がある。多くの試料を処理する場合には、時間と手間がかかるだけでなく、コンタミネーション・人為的な操作ミスリスクが高くなる。一方、Crude RNA を使用した場合は、感度の低さや阻害因子の影響によって偽陰性が生じる危険があるが、RNA テンプレート調製の迅速化・簡便化に貢献できる。今後、簡易 RNA 抽出法やダイレクト RT-RPA 法の改善が必要になる。

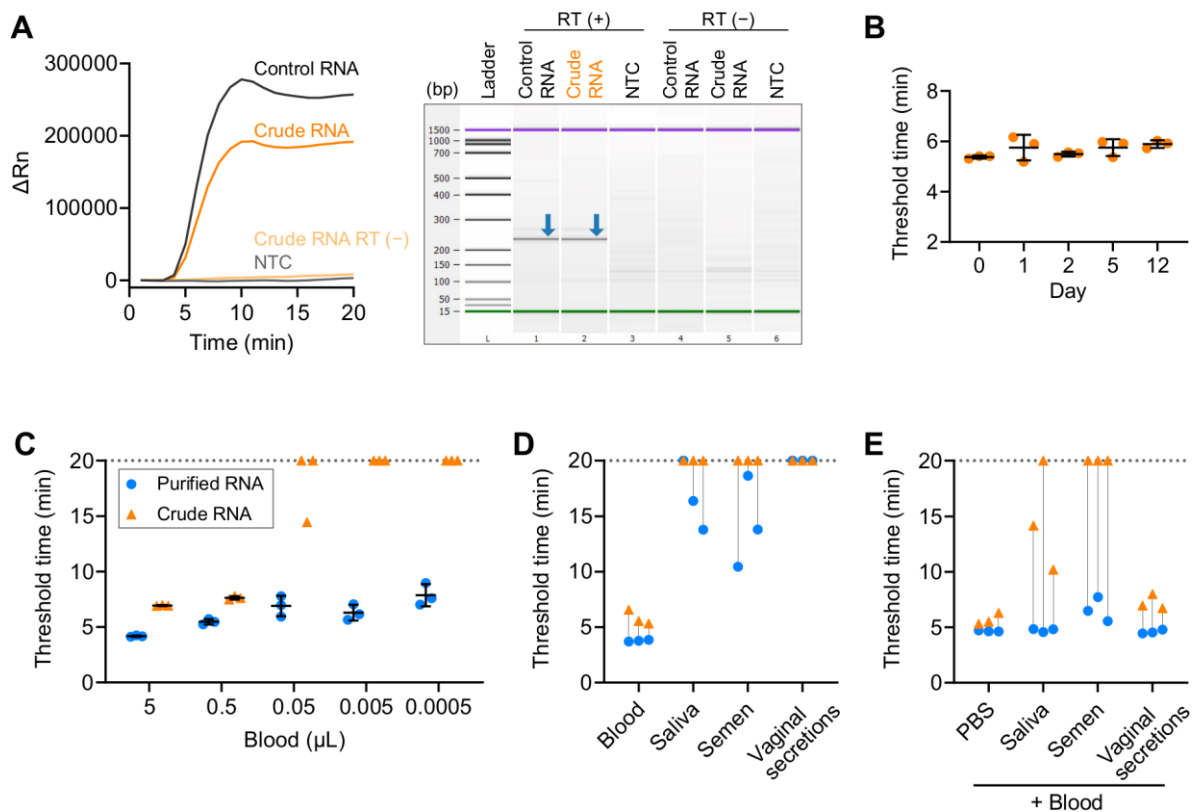


図9. ダイレクト RT-RPA 法の検討

- (A) 反応の確認. 5 μL の血液から抽出した Crude RNA に対する RT-RPA. 典型的な増幅曲線 (左) と電気泳動図 (右) を示す. 矢印は特異的な増幅産物 (230 bp) を示す.
- (B) Crude RNA の安定性. Crude RNA を調製直後 (Day 0) と室温で 1, 2, 5, 12 日間静置した後 (Day 1, 2, 5, 12) の検査結果. Threshold time (平均値 \pm 標準偏差, $n=3$) を示す.
- (C) 検出感度の検討. 血液の希釈系列 (5, 0.5, 0.05, 0.005, 0.0005 μL) から抽出した Purified RNA 及び Crude RNA の検査結果. Threshold time (平均値 \pm 標準偏差, $n=3$) を示す.
- (D) 特異性の検討. 血液, 唾液, 精液, 膣液 ($n=3$) から抽出した Purified RNA 及び Crude RNA の検査結果. Threshold time ($n=3$) を示す.
- (E) 混合体液試料の検討. 血液と PBS, 血液と唾液, 血液と精液, 血液と膣液の混合試料 (混合比 1:40) から抽出した Purified RNA 及び Crude RNA の検査結果. Threshold time ($n=3$) を示す. Threshold time = 20 のプロットは不検出のサンプル.

3.2.5. 法科学的試料への応用

作製した模擬試料及び RT-RPA 法の結果を表 4 に示す。Purified RNA を使用した場合、全ての模擬試料から *HBB* が検出された。Crude RNA を使用した場合、デニム (#1)、ハンカチ (#2)、肌着 (#4) の血痕からは不検出となった。これは、Crude RNA 中に存在するデニム、ハンカチ、肌着の材料成分が、RT-RPA 反応を阻害したためと考えられる。

