

デジタル検出に基づくウイルス・バイオマーカー 微量計測技術に関する調査研究

長谷川丈真*

(2025年2月14日受理)

A Survey on Highly Sensitive Measurement Techniques for Viruses and Biomarkers based on Digital Detection

HASEGAWA Takema

Abstract

The measurement of viruses and biomarkers is important for controlling infectious disease and achieving a healthy society. For those purposes, various highly sensitive measurement technologies targeting nucleic acids and proteins as indicators have been developed. On the other hand, the development of reliability evaluation technologies for these measurements is recently highly required. In this report, we conducted a survey of digital detection those are promising as the reliability evaluation technologies for low concentration-range measurement of nucleic acids and proteins and discussed their applicability.

1 はじめに

ウイルスおよびバイオマーカーの計測技術は、感染症対策や健康社会の実現のために広く利用されている。両者の計測における代表的な測定対象としては、生体高分子の核酸およびタンパク質が挙げられる。ウイルスは、それぞれ固有の塩基配列の核酸または固有の構造のタンパク質から構成されるため、それらを測定することで特定のウイルスを測定することができる。他方、バイオマーカーとは、「客観的に測定され、評価される特性値であり、正常な生物学的プロセス、病理学的プロセス、または治療的処置に対する薬理学的反応の指標」と定義されている^{1),2)}。それぞれの疾病や治療後の状態に相関してプロファイルが変化する核酸やタンパク質があり、それらをバイオマーカーとして利用することができる。

現在利用されているウイルスやバイオマーカー計測の

ための代表的な核酸の測定技術として、ポリメラーゼ連鎖反応 (Polymerase chain reaction, PCR) を用いたリアルタイム PCR が挙げられる。この方法は、調製した反応液に対して一定の温度サイクルでの反応を繰り返すことによってデオキシリボ核酸 (Deoxyribonucleic acid, DNA) を増幅する PCR 法に基づく方法で、DNA がある閾値まで増幅される温度サイクル数から測定対象を定量する。リアルタイム PCR は、2020 年に発生した新型コロナウイルスによるパンデミック時に、ウイルスの検査方法として広く利用された³⁾。それ以外にも、鳥インフルエンザウイルスの検査や、ノロウイルスの検査などでは、リアルタイム PCR が採用されており、国立感染症研究所の感染症診断マニュアルや厚生労働省からの通知法、国際標準化機構 (International Organization for Standardization, ISO) の規格文書として規定されている⁴⁻⁶⁾。リアルタイム PCR は、ウイルス検査の他にも、例えば、肺がん診断のためのバイオマーカー遺伝子の測定などにも利用されている⁷⁾。

* 物質計測標準研究部門 バイオメディカル標準研究グループ

他方、ウイルスやバイオマーカー計測に利用されている代表的なタンパク質の測定技術としては、特定のタンパク質に結合する性質を持つ抗体を用いたイムノクロマトグラフィーや Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) が挙げられる。これらの方法は、ウイルス測定では、新型コロナウイルスやインフルエンザウイルス由来のタンパク質を対象とした感染症の検査に利用されている^{8),9)}。また、バイオマーカー測定では、前立腺がんのマーカーである Prostate-specific antigen (PSA) や、炎症マーカーである C 反応性タンパク質 (C-reactive protein, CRP) の測定などに利用されている^{10),11)}。

このように、核酸およびタンパク質を対象としたウイルスやバイオマーカーの測定技術は、感染症対策や健康社会実現のための重要な基盤技術である。より高感度な測定技術は、より高度な感染症対策や医療の実現に貢献する。例えば、高感度なウイルス測定技術が開発されれば、感染初期の無症状時にもウイルスを検出できるようになる。その結果、空港や医療機関などの人が集まる施設においてウイルスの侵入を早期に検知する「ウイルスゲートキーパー」の開発が可能となり、防疫対策や集団感染の拡大防止への貢献が期待できる。他方、高感度なバイオマーカー測定技術が開発されれば、疾患の早期診断や早期治療が可能となる。また、従来法では検出できなかった低濃度域のバイオマーカーの発見にも寄与する。さらに、検体検査において、少量の検体での検査が可能となるため、患者への侵襲性の低減につながると考えられる。

近年、各研究機関や企業より、低濃度域のウイルスやバイオマーカーを測定するための様々な技術が開発されている¹²⁾⁻¹⁴⁾。新規に開発された測定技術を社会実装し、より高度な感染症対策や医療サービスを実現するためには、その測定技術の信頼性を評価し担保することが重要である。しかしながら、低濃度域の測定における信頼性評価技術の開発や整備が十分ではないことが、現在課題となっている。

筆者は、測定の信頼性評価に利用できる技術として、近年急速な発展を遂げている核酸およびタンパク質のデジタル検出技術に着目している。デジタル検出技術は、従来法と比較して、低濃度域における測定に適しているとされている¹⁵⁾。本稿では、現在開発されている核酸およびタンパク質のデジタル検出技術について俯瞰的に調査し、低濃度域の測定における信頼性評価技術への適用性を考察した。

2 デジタル検出

本章では、デジタル検出の基本的な原理や特徴を述べる。また、デジタル検出の重要な工程である微小区分への試料の分割について、現在開発されている主要な分割方法を述べる。

2.1 デジタル検出の原理

核酸およびタンパク質におけるデジタル検出の「デジタル」とは、「コンピューターや電子機器で情報処理を行う」という意味ではなく、「量を段階的に区切って（特に0と1で）表現する」という意味で使われている。本稿では、測定試料を多数の区分に分割してそれぞれで検出反応を行い、検出反応陽性または陰性区分を計数することにより対象を測定する技術を「デジタル検出」と称する。図1(a)にデジタル検出の原理を示す。デジタル検出では、各区分に測定対象が0個または1個以上封入されるように測定試料を限界希釈した後分割し、それぞれで検出反応を行う。この時、各区分の検出シグナル強度がある閾値に達するか否かによって、反応陽性または陰性を判定する（閾値は測定ごとに最適な値を設定する）。測定対象の各区分への分配はポアソン分布に従うようになるため、ポアソン分布の計算式を用いることで、検出反応陽性区分または陰性区分の割合から、各区分に分配された測定対象の平均個数を算出することができる。その後、体積と希釈率を加味することで、測定対象の具体的な個数濃度を算出することができる。

