

氏 名 くぼ せいじ
久保 誠司

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 富医薬博乙第97号

学位授与年月日 令和5年1月25日

学位授与の要件 富山大学学位規則第3条第4項該当

学位論文題目
法科学核酸マーカーの迅速・簡便な検出法の開発
(Development of rapid and simple methods for the detection of
forensically relevant nucleic acid markers)

論文審査委員

(主査)	教授	西田 尚樹
(副査)	教授	森 寿
(副査)	教授	佐藤 勉
(副査)	教授	林 龍二
(紹介教員)	准教授	仁井見 英樹

論 文 要 旨

法科学核酸マーカーの迅速・簡便な検出法の開発

氏名 久保 誠司

【目的】

犯罪現場で採取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。例えば、性犯罪においては男性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。また、試料に存在する体液種の証明は犯罪の立証に重要であり、法科学鑑定ではDNA型検査に先立って行われる。体液種の証明法には、体液特異的に発現するmRNAを検出する方法がある。

従来、このような法科学核酸マーカーは、定量的リアルタイムPCR (qPCR) や逆転写qPCR (RT-qPCR) によって検出される。しかし、これらのPCRに基づく方法は工程が多く、操作も煩雑であり、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。そこで本研究では、等温核酸増幅法のRecombinase Polymerase Amplification (RPA) 法を利用し、男性DNA及び体液mRNAマーカーの迅速・簡便なスクリーニング法を確立することを目的とした。

【方法及び結果】

1. Recombinase Polymerase Amplification (RPA) 法による

男性DNAの迅速・簡便な検出法の開発

男性特異的なY染色体上のマルチコピー領域を指標としてRPA法 (以下、Y-RPA法) を行った。反応条件は39°C・20分とした。Y-RPA法は10 pgまでの男性DNAを検出することができ、高い検出感度を示した。PCR阻害剤を用いて阻害耐性を検討した結果、1000 ng/μLのフミン酸または500 μMのヘマチン存在下でも男性DNAを検出した。

Y-RPA法の高い阻害耐性を考慮し、ダイレクト法の検討を行った。テンプレートDNA (Crude DNA) の調製にはアルカリ溶解法を採用した。犯罪現場に遺留されることが多い3種類の体液試料 (血液、唾液、精液) からCrude DNAを調製し、ダイレクトY-RPA法を行った。その結果、すべての体液試料から男性DNAが検出され、さらに精製DNAを用いた場合と同等の検出率・検出速度を示した。

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


血液のmRNAマーカーであるHemoglobin β (HBB) を指標としてRT-RPA法を行った。反応条件は42°C・20分とした。RT-RPA法は 10^{-4} ngの白血球RNAあるいは 10^{-3} μLの血液からHBBを検出することができ、従来のRT-PCRに基づく方法よりも高い検出感度を示した。PCR阻害剤を用いて阻害耐性を検討した結果、500 ng/μLのフミン酸、250 μMのヘマチン、4000 ng/μLのタンニン酸、または125 ng/μLのメラニン存在下でもHBBを検出した。

*HBB*スクリーニングの更なる迅速化・簡便化のため、簡易RNA抽出を組み合わせたダイレクトRT-RPA法の検討を行った。テンプレートRNA (Crude RNA) の調製には、ウイルスの溶解及びRNaseの不活性化の効果が報告されているTCEP/EDTA溶液を採用した。血液からCrude RNAを調製し、ダイレクトRT-RPA法を行った。その結果、精製RNAを用いた場合に比べて検出感度は劣るが、Crude RNAからも*HBB*が検出された。

【総括】

本研究では、RPA法による男性DNAの検出法及びRT-RPA法による血液mRNAマーカー (*HBB*) の検出法を確立し、法科学的試料に対する有効性を評価した。これらの方法は従来のPCRに基づく方法と同等以上の検出感度・特異性を示し、さらに従来法の時間・手間がかかるという欠点を克服できるため、法科学鑑定におけるスクリーニング検査の迅速化・簡便化に貢献することが期待される。また、法科学的試料に対する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への応用が期待される。