RT-RPA 法は PCR 阻害剤に対して高い阻害耐性を示したが (図 8D)、簡易 RNA 抽出で調製された Crude RNA に対しては検出感度や阻害耐性が低いという課題がある (図 9C, 9E, 表 4)。そのため、現状、RT-RPA 法による *HBB* のスクリーニングには RNA 精製が必要である。また、実際の法科学的試料にはさまざまな物質を含むことが多く、これらの物質が簡易 RNA 抽出法・RT-RPA 法の阻害要因となる可能性がある。今後、より多くの法科学的試料を用いた広範的な検証が必要になる。

表 4 模擬試料を用いた RT-RPA 法の検討

#	試料	血液量 ^a	期間 ^b	RNA 抽出 ^c	Threshold time (min)	
					Purified RNA	Crude RNA
1	デニム上の血痕	0.5 µL	40 日	5 × 5 mm	5.21	ND
2	ハンカチの血痕	0.5 µL	40 日	5 × 5 mm	7.32	ND
3	マスクの血痕	0.5 µL	40 日	5 × 5 mm	5.41	5.90
4	肌着の血痕	0.5 µL	40 日	綿棒	6.76	ND
5	ゴム手袋の血痕	0.5 µL	40 日	綿棒	7.43	8.02
6	床の血痕	0.5 µL	40 日	綿棒	6.02	7.07
7	壁の血痕	0.5 µL	40 日	綿棒	5.75	6.22
8	木製机の血痕	0.5 µL	40 日	綿棒	6.45	8.64
9	ナイフ刃先の血痕	0.5 µL	40 日	綿棒	5.80	6.49
10	スマートフォンの血痕	0.5 µL	40 日	綿棒	5.85	5.69
11	眼鏡の血痕	0.5 µL	40 日	綿棒	6.55	6.96

ND, 不検出

^a 試料の作製に使用した量

^b 試料の作製から RNA 抽出までの期間

^c 綿棒: 綿棒で採取後、綿球の半分を使用

4. 結言

本研究では、等温核酸増幅法である RPA 法を利用し、法科学鑑定において重要な 2 つの核酸マーカー（男性特異的な Y 染色体 DNA・血液マーカーである *HBB* mRNA）を迅速・簡便に検出する方法を開発した³⁷⁻³⁹。Y 染色体 DNA を指標とした RPA 法（Y-RPA 法）では、5 分のアルカリ溶解法と 20 分の RPA 法により、30 分以内に男性 DNA の有無を確認することが可能となった（図 10A）。*HBB* mRNA を指標とした RT-RPA 法は、血液の確定検査に利用されるマルチプレックス RT-PCR や Targeted RNA sequencing より高い検出感度を示し、確定検査を行う前のスクリーニング検査として十分な性能を有していた（図 10B）。これらの方法は、従来の PCR に基づく方法の時間と手間がかかるという課題を克服できるため、法科学的試料に対するスクリーニング検査の迅速化・簡便化、さらには DNA 型鑑定全体の効率化に貢献することが期待される。また、核酸精製が不要なダイレクト法の適用可能性が示唆されたことから、犯罪現場における即時スクリーニングシステムの構築が期待される。