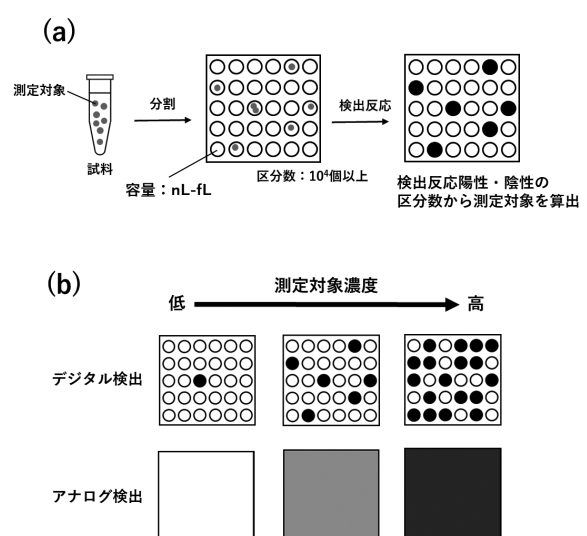


図1: (a) デジタル検出の原理. (b) デジタル検出とアナログ検出の比較.

デジタル検出において、区分数の多さは測定性能を決定する重要な要因の一つである¹⁶⁾。デジタル検出ではポアソン分布に従う範囲でしか測定することができないが、区分数が多いほど測定レンジが広がる他、測定精度の向上が期待できる。現在、デジタル検出を実施するために様々な分割方法が開発されているが、測定精度を確保する観点から最低限 10^4 個以上の区分に測定試料を分割することが必須となっている。

2.2 デジタル検出の特徴

デジタル検出技術が開発される以前の核酸またはタンパク質の測定は、基本的にはアナログ検出が主流であった。図1(b)で示すように、アナログ検出は、連続的に変化する物質を測定する方法で、測定対象由来のシグナルや測定対象に特異的に反応して増強させたシグナルの強度、また、一定のシグナル強度に達するまでの反応サイクル数を測定パラメーターとすることで対象を測定する方法である¹⁷⁾。多くの場合、参照試料により作成した検量線と比較することで、測定対象の濃度を算出する。現在広く利用されているリアルタイムPCRやELISAは、アナログ検出を用いた測定方法に該当する。一方、デジタル検出は、アナログ検出と比較してより低濃度域での測定に適しているとされている。例えば、核酸測定では、従来法のリアルタイムPCRと比較して、デジタル検出を用いた方法は低濃度域の測定精度が向上している。タンパク質測定では、従来法のELISAは検出限界がpM (M: mol/L) からfMの範囲であるのに対し、デジタル検出を用いた方法ではaMレベルの測定が可能となっている。上記の理由としては、デジタル検出の持つ次の三つの特徴が考えられる。一つ目は、測定試料を限界希釈することである¹⁸⁾。デジタル検出では測定試料を区分に分割する際に、封入される数がポアソン分布に従うように測定試料を限界希釈する。その過程で、測定試料に混在している生体マトリックスなどの夾雑物も希釈されるため、それらが測定へ与える影響を最小化することができる。二つ目は、分割した区分ごとに極少量の液中で検出反応を行えることである¹⁹⁾。反応場の容積がより小さくなるほど、反応場に対する測定対象が占める割合が相対的に大きくなり、検出のための酵素や基質との反応効率や、S/N比の向上が期待できる。現在、単一分子レベルでの検出も可能との報告がある。三つ目は、測定ごとの検出反応効率の差異に影響されにくいことである。従来法のアナログ検出では、マトリックスや測定条件の差異などにより検出反応効率に変化し、測定結果が影響を受けることが多かった。一方、デジタル検

出では、反応を十分に進行させた後に反応陽性または陰性の二値で検出するため、多少検出反応効率が変化しても測定結果への影響は小さくなり、アナログ検出と比較してより正確な測定が可能とされる²⁰⁾。またデジタル検出を用いたいくつかの測定方法では、上記の特徴の他、検量線を用いずに測定対象を定量できることが利点として挙げられる。

以上の理由から、デジタル検出は低濃度域において信頼性の高い測定を実現するポテンシャルがあると考えられる。一方で、デジタル検出では、ポアソン分布で補正できる範囲でないと測定することができないため、従来のアナログ検出と比較して測定レンジが狭いことに注意する必要がある。また、測定に用いる検出反応には、一分子の測定対象を高効率に検出可能な反応系を採用しなければならない²¹⁾。例えば、現在用いられている代表的な方法として、理論上一分子のDNAの検出が可能なPCRなどの遺伝子増幅反応や、酵素反応効率が極めて高い β -ガラクトシダーゼの反応系などが挙げられる。これらの反応系についても、正確な測定を行うためには、測定対象を高効率に検出でき、かつ反応陽性区分と陰性区分のシグナル強度が明確に区別できるように反応条件や測定条件を最適化する必要がある¹⁸⁾。

2.3 デジタル検出における分割方法

デジタル検出技術が発展した要因としては、測定試料を分割するデバイスを作製するマイクロ加工技術の進歩が挙げられる。デジタル検出技術の原理自体は1961年にB. Rotman博士により研究されていたが、当時は反応液を微小かつ均一な量の区分に分割する技術がなかったため定量性は低かった²²⁾。その後、マイクロ加工技術が発展したことで、反応液を微小かつ均一な量の区分に分割することが可能となり、デジタル検出の測定性能が飛躍的に向上した²³⁾。現在では測定対象を分割するいくつかの技術が開発されており、その代表的な方法を二つ挙げる。

一つ目は、プレートまたはチップに掘られた微小ウェルにより反応液を分割する方法である²⁴⁾⁻²⁶⁾ (図2(a))。プレートまたはチップ上に μm オーダーの大きさの微小ウェルを多数配置し、そこに反応液を添加する。その後、オイルやシールなどで蓋をすることで反応液を分割する。微小ウェルを用いる方法として、プレートやチップの上から反応液を直接添加する方法や、一か所に反応液を添加することで自動的にウェル全体に流入させるマイクロ流路などが開発されている。また、微小ウェルとマイクロビーズを用いた、Single molecule array (Simoa) 技

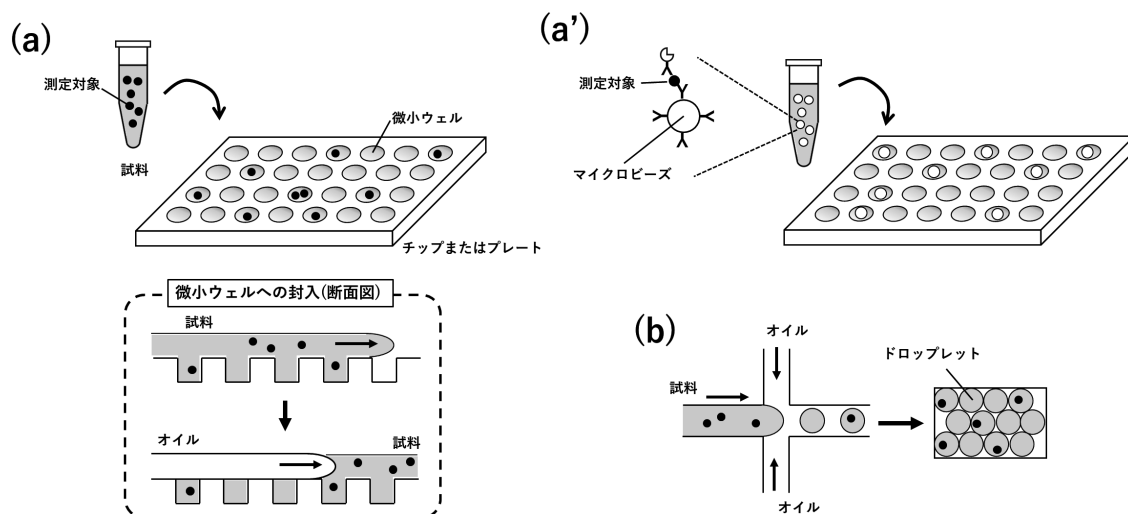


図2：デジタル検出における試料の分割方法。(a)微小ウェルを用いた分割。(a')Simoa システムを用いた分割。(b)ドロップレットを用いた分割。

術も開発されている²⁷⁾(図2(a'))。Simoaではマイクロサイズのビーズの表面に測定対象を捕捉して、ビーズを微小ウェルに封入することで、測定対象を分割する技術である。

二つ目は、ドロップレットによる分割方法である²⁸⁾(図2(b))。マイクロ流路に反応液とオイルを流し合流させることでオイル中に微小なドロップレットを作製し、大量の微小区分を生成することができる。

微小ウェルを用いた分割方法の利点としては、比較的単純な装置かつ簡便な操作であり、また、測定の自動化も進んでいることが挙げられる。一方欠点としては、生成できる区分数が制限されているため、より高精度かつ広範囲な濃度域の測定が難しいことが挙げられる¹⁹⁾。

Simoaは、抗原抗体反応を用いたタンパク質測定に利用されているデジタル検出技術である。抗原抗体反応を用いたタンパク質測定では、固定した測定対象に対して、検出抗体や酵素の付加反応、洗浄など複数回溶媒を交換する必要があり、微小ウェルやドロップレットなど反応液を分割するだけの方法ではデジタル検出を行うことができない。そこで、磁性マイクロビーズ上に測定対象を捕捉し、溶媒交換を行ったのちビーズごと微小ウェルに封入する方法が開発された。マイクロビーズを用いた方法の欠点としては、マイクロビーズと測定対象の結合反応効率の良し悪しによって測定結果にバイアスが生じる危険性がある。また、反応に用いたすべてのビーズを検出することはできず、ビーズの回収率によって測定感度が制限される²⁹⁾。すべてのビーズを回収できない原因

としては、溶媒交換時のビーズの損失や、微小ウェルに封入できるビーズ数が限られていることが挙げられる。

ドロップレットによる分割方法の利点は、生成できる区分数が多いため、測定精度が高いことや測定濃度範囲が広いことが挙げられる¹⁹⁾。一方で、ドロップレットのオイル面に反応液中の成分が吸着することで、測定結果にバイアスが生じる危険性が指摘されている^{30),31)}。

3 デジタル検出を用いた核酸およびタンパク質の測定方法

本章では、デジタル検出を用いた核酸およびタンパク質の測定方法のうち、現在研究開発が進んでおり特にウイルスやバイオマーカー計測に応用されている方法について、それぞれの原理や測定事例および特徴を述べる。

3.1 デジタル検出による核酸測定

核酸は主にDNAとリボ核酸(Ribonucleic acid, RNA)の二種類がある。DNAはリン酸とデオキシリボース、塩基(アデニン:A, チミン:T, シトシン:C, グアニン:G)から構成されたヌクレオチドが連なった構造をしている。RNAはリン酸とリボース、塩基(アデニン:A, ウラシル:U, シトシン:C, グアニン:G)から構成されたヌクレオチドが連なった構造をしている。生物やウイルスは、それぞれ固有の塩基配列のDNAまたはRNAを有しているため、それらを特異的に検出することにより、特定のウイルスを測定することができる。ま

たがん細胞は特徴的な遺伝子変異を有することが多い他、がん化に伴う生理現象や治療によって RNA の発現プロファイルが変化することが知られているため、それらの DNA や RNA をバイオマーカーとして利用することができる³²⁾。

核酸は、特定の塩基同士が相補的に結合する性質を有している。A は T または U と、C は G と結合する。DNA-DNA または RNA-RNA だけでなく、DNA-RNA でも相補的な結合を形成することができる。この性質は多くの核酸測定に利用されている。測定対象の配列と相補的な配列を持つ核酸を人工合成し、測定試料に添加することで、測定対象の配列に特異的に結合させる。この結合した核酸を足掛かりに核酸増幅を行うことで、任意の塩基配列を測定することができる。

現在、デジタル検出を用いた核酸測定方法に利用されている代表的な検出反応として、PCR や等温遺伝子増幅、Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)-Cas を用いた方法が開発されている。本章では、それぞれの検出原理や特徴をまとめた。