学位論文審査の要旨

報告番号	富医薬博乙第 号	氏 名	久保 誠司
論文審査委員	職 名 (主査) 教授 (副査) 教授 (副査) 教授 (副査) 教授	氏 名 西田 尚樹 森 寿 佐藤 勉 林 龍二	
指導(紹介)教員	准教授	仁井見 英樹	
(論文題目 英文の場合は和訳, 日本文の場合は英訳を付記すること) 法科学核酸マーカーの迅速・簡便な検出法の開発 (Development of rapid and simple methods for the detection of forensically relevant nucleic acid markers)			(判定) 合格
(論文審査の要旨)			
<p>[目的]</p> <p>犯罪現場で採取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である. 生体試料に存在する体液種の証明は犯罪立証の重要項目であり, 通常, 個人識別を目的としたDNA鑑定に先だって施行される. 現在, 血液, 唾液, 精液等の体液種証明法として, 体液特異的に発現するmRNAを検出する方法があり, 定量的リアルタイムPCR (qPCR)や逆転写qPCR (RT-qPCR)が施行されるが, これらのPCRに基づく手法は工程が多く, かつ操作も煩雑であるためスクリーニング手法としては時間や手間を要するという問題点がある.</p> <p>等温核酸増幅法であるRecombinant Polymerase Amplification (RPA)法は, ウィルスや細菌等の核酸検出法として報告されており, 等温反応にて所要時間20分, 1ステップで標的核酸の検出が可能である. 久保氏は, 本研究をRPA法を利用して男性DNAおよびヒト体液マーカーの迅速・簡便なスクリーニング法を確立することを目的として行った.</p>			
<p>[方法および結果]</p> <p>1. RPA法による男性DNAの迅速, 簡便な検出法の開発</p> <p>久保氏はY染色体上のマルチコピー領域を指標としたRPA法(Y-RPA法)を開発した. Y-RPA法用のForward・Reverseプライマーを各3つ設計し(F1-3, R1-3), これら9通りの組み合わせの検討から至適な組み合わせを決定してY-RPA法を行ったところ, F2/R3の組み合わせで最も短時間での検出が可能で, 10pgまで検出が可能であった. また女性DNAを用いた検索では蛍光シグナルの増加, 増幅産物は認められなかった. PCR阻害剤を用いた阻害耐性の検討では, 1000 ng/μlのフミン酸, 500 μMのヘマチンを含む資料からも男性DNAの検出が可能であった.</p>			

3種類の体液資料（血液、唾液、精液）から、アルカリ溶解法にてテンプレートDNA（Crude DNA）を調整し、ダイレクトY-RPA法を行ったところ、すべての体液から男性DNAが検出され、さらに精製DNAを用いた場合と同等の検出率および速度を示した。男女の混合血液、精液と臍内溶液の混合液につき、ダイレクトY-RPA法にて検討したところ、全ての混合資料から男性DNAが検出された。臍内溶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倍段階希釈して（2-32倍）検索したところ、全ての資料から男性DNAが検出され、最適希釈倍率は8倍であった。

2. Reverse Transcription-RPA（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

久保氏は血液のmRNAマーカーである*HBB*を指標としたRT-PCR法を開発した。*HBB* mRNAを標的としたForward・Reverseプライマーを各4つ（F1-4, R1-4）、検出用のプローブを3つ設計して（P1-3）、最適な組み合わせを検討し、F3/R2, P1を至適プライマー、プローブと決定した。決定されたプライマー、プローブでRT-PCR法を行ったところ、 10^{-4} ngの白血球RNAおよび 10^{-3} μ Lの血液から*HBB*が検出され、既存のRT-RPA法よりも高い検出感度を示した。また、RNase Hを添加することで、検出時間が早くなることも確認された。さらに血液、唾液、精液、臍液から抽出、生成したRNAを含むサンプルを複数作成して検索したところ、血液に加え、唾液、精液、臍液資料の一部からも*HBB*が検出可能であった。またPCR阻害剤を用いた阻害耐性の検討では、500 ng/ μ Lのフミン酸、4000 ng/ μ Lのタンニン酸、125 ng/ μ Lのメラニンを含む資料からも*HBB*を検出した。またこれらの検索において、DNase処理の工程は省略可能であった。

次に、久保氏は*HBB*スクリーニングのさらなる迅速化、簡便化を目的として簡易RNA抽出を組み合わせたダイレクトRT-RPA法の検討を行った。血液からTCEP/EDTA溶液を用いて、Crude RNAを調整し、ダイレクトRT-RPA法を行ったところ、精製RNAを用いた場合より検出感度が下がったものの、Crude RNAからも*HBB*が検出し得た。

さらに久保氏は血液が付着した模擬資料を作成し、purified DNA, Crude RNAを調整してRT-RPAを行った。その結果、Purified RNAを使用した場合にはすべての資料から*HBB*が検出可能であったが、Crude RNAでは一部不検出となり、模擬資料の材料成分によりRT-RPAが阻害される場合がある可能性が示唆された。

[総括]

久保誠司氏は、RPA/RT-RPA法を用いると既存のPCR法よりも迅速かつ簡便に男性DNA, *HBB* mRNAが検出可能であることを示した。また、検出感度も既存の方法と同等以上であり、スクリーニング検査として十分な性能を有することも示した。これらの結果は本法が法科学鑑定におけるスクリーニング検査の効率化に資する可能性を有することを示したと考えられる。

本研究が、RPA/RT-RPA法により高感度で法科学核酸マーカーの検出が可能であること、また、マルチプレックス化への展開が可能であることを示したことには新規性があり、犯罪現場における即時スクリーニングシステムへの応用の可能性が示した点で学術的重要性も高いと考えられる。以上より本審査会は本論文を博士（医学）の学位に十分値すると判断した。