

10 1本のチューブで行う SHERLOCK 法による SARS-CoV-2 の検出

MIT and Harvard 大学の Zhang ら¹⁾が考案した CRISPR を応用した新しい SARS-CoV-2 診断方法について紹介します。

CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)を基礎とした診断検査は、ウイルスや病原菌の検出に用いられている。とくに SHERLOCK (specific high-sensitivity enzymatic reporter unlocking)法は SARS-CoV-2 の検出に用いられてきたが、その方法は、標的遺伝子の増幅と CRISPR による核酸の検出という 2 段階からなる。しかしながらこの方法は、臨床現場即時検査法としては複雑であり、RNA の抽出や多くの試薬を扱う手順があり、検体の交差汚染の原因ともなる。

今回、これを改良した方法を報告する。この方法の感度は、従来の RT-qPCR と同等であった。STOP (SHERLOCK testing in one pot)とは、RNA 抽出作業を簡略化し、等温遺伝子増幅と CRISPR による検出を行うものである。この方法だと、温度設定は1つですみ、最小限の機器を用いて検査時間も 1 時間以内である。

等温増幅と CRISPR による検出を行うために、共通の最適な緩衝液を用いる必要があり、逆転写に続いて LAMP (loop-mediated isothermal amplification) 法を用いた。また、温度で一定な Cas 酵素として AapCas12b を用いた。われわれはこの方法を STOPCovid, version 1 (STOPCovid.v1)と名付けた。本法により、lateral-flow (試験紙による方法) および fluorescent readout (蛍光強度測定) が可能であった。

RNA 抽出を簡略化し、感度を上げるために、磁気ビーズ法を取り入れた。これにより、検体からの SARS-CoV-2 RNA が濃縮される。この方法は、STOPCovid, version 2 (STOPCovid.v2)と名付けた (図 1)。この方法を、CDC による RT-qPCR と比較したところ、RNA の濃度は 600 倍になり、CDC の方法の 1/30 のウイルスも検出できた (100 copies per sample, or 33 copies per milliliter)。検出限界は、RT-qPCR と同様で Ct 値で 40.3 であった。

202 例の SARS-CoV-2 陽性検体と 200 例の陰性検体 (鼻咽頭ぬぐい液) をもちいて検討を行った。その結果、STOPCovid.v2 の感度は 93.1%で、特異度は

98.5%であった。この方法による偽陰性例は Ct 値が 37 であった。陽性例は、15 分から 45 分で検出できた。最後に、新鮮で乾燥している鼻スワブ検体をもちいて STOPCovid.v2 を検証したところ、5 例の陽性例と 10 例の陰性例を同定できた。このように簡略化された STOPCovid.v2 は、複雑な操作をしない臨床検査室での使用に適している。

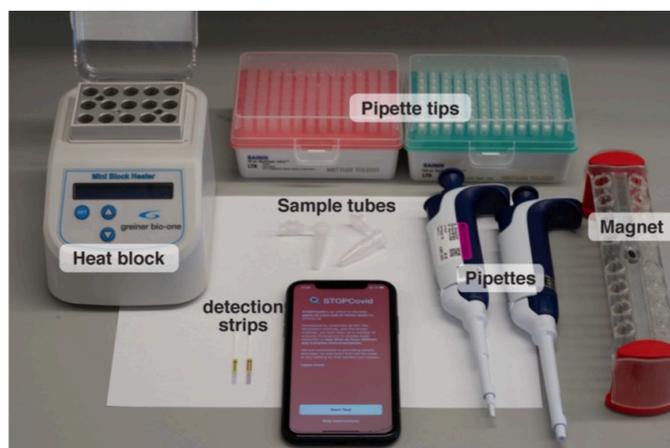
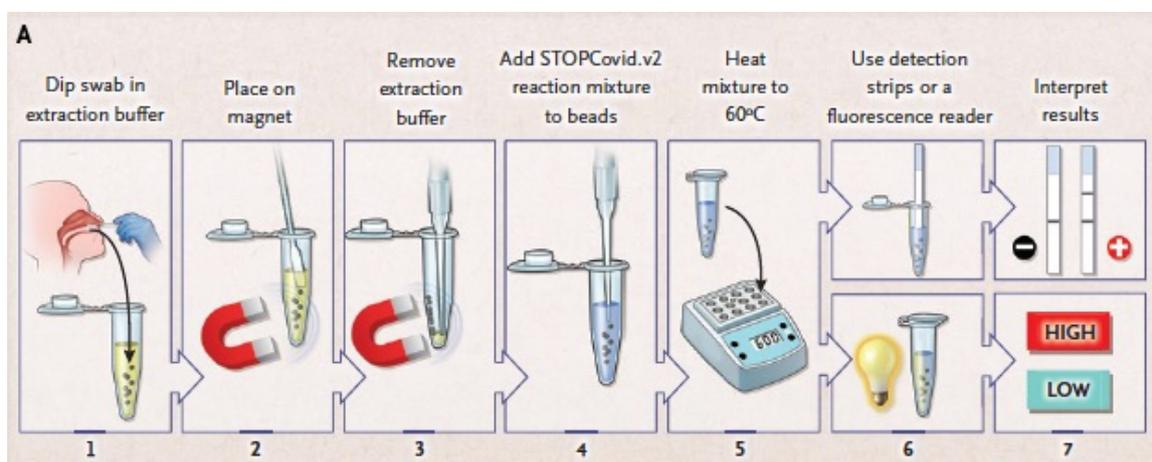


図 1 STOPCovid.v2 の手順（上）と必要機材（下）

文献

- 1) Joung J, et al. Detection of SARS-Cov-2 with SHERLOCK one-pot testing. N. Engl. J. Med. 2020 doi: 10.1056/NEJMc2026172