3.1.1 PCR を用いたデジタル検出法

PCR は最も研究実績があり、広く普及している代表的な DNA の増幅方法である³³⁾。図3に原理を示す。増幅したい DNA 配列の両末端にそれぞれ結合するプライマーと呼ばれる相補的な短鎖 DNA を設計し、一本鎖 DNA を鋳型として相補鎖を伸長させる酵素である DNA ポリメラーゼや合成基質のヌクレオチド3リン酸とともに混和して反応溶液を調製する。その後、通常二本鎖状態である DNA を乖離させ一本鎖にする変性反応(約 90℃)と、プライマーを結合させるアニーリング反応(約 60℃)、DNA ポリメラーゼによる DNA 伸長反応(約 72℃)の三つの温度サイクルを繰り返すことで、対象の DNA を 2 倍、4 倍と指数関数的に増幅することができる(各ステップの温度は反応液の条件によって異なる。

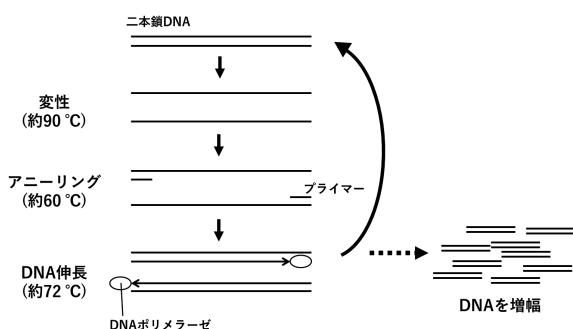


図3：PCRによるDNA増幅。

アニーリング反応と伸長反応を同じ温度で行う場合もある)。増幅された DNA を検出する方法として、二本鎖 DNA にインターカレートして蛍光を発する SYBR-Green などの蛍光色素を利用する方法や、PCR 増幅配列に結合し、DNA ポリメラーゼが増幅反応を行う際に蛍光分子を遊離させるプローブを利用する方法など、主に蛍光分子を利用した検出方法が用いられている。一方、RNA を測定する場合、PCR で用いる DNA ポリメラーゼは DNA を鋳型とした伸長反応だけを触媒し、RNA を鋳型とする反応は起きないため、測定対象の RNA に相補的な配列を持つ DNA (Complementary DNA, cDNA) を合成する「逆転写」を行う。RNA を測定するために逆転写反応をしてから PCR を行う方法は Reverse transcription-PCR (RT-PCR) と呼ばれている。

デジタル PCR (dPCR) は、PCR をデジタル検出に応用した手法であり、デジタル検出を用いた代表的な定量法である。現在、専用の測定装置や測定キットも各社から販売されており、広く普及している。また、測定の不確かさの評価に関する報告例が他のデジタル検出を用いた測定方法よりも多く、測定ばらつきの要因に関する知見も蓄積されている^{34), 35)}。

表1で示すように、dPCR の測定性能としては、ウイルス測定では検出限界 1 copy/μL (copy: 対象の核酸配列の絶対数を表す単位) 以下を達成し、10 copies/μL オーダーの測定対象を変動係数 (Coefficient of variation, CV, $CV\% = \text{標準偏差} / \text{平均値} \times 100$, 相対標準偏差 (Relative standard deviation, RSD) とも言われる) 15% 以下の精度で測定可能であることが報告されている^{36), 37)}。また、バイオマーカー測定でも、検出限界として 3 copies/reaction または 0.69 copies/μL を達成しており、35 copies/reaction または 4.2 copies/μL の測定対象をそれぞれ CV 25% 以下または CV 21% の精度で測定可能であることが報告されている^{38), 39)}。一方で、課題も指摘されている。RNA を測定するときには、逆転写反応を行う必要があるが、プライマー配列や逆転写酵素の反応効率、RNA が形成する立体構造による反応阻害などが逆転写反応効率に影響を与える危険性がある^{40), 41)}。また、逆転写反応を行ってから dPCR を行う方法は RT-dPCR と呼ばれているが、逆転写により cDNA を合成するプロセスと PCR を行うプロセスを別々に実施する Two step RT-dPCR と、逆転写反応のプロセスと PCR のプロセスを同一の溶液内で実施する One step RT-dPCR の二つの方法がある。これらの方法の違いによって測定結果が影響を受ける危険性も指摘されている³⁷⁾。

dPCR は、参照標準試料を利用した検量線との比較を

表 1：デジタル検出を用いた核酸測定方法.

測定方法例	dPCR	dLAMP	SATORI法, PddCas13a	リアルタイムPCR (従来法)	
用いられている検出反応	PCR	等温遺伝子増幅	CRISPR-Cas	PCR	
ウイルス 測定	検出限界	0.2 copies/ μ L (SARS-CoV-2) 10 ⁰ copies/ μ L (HBV DNA)	1-10 copies/ μ L (SARS-CoV-2) 4 copies/reaction (HCV)	1.4 copies/ μ L (SARS-CoV-2) 10 ¹ copies/ μ L (SARS-CoV-2)	
	変動係数 (CV)	13.55 % (66 copies/ μ L SARS-CoV-2) 5.2 % (10 ¹ copies/ μ L HBV DNA)	16.57 % (12 copies/reaction HCV)	50.33 % (10 ¹ copies/ μ L SARS-CoV-2)	
	検出限界	3 copies/reaction (dd-cfDNA) 0.69 copies/ μ L (PD-L1)	200 copies/mL (CALR)	10 aM (miRNA)	-
バイオ マーカー 測定	変動係数 (CV)	25 %以下 (35 copies/reaction dd-cfDNA) 21 % (4.2 copies/ μ L PD-L1)	5.3 % (1.0 \times 10 ³ copies/mL CALR)	-	-
	検量線を用いない定量	可能	可能	一部可能	不可能
製品化	○	×	×	○	
RNA測定時の逆転写反応	必要	必要/一部不要	不要	必要	
参考文献	36-39	43-45	46-48	49	

必要とせずに試料中の核酸濃度を定量することができるため、新たな一次標準測定法となるポテンシャルを有している。しかしながら、dPCRは測定の不確かさの評価に関する知見が他のデジタル検出よりも蓄積されているとはいえ、国際単位系 (Système international d'unités, SI) へのトレーサビリティの確立には至っていない。SIトレーサブルな測定を実施するためには、測定結果に影響を与える可能性のあるバイアス要因やばらつき要因の特定や、それら要因の解消など、測定に関わる不確かさ全般の評価をより精緻に進める必要がある¹⁸⁾。現在指摘されているdPCRにおけるバイアス要因としては逆転写反応効率が、ばらつき要因としては反応液の分割精度などが挙げられている。加えて、精確な測定を実施するためには測定条件の最適化や、より詳細な不確かさ要因の洗い出しと評価が必要不可欠である。このように、dPCRでSIトレーサビリティを確立するためには、解決すべき課題がいくつか存在するが、後述するように国際比較などの取り組みも進められており、今後の発展が期待される。

3.1.2 等温遺伝子増幅を用いたデジタル検出法

PCRは温度サイクルを繰り返すことで対象のDNAを増幅する方法である一方、等温遺伝子増幅は一定温度でDNAを増幅する方法の総称である。等温遺伝子増幅には、Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) や Rolling circle amplification (RCA)、SmartAmp、Recombinase polymerase amplification (RPA) など様々な方法が開発されている⁵⁰⁾⁻⁵³⁾。デジタル検出に適用した研究が進んでいる方法として、LAMPが挙げられる (図4)。LAMPでは、鎖置換型DNAポリメラーゼを用

いる。鎖置換型DNAポリメラーゼは、一本鎖DNAと相補的なDNA鎖を伸長する酵素であり、PCRで用いるDNAポリメラーゼとは異なりDNA鎖を伸長する方向にDNA二本鎖があった場合その二本鎖を剥がしながらDNA伸長を続けることができる点が特徴として挙げられる。LAMPの反応原理を簡潔に述べると、まず初めに測定対象のDNAから両末端にループ構造を持つDNAを合成する。このDNAに鎖置換型DNAポリメラーゼが作用し、自己を鋳型としたDNA伸長反応が起こる。その後、ループ部分にプライマーが結合し、そこからDNA伸長反応が起こる。この時、DNAの二本鎖を剥がしながら新たなDNAを伸長する。剥がされたDNAは自己アニールし、ループ構造が形成され、そこからまたDNA伸長反応が起こる。このような反応を繰り返すことにより、DNAを増幅することができる。また、LAMPでは、他にも複数種類のプライマーを用いることで、DNA増幅反応効率を上げるなどの工夫がなされているが、詳しくは先行研究を参考にされたい⁵⁰⁾。LAMPの利点としては、一定温度 (約60℃) でDNA増幅反応を行うことができるため、PCRのような複雑な温度調節装置を必要としないという点が挙げられる⁵⁴⁾。また、PCRと異なり常に一定の温度条件下でDNA増幅反応を進行させることができるため、DNA増幅速度が速いという利点もある⁵⁴⁾。LAMPをデジタル検出に適用した方法として、デジタルLAMP (dLAMP)が開発されている。dLAMPでは、dPCRと同様に反応液を分割してDNA増幅反応を行う。

表1で示すように、dLAMPの測定性能としては、ウイルス測定では検出限界10 copies/ μ L以下を達成し、

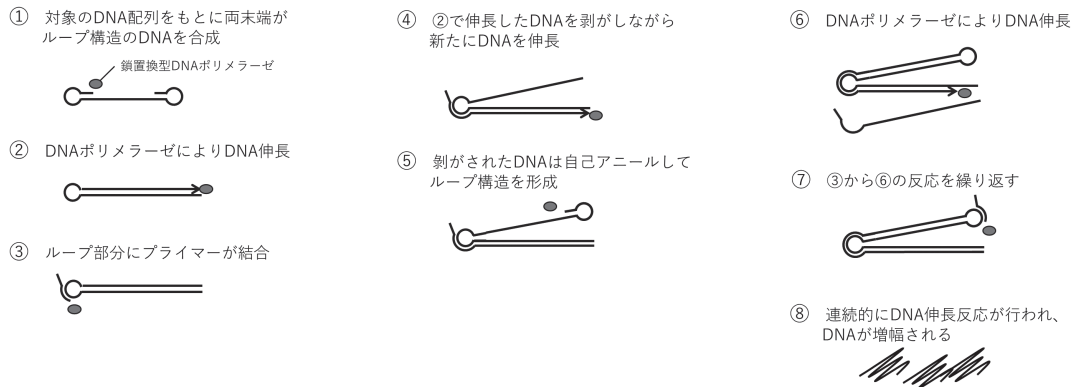


図 4：LAMP による DNA 増幅原理。

12 copies/reaction の測定対象を CV 16.57 % の精度で測定可能であることが報告されている^{43), 44)}。また、バイオマーカー測定でも、検出限界 200 copies/mL を達成しており、 1.0×10^3 copies/mL の測定対象を CV 5.3 % の精度で測定可能であることが報告されている⁴⁵⁾。

dLAMP の課題は、dPCR ほど研究事例が多くなく、測定の不確かさの評価に関する知見が蓄積されていないことである。また、dPCR と同様に RNA 測定時には逆転写反応が必要となるため、逆転写効率が測定結果に影響を与える危険性があることに留意する必要がある。他方、LAMP 以外の等温遺伝子増幅の中には、逆転写反応を必要とせず RNA を測定する方法も開発されており、デジタル検出への応用も期待される⁵⁵⁾。

3.1.3 CRISPR-Cas を用いたデジタル検出法

CRISPR-Cas システムは、微生物の持つ適応免疫機構を応用して開発された⁵⁶⁾。CRISPR-Cas システムでは、核酸切断酵素である Cas スクレアーゼ単独では核酸切断活性を持っていないが、CRISPR RNA (crRNA) と複合体を形成し、crRNA の一部と相補的な DNA または RNA 鎖に結合することで核酸切断活性を持つようになる。Cas スクレアーゼにはいくつかの種類があり、それぞれ核酸の切断活性様式が異なる。代表例として、ゲノム編集技術としてゲノム DNA の目的の箇所を切断することができる CRISPR-Cas9 が広く普及している⁵⁷⁾。他方、CRISPR-Cas を核酸検出に応用する研究も進んでいる。例えば、CRISPR-Cas12 は、Cas12-crRNA 複合体が目的の配列の DNA に結合すると、配列に依存しない核酸切断活性を持つようになる⁵⁸⁾ (図 5(a))。両末端に蛍光分子とクエンチャーを修飾したレポーター DNA を反応液中に添加しておくことで、目的の配列の DNA が存在するときのみ Cas12 が活性型となり、レポーター DNA が切断されて蛍光分子を遊離し、検出することが

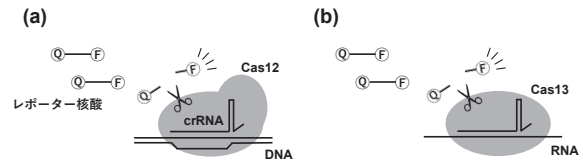


図 5：CRISPR-Cas を用いた核酸検出。(a) Cas12 による DNA 検出。F は蛍光分子、Q はクエンチャーを表す。(b) Cas13 による RNA 検出。

できる。CRISPR-Cas13 は、Cas12 と同様の反応を RNA に対して行うことができる⁵⁸⁾ (図 5(b))。これらの CRISPR-Cas システムを用いた核酸の測定方法として、DNA endonuclease targeted CRISPR trans reporter (DETECTR) や Specific high sensitivity enzymatic reporter unlocking (SHERLOCK) が開発されている^{59), 60)}。

CRISPR-Cas を用いた従来の測定方法では、一分子しか存在しない対象を単一の工程で測定することは難しく、遺伝子増幅の工程が必要であった。しかし、近年の技術開発により、遺伝子増幅を必要とせず、かつデジタル検出に適用した CRISPR-based amplification-free digital RNA detection (SATORI 法) や、Polydisperse droplet digital CRISPR/Cas13a (PddCas13a), Ultralocalized Cas13a assay が報告されている⁴⁶⁾⁻⁴⁸⁾。表 1 で示すように、SATORI 法は、SARS-CoV-2 の RNA 遺伝子測定において検出限界 1.4 copies/ μ L を達成している。また、PddCas13a は、がんのバイオマーカーの micro-RNA (miRNA) の測定において検出限界 10 aM を達成している。これらの方法は、dPCR の課題であった逆転写の工程も必要としないため、特に RNA の定量においてよりバイアスを低減できるポテンシャルを秘めている。一方で、比較的新しい技術であることもあり、dPCR と比較して測定の不確かさの評価が十分になされていないこと

が課題として挙げられる。

3.2 デジタル検出によるタンパク質測定

タンパク質は側鎖の異なる 20 種類のアミノ酸がペプチド結合によって連なり折りたたまれ、その配列などにより固有の立体構造を形成している。生物やウイルスは、それぞれ特徴的な構造のタンパク質を有しているため、それらを特異的に検出することにより、特定のウイルスを測定することができる。また、体内で発現したタンパク質は、それぞれ化学反応の触媒や免疫、情報伝達など様々な機能を有しており、生理現象における中心的な役割を担っている。疾患ごとに特徴的なタンパク質が生成されることもあり、それらをバイオマーカーとして利用することができる。

タンパク質のデジタル検出では、抗原抗体反応を利用する方法や、測定対象となるタンパク質自体の酵素活性を測定する方法が開発されている。本章では、それぞれの検出反応について原理や測定事例および特徴をまとめた。

3.2.1 抗原抗体反応を用いたデジタル検出法

抗原抗体反応は、抗体がそれぞれのタンパク質（抗原）に特異的に結合する反応のことで、タンパク質の特異的な測定に利用できる。サンドイッチ ELISA は、抗原抗体反応を利用してタンパク質を測定する代表的な測定方法である⁶¹⁾。この方法では、まずは固相表面に捕捉抗体を固定させる。そこに試料を添加することで測定対象のタンパク質を結合させ、さらに検出抗体を結合させ、捕捉抗体—抗原—検出抗体の複合体を形成させる。この時、検出抗体に結合させた酵素の反応を利用することによって測定対象のタンパク質を検出することができる。

サンドイッチ ELISA をデジタル検出に応用した例として、デジタル ELISA (dELISA) が挙げられる^{27), 62)} (図 6)。dELISA では、前述 2.3 で記載した Simoa システムが採用された方法が開発され、製品化されている。この方法では、捕捉抗体を固定したマイクロビーズ上で、捕捉抗体—抗原—検出抗体—酵素 (β -ガラクトシダーゼなど) の複合体を形成させる。その後、マイクロビーズを一つずつ微小ウェルに分散・封入し、酵素反応によって基質から遊離した蛍光物質を検出することで測定する。dELISA は、従来の ELISA よりも測定感度が約 1000 倍高いことが報告されている^{63), 67)}。表 2 で示すように、dELISA によるウイルス測定では、1 fM 以下のウイルスタンパク質や 10^2 PFU/mL (PFU: Plaque-forming unit, ウイルスの感染力価を表す単位) オーダーのウイルスの検出が可能であることが報告されている⁶⁴⁾。また、

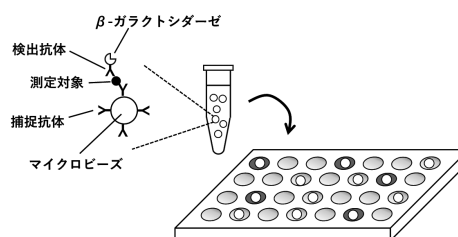


図 6：デジタル ELISA によるタンパク質測定。

0.029 ng/mL のバイオマーカータンパク質が測定可能であることが報告されている⁶⁵⁾。

一方で dELISA には課題もある。抗原抗体反応を利用する測定系では、測定対象と高効率で結合することができる抗体を用いることが必須であり、最適な抗体の選定や測定条件の最適化が必要不可欠である。また、dELISA では、測定対象の分割方法としてマイクロビーズを用いるが、洗浄工程でのビーズの損失や、微小ウェルへの分配が完全に行われなかったことなどにより、測定感度が制限されていることが指摘されている²⁹⁾。加えて、測定には参照試料により作成された検量線との比較が必要であり、他のデジタル検出方法のような検量線を用いない定量はできない。しかし、最近では、洗浄工程の改良によりビーズの損失率を減少させる研究や、マイクロビーズを微小ウェルに封入する工程で磁力を利用することによりマイクロビーズの分配率を向上させる研究が報告されており、今後の測定性能の向上が期待される²⁹⁾。

3.2.2 測定対象のタンパク質自体の酵素活性を用いたデジタル検出法

測定対象のタンパク質が酵素活性を持っている場合、その活性を利用して直接検出する方法も開発されている。例えば、インフルエンザウイルスの表面には、ノイラミニダーゼという酵素が多数存在しているが、このノイラミニダーゼによって切断される反応基質にレポーター分子を修飾した 4- (methylumbelliferyl)-N-acetylneuraminic acid (MUNANA) が開発されており、これをデジタル検出に適用したインフルエンザウイルスの測定方法が開発されている⁶⁶⁾ (図 7(a))。この方法では、 10^3 PFU/mL オーダーのインフルエンザウイルスの測定が可能であることが報告されている (表 2)。Single-molecule enzyme activity-based enzyme profiling (SEAP) も、デジタル検出のプラットフォーム上で、レポーター分子を修飾した反応基質を用いて測定対象のタンパク質の酵素活性を検出し定量する方法として開発されている⁶⁷⁾ (図 7(b))。応用例として、血清サンプルを用いて、膵臓がんなどのバイオマーカーである血中ホスファターゼをデジタル検出

表2：デジタル検出を用いたタンパク質測定方法例.

測定方法例	dELISA	デジタル検出-MUNANA, SEAP	ELISA (従来法)
用いられている検出反応	抗原抗体反応	測定対象の酵素活性	抗原抗体反応
検出限界	0.99 fM (HA(H1亜型)) 7.4×10 ² PFU/mL (Influenza virus)	10 ³ PFU/mL (Influenza virus)	4 ng/mL* (HA(H3亜型)) 10 ⁴ PFU/mL (Influenza virus)
変動係数 (CV)	6.3 % (10 fM HA)	—	4.191 % (4 ng/mL HA(H3亜型))
検出限界	0.029 ng/mL (SCC-Ag)	1.8 fM (ENPP3)	—
変動係数 (CV)	5.1-13.7 % (0.049-50 ng/mL SCC-Ag)	—	—
検量線を用いない定量	不可能	一部可能	不可能
製品化	○	×	○
参考文献	64, 65	66, 67	68, 69

*: 4 ng/mL (HA(H3亜型))は約70 pMに相当する

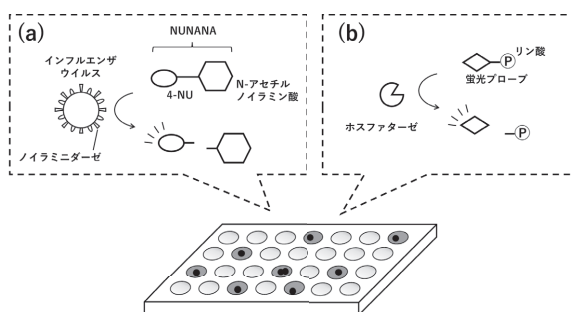


図7：(a)MUNANA ×デジタル検出によるインフルエンザウイルスの測定 (4-MU：4-methylumbelliferone). (b)SEAPによるホスファターゼの測定.

し定量した研究が報告されており、検出限界として 1.8 fM を達成している (表2).

測定対象の酵素活性をデジタル検出に適用する方法は、抗原抗体反応を利用する dELISA のように洗浄工程などの溶媒交換を必要としないため、測定工程での試料の損失を抑えることが可能であり、より高効率に対象を測定できるポテンシャルを秘めている。加えて、測定工程を単純化することでバイアス要因が少なくなるため、より正確な測定を実現できる可能性がある。一方で、この方法は、測定対象が酵素であり、かつ一分子レベルの検出が可能ほど高効率な酵素活性を持っている必要があるため、測定できるタンパク質が制限される。また、基質が同定されていることやレポーター分子を修飾した基質の準備なども必要となる。

4 国際比較および標準物質開発への利用

感染症対策や健康社会の実現は世界的な課題であり、ウイルスやバイオマーカーの計測技術の信頼性の確保は

非常に重要である。そのため、各国の国家計量標準機関 (National Metrology Institute, NMI) を中心として、各計測技術に関する国際比較が継続的に行われており、デジタル検出技術を対象とした比較試験も行われている。例えば、国際度量衡委員会 (Comité international des poids et mesures, CIPM) 物質諮問委員会 (Comité consultatif pour la quantité de matière : métrologie en chimie et biologie, CCQM) の傘下にある核酸分析作業部会 (Working Group on Nucleic Acid Analysis, NAWG) では、様々な試料を対象に dPCR を使用した国際比較が実施されている (表3)。近年では、新型コロナウイルスのパンデミックを受けて、SARS-CoV-2 RNA を測定対象とした国際比較 (P-199b および K-181/P-227) が実施された。この国際比較では、10¹ copies/μL から 10⁴ copies/μL の4種類の SARS-CoV-2 RNA 水溶液が各国 NMI で測定された。各国 NMI から報告された RNA 溶液の定量値のばらつき (CV) は 19% から 31% であった⁴²⁾。また、本国際比較では、各機関の逆転写反応に用いた方法の違いが、測定結果のばらつきの要因となっていることが指摘された。他方、dPCR は各国の NMI が開発し頒布している標準物質の値付け方法にも採用されており、近年では、SARS-CoV-2 RNA の標準物質が NIM (中国) や NMIA (オーストラリア) などで開発されている (表4)。

これまでのところ国際比較や標準物質開発に利用されているデジタル検出技術は、筆者が知る範囲では dPCR のみである。従って dPCR は測定の不確かさに関する知見が蓄積されており、測定結果の信頼性に関する検証が比較的進んでいることから、核酸を対象としたウイルスやバイオマーカーの測定の信頼性評価技術として最も有望である。一方で、等温遺伝子増幅や CRISPR-Cas を用いた核酸測定や、dELISA や MUNANA, SEAP を用いたタンパク質測定については、dPCR と比較して試験所間

表 3：dPCR を使用した国際比較実施例.

国際比較名	開始年	実施内容
P-154	2013	Absolute quantification of DNA
K-86c/P-113.4	2016	Relative quantification of genomic DNA fragments extracted from high oil matrix (OSR/canola)
P-184	2017	Core competence in nucleic acid mutation measurement
P-199	2018	Copy number concentration of HIV-1 RNA genomic sequences
P-199b	2020	Copy number concentration of SARS-CoV-2 RNA genomic sequences
K-176/P-218	2021	Breast cancer biomarker HER2 copy number variation (CNV) measurement
K-86.d	2021	Quantification (and fractional abundance) of genomic DNA extracted from a protein matrix
K-181/P-227	2022	SARS-CoV-2 RNA copy number quantification

表 4：各国の NMI によって開発され、dPCR を用いて値付けされた標準物質の例.

提供元	標準物質番号	標準物質名
NIST (アメリカ)	SRM 2372a	Human DNA Quantitation Standard
	SRM 2373	Genomic DNA Standards for HER2 Measurements
	SRM 2917	Plasmid DNA for Fecal Indicator Detection and Identification
	RM 8366	<i>EGFR</i> and <i>MET</i> Gene Copy Number Standards for Cancer Measurements
	他	
NIM (中国)	GBW09856	Reference Material of Human Genomic (Male) DNA Quantification
	GBW09857	Reference Material of Human Genomic (Female) DNA Quantification
	GBW09855	Reference Material of genomic DNA containing BRAF (V600E) Mutation
	GBW09315	Reference material for SARS-CoV-2 (2019-nCoV) Beta B.1.351 Variant Genomic RNA
	GBW(E)091098 GBW(E)091099	Certified Reference Material of 2019 Novel Corona Virus (2019-nCoV) Ribonucleic Acid Genome
他		
KRISS (韓国)	111-10-507	SARS-CoV-2 packaged RNA
JRC (EU)	ERM-AD623	BCR-ABL pDNA CALIBRANT
TUBITAK UME (トルコ)	UME RM 2019	SARS-CoV-2 Synthetic RNA Fragment
NMIA (オーストラリア)	CRM NA50 to 55	SARS-CoV-2 standard

比較や標準物質への適用事例が少ないため、信頼性評価技術として確立していくためには、妥当性評価や不確かさ評価をより精緻に行う必要がある。

5 まとめ

感染症対策や健康社会の実現は、重要な社会課題であり、その基盤となる核酸やタンパク質を指標としたウイルスおよびバイオマーカーの測定技術は今後も研究開発が進み、さらなる高感度化が図られることが予想される。その際、検査キットや測定装置などの測定性能の評価や、測定の妥当性の確認のための標準物質や校正技術など、低濃度域における測定の信頼性を評価する技術は、新しい高感度測定技術の開発を促進し、また、開発された技術を社会へ実装するうえで非常に重要な役割を果たす。

本調査研究では、低濃度域測定の信頼性評価技術として応用が期待される核酸とタンパク質のデジタル検出技術に着目し、その特徴や課題を整理した。

結論としては、核酸およびタンパク質のデジタル検出技術は、低濃度域のウイルスおよびバイオマーカー測定の信頼性評価技術への適用性が高いと考えられる。その理由の一つ目としては、デジタル検出は高感度かつ高精度な測定が可能であることが挙げられる。これまで述べてきたように、デジタル検出技術を用いた核酸やタンパク質の測定方法は、ウイルスやバイオマーカーを対象とした測定において、アナログ検出である従来法と比較して高感度かつ低濃度域の対象を高精度に測定することができることが示されている。

二つ目の理由としては、デジタル検出は参照試料を用いて作成した検量線を必要とせず対象を定量できること

が挙げられる。dPCR や dLAMP, SATORI 法など、特に核酸測定では多くの方法でこれを実現している。タンパク質測定については、核酸測定ほど研究は進んでいないものの、dELISA ではビーズの回収効率を向上させる技術が開発されていることや、タンパク質自体の酵素活性を利用する方法では一部で検量線を用いない定量ができることが報告されていることから、今後の発展が期待される。

本稿で述べてきた測定方法を、ウイルスやバイオマーカー測定の信頼性評価技術に応用するためには、その測定方法の不確かさの評価が十分に行われている必要がある。dPCR は、デジタル検出を用いた核酸測定方法における代表的な手法であり、国際比較などをはじめ不確かさ評価に関する多くの研究実績があり、各国の NMI ではすでに標準物質の値付け方法として採用されている。一方、特に逆転写反応の工程が測定結果に影響することが分かっており、より精確な測定を実施するためにはさらなる研究が必要である。他方、dLAMP や SATORI 法、PbbCas13a は、dPCR と同程度の測定感度を有することが報告されていることに加えて、温度サイクルの制御が必要ないことや、RNA 測定時に逆転写反応を必要としないことなど、それぞれ dPCR に対する優位点がある。また、デジタル検出技術は、核酸測定だけでなくタンパク質測定にも応用されており、デジタル ELISA や SEAP などの方法も開発されている。しかし、これらの方法は、dPCR と比較して測定性能の評価が十分に行われていないため、低濃度域の測定における信頼性評価技術に適用するためには、その妥当性確認や測定の不確かさの評価を進める必要がある。また、その過程で測定結果に影響を与える要因を洗い出し、結果の不確かさを低減するための研究を行うことで、より精確な信頼性評価技術の開発につながる。

本調査研究では、デジタル検出を用いた様々な測定方法の原理や特徴、課題を整理した。今後、これらの課題を解決することでより精確性の高い信頼性評価技術の開発に取り組み、核酸またはタンパク質を指標としたウイルスやバイオマーカー測定の技術的発展、ひいては感染症対策や健康社会の実現に貢献していきたい。

謝辞

本調査研究の遂行に当たり、全般にわたってご指導・ご助言をいただきました、加藤愛バイオメディカル標準研究グループ長、柴山祥枝主任研究員、藤井紳一郎主任研究員に深く感謝いたします。また、折に触れ様々な

観点からご助言いただきましたバイオメディカル標準研究グループの皆様にご心より感謝申し上げます。

参考文献

- 1) Biomarkers Definitions Working Group. *Clin Pharmacol Ther*, 69, 89-95 (2001).
- 2) 山口行治. *日本薬理学雑誌*, 131(6), 435-440 (2008).
- 3) 村田竜也, 小原健吾, 鹿嶋聖, 平井未来, 丸山恭平, 池田光泰, 福岡 達仁, 湯尻俊昭. *医学検査*, 72(2), 205-209 (2023).
- 4) 国立感染症研究所, 高病原性鳥インフルエンザ診断マニュアル (第3版).
- 5) 厚生労働省. H15.11.15 食安 監発第 1105001, (H19.5.24 改正).
- 6) ISO 15216-1:2017, Microbiology of the food chain - Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus using real-time RT-PCR.
- 7) K. Kunimasa, S. Matsumoto, T. Kawamura, T. Inoue, M. Tamiya, R. Kanzaki, T. Maniwa