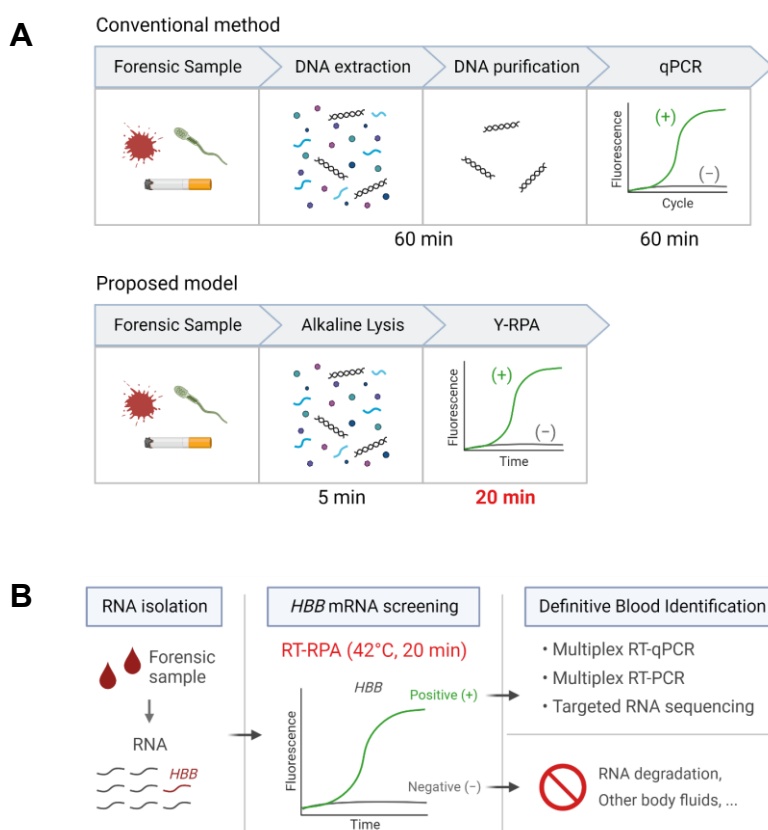


図 10. RPA 法による法科学核酸マーカーの検出

(A) Y 染色体 DNA を指標とした RPA 法（Y-RPA 法）による男性 DNA 検出の迅速化・簡便化。

(B) *HBB* を指標とした RT-RPA 法による血液 mRNA マーカーのスクリーニング。

参考文献

- 1 J.M. Butler, *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*, Academic Press, 2012.
<https://doi.org/10.1016/C2011-0-04189-3>.
- 2 Thermo Fisher Scientific, *GlobalFiler™ and GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kits User Guide, Revision F*.
<<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMSG%2Fmanuals%2F4477604.pdf>>.
- 3 J.Y. Liu, Direct qPCR quantification of unprocessed forensic casework samples, *Forensic Sci. Int. Genet.* 11 (2014) 96–104. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.03.003>.
- 4 J.Y. Liu, Direct qPCR quantification using the Quantifiler® Trio DNA quantification kit, *Forensic Sci. Int. Genet.* 13 (2014) 10–19. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.06.016>.
- 5 Sense about Science, *Making Sense of Forensic Genetics: What can DNA tell you about a crime?*
<<https://senseaboutscience.org/wp-content/uploads/2017/01/making-sense-of-forensic-genetics.pdf>>.
- 6 S. Harbison, R. Fleming, Forensic body fluid identification: state of the art, *Res. Reports Forensic Med. Sci.* 6 (2016) 11–23. <https://doi.org/10.2147/rfms.s57994>.
- 7 C. Nussbaumer, E. Gharehbaghi-Schnell, I. Korschneck, Messenger RNA profiling: A novel method for body fluid identification by real-time PCR, *Forensic Sci. Int.* 157 (2006) 181–186. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2005.10.009>.
- 8 C. Haas, B. Klessner, C. Maake, W. Bär, A. Kratzer, mRNA profiling for body fluid identification by reverse transcription endpoint PCR and realtime PCR, *Forensic Sci. Int. Genet.* 3 (2009) 80–88.
<https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2008.11.003>.
- 9 R.I. Fleming, S. Harbison, The development of a mRNA multiplex RT-PCR assay for the definitive identification of body fluids, *Forensic Sci. Int. Genet.* 4 (2010) 244–256. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2009.10.006>.
- 10 Thermo Fisher Scientific, *Novel Y-screen assay for sexual assault samples using the Quantifiler Trio DNA Quantification Kit*. <<https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/Documents/PDFs/Application-Note-Y-screen-assay-for-sexual-assault.pdf>>.
- 11 Promega, *Y-Screening and Direct Amplification of Sexual Assault Evidence Kit Samples*. <<https://scv10mr-cdnpre-pcus-00.azureedge.net/-/media/files/promega-worldwide/north-america/promega-us/webinars-and-events/y-screening-oct-31-2016-webinar-slides.pdf>>.
- 12 A. Holt, S.C. Wootton, J.J. Mulero, P.M. Brzoska, E. Langit, R.L. Green, Developmental validation of the Quantifiler® HP and Trio Kits for human DNA quantification in forensic samples, *Forensic Sci. Int. Genet.* 21 (2016) 145–157.
<https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.12.007>.
- 13 M.M. Ewing, J.M. Thompson, R.S. McLaren, V.M. Purpero, K.J. Thomas, P.A. Dobrowski, G.A. DeGroot, E.L. Romsos, D.R. Storts, Human DNA quantification and sample quality assessment: Developmental validation of the PowerQuant® system, *Forensic Sci. Int. Genet.* 23 (2016) 166–177. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2016.04.007>.
- 14 C. Lynch, R. Fleming, A review of direct polymerase chain reaction of DNA and RNA for forensic purposes, *WIREs Forensic Sci.* 1 (2019) e1335. <https://doi.org/10.1002/wfs2.1335>.
- 15 C. Haas, E. Hanson, A. Kratzer, W. Bär, J. Ballantyne, Selection of highly specific and sensitive mRNA biomarkers for the identification of blood, *Forensic Sci. Int. Genet.* 5 (2011) 449–458. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2010.09.006>.

- 16 A. Lindenbergh, M. de Pagter, G. Ramdayal, M. Visser, D. Zubakov, M. Kayser, T. Sijen, A multiplex (m)RNA-profiling system for the forensic identification of body fluids and contact traces, *Forensic Sci. Int. Genet.* 6 (2012) 565–577. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2012.01.009>.
- 17 M. van den Berge, A. Carracedo, I. Gomes, E.A.M. Graham, C. Haas, B. Hjort, P. Hoff-Olsen, O. Maroñas, B. Mevåg, N. Morling, H. Niederstätter, W. Parson, P.M. Schneider, D.S. Court, A. Vidaki, T. Sijen, A collaborative European exercise on mRNA-based body fluid/skin typing and interpretation of DNA and RNA results, *Forensic Sci. Int. Genet.* 10 (2014) 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.01.006>.
- 18 F. Kohlmeier, P.M. Schneider, Successful mRNA profiling of 23 years old blood stains, *Forensic Sci. Int. Genet.* 6 (2012) 274–276. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2011.04.007>.
- 19 M. Sirker, P.M. Schneider, I. Gomes, A 17-month time course study of human RNA and DNA degradation in body fluids under dry and humid environmental conditions, *Int. J. Leg. Med.* 130 (2016) 1431–1438. <https://doi.org/10.1007/s00414-016-1373-9>.
- 20 G. Dørum, S. Ingold, E. Hanson, J. Ballantyne, L. Snipen, C. Haas, Predicting the origin of stains from next generation sequencing mRNA data, *Forensic Sci. Int. Genet.* 34 (2018) 37–48. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.01.001>.
- 21 S. Ingold, G. Dørum, E. Hanson, A. Berti, W. Branicki, P. Brito, P. Elsmore, K.B. Gettings, F. Giangasparo, T.E. Gross, S. Hansen, E.N. Hanssen, M.L. Kampmann, M. Kayser, F.X. Laurent, N. Morling, A. Mosquera-Miguel, W. Parson, C. Phillips, M.J. Porto, E. Pośpiech, A.D. Roeder, P.M. Schneider, K. Schulze Johann, C.R. Steffen, D. Syndercombe-Court, M. Trautmann, M. van den Berge, K.J. van der Gaag, J. Vannier, V. Verdoliva, A. Vidaki, C. Xavier, J. Ballantyne, C. Haas, Body fluid identification using a targeted mRNA massively parallel sequencing approach – results of a EUROFORGEN/EDNAP collaborative exercise, *Forensic Sci. Int. Genet.* 34 (2018) 105–115. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.01.002>.
- 22 E. Hanson, S. Ingold, C. Haas, J. Ballantyne, Messenger RNA biomarker signatures for forensic body fluid identification revealed by targeted RNA sequencing, *Forensic Sci. Int. Genet.* 34 (2018) 206–221. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.02.020>.
- 23 S. Ingold, G. Dørum, E. Hanson, D. Ballard, A. Berti, K.B. Gettings, F. Giangasparo, M.L. Kampmann, F.X. Laurent, N. Morling, W. Parson, C.R. Steffen, A. Ulus, M. van den Berge, K.J. van der Gaag, V. Verdoliva, C. Xavier, J. Ballantyne, C. Haas, Body fluid identification and assignment to donors using a targeted mRNA massively parallel sequencing approach – results of a second EUROFORGEN / EDNAP collaborative exercise, *Forensic Sci. Int. Genet.* 45 (2020) 102208. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2019.102208>.
- 24 O. Piepenburg, C.H. Williams, D.L. Stemple, N.A. Armes, DNA detection using recombination proteins, *PLoS Biol.* 4 (2006) 1115–1121. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040204>.
- 25 R.K. Daher, G. Stewart, M. Boissinot, M.G. Bergeron, Recombinase polymerase amplification for diagnostic applications, *Clin. Chem.* 62 (2016) 947–958. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2015.245829>.
- 26 I.M. Lobato, C.K. O’Sullivan, Recombinase polymerase amplification: Basics, applications and recent advances, *TrAC Trends Anal. Chem.* 98 (2018) 19–35. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.10.015>.

- 27 O.W. Stringer, J.M. Andrews, H.L. Greetham, M.S. Forrest, TwistAmp® Liquid: a versatile amplification method to replace PCR, *Nat. Methods* 15 (2018) 395. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.407>.
- 28 TwistDx, TwistAmp® DNA Amplification Kits Combined Instruction Manual. <https://www.twistdx.co.uk/wp-content/uploads/2021/04/ta01cmanual-combined-manual_revo_v1-3b.pdf>.
- 29 TwistDx, TwistAmp® DNA Amplification Kits Assay Design Manual. <<https://www.twistdx.co.uk/wp-content/uploads/2021/04/twistamp-assay-design-manual-v2-5.pdf>>.
- 30 K. Krölov, J. Frolova, O. Tudoran, J. Suhorutsenko, T. Lehto, H. Sibul, I. Mäger, M. Laanpere, I. Tulp, Ü. Langel, Sensitive and rapid detection of *Chlamydia trachomatis* by recombinase polymerase amplification directly from urine samples, *J. Mol. Diagn.* 16 (2014) 127–135. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2013.08.003>.
- 31 G. Choi, J.H. Jung, B.H. Park, S.J. Oh, J.H. Seo, J.S. Choi, D.H. Kim, T.S. Seo, A centrifugal direct recombinase polymerase amplification (direct-RPA) microdevice for multiplex and real-time identification of food poisoning bacteria, *Lab. Chip* 16 (2016) 2309–2316. <https://doi.org/10.1039/c6lc00329j>.
- 32 M.D. Moore, L.A. Jaykus, Development of a recombinase polymerase amplification assay for detection of epidemic human noroviruses, *Sci. Rep.* 7 (2017) 40244. <https://doi.org/10.1038/srep40244>.
- 33 L. Wambua, B. Schneider, A. Okwaro, J.O. Wanga, O. Imali, P.N. Wambua, L. Agutu, C. Olds, C.S. Jones, D. Masiga, C. Midega, Z. Khan, J. Jores, A. Fischer, Development of field-applicable tests for rapid and sensitive detection of *Candidatus* phytoplasma oryzae, *Mol. Cell. Probes* 35 (2017) 44–56. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2017.06.004>.
- 34 M. Witt, R.P. Erickson, A rapid method for detection of Y-chromosomal DNA from dried blood specimens by the polymerase chain reaction, *Hum. Genet.* 82 (1989) 271–274. <https://doi.org/10.1007/BF00291168>.
- 35 P. Fattorini, S. Cacció, S. Gustincih, F. Florian, B.M. Altamura, G. Graziosi, Sex identification by polymerase chain reaction of α -satellite in aged tissue samples, *Electrophoresis* 14 (1993) 23–26. <https://doi.org/10.1002/elps.1150140105>.
- 36 N. Kouprina, T. Ebersole, M. Koriabine, E. Pak, I.B. Rogozin, M. Katoh, M. Oshimura, K. Ogi, M. Peredelchuk, G. Solomon, W. Brown, J.C. Barrett, V. Larionov, Cloning of human centromeres by transformation-associated recombination in yeast and generation of functional human artificial chromosomes, *Nucleic Acids Res.* 31 (2003) 922–934. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg182>.
- 37 S. Kubo, H. Niimi, I. Kitajima, Rapid detection of blood and semen mRNA markers by reverse transcription-recombinase polymerase amplification, *Forensic Sci. Int. Genet.* 58 (2022) 102665. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2022.102665>.
- 38 S. Kubo, H. Niimi, I. Kitajima, Rapid and direct detection of male DNA by recombinase polymerase amplification assay, *Forensic Sci. Int. Genet.* 59 (2022) 102704. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2022.102704>.
- 39 S. Kubo, H. Niimi, I. Kitajima, Improved reverse transcription-recombinase polymerase amplification assay for blood mRNA screening: comparison with one-step RT-qPCR assay, *Forensic Sci. Int. Genet.* 63 (2023) 102808. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2022.102808>.

- 40 K.L. Opel, D. Chung, B.R. McCord, A study of PCR inhibition mechanisms using real time PCR, *J. Forensic Sci.* 55 (2010) 25–33. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2009.01245.x>.
- 41 J. Qian, S.A. Boswell, C. Chidley, Z. xiang Lu, M.E. Pettit, B.L. Gaudio, J.M. Fajnzylber, R.T. Ingram, R.H. Ward, J.Z. Li, M. Springer, An enhanced isothermal amplification assay for viral detection, *Nat. Commun.* 11 (2020) 5920. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19258-y>.
- 42 W. Feng, H. Peng, J. Xu, Y. Liu, K. Pabbaraju, G. Tipples, M.A. Joyce, H.A. Saffran, D.L. Tyrrell, S. Babiuk, H. Zhang, X.C. Le, Integrating reverse transcription recombinase polymerase amplification with CRISPR technology for the one-tube assay of RNA, *Anal. Chem.* 93 (2021) 12808–12816. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c03456>.
- 43 M. Zhou, C. Fan, L. Wang, T. Xu, X. Zhang, Enhanced isothermal amplification for ultrafast sensing of SARS-CoV-2 in microdroplets, *Anal. Chem.* 94 (2022) 4135–4140. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c00008>.
- 44 C. Myhrvold, C.A. Freije, J.S. Gootenberg, O.O. Abudayyeh, H.C. Metsky, A.F. Durbin, M.J. Kellner, A.L. Tan, L.M. Paul, L.A. Parham, K.F. Garcia, K.G. Barnes, B. Chak, A. Mondini, M.L. Nogueira, S. Isern, S.F. Michael, I. Lorenzana, N.L. Yozwiak, B.L. MacInnis, I. Bosch, L. Gehrke, F. Zhang, P.C. Sabeti, Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13, *Science* 360 (2018) 444–448. <https://doi.org/10.1126/science.aas8836>.

謝辞

本研究の遂行にあたり、終始多大なご指導を賜りました富山大学 理事・副学長 北島勲 先生、富山大学 学術研究部医学系 臨床分子病態検査学講座 准教授 仁井見英樹 先生に深く感謝申し上げます。

研究だけでなく多岐にわたるご支援を賜りました富山大学 学術研究部医学系 臨床分子病態検査学講座の皆様感謝申し上げます。

血液の採取に際して、ご協力いただいた富山大学附属病院の職員の皆様に感謝申し上げます。

試料の提供にあたり、快く実験にご参加頂いた皆様に感謝申し上げます。

富山大学での研究の機会を与えてくださった石川県警察本部 刑事部 科学捜査研究所の皆様に感謝申し上げます。

最後に、学位申請までの生活を支えてくれた家族に感謝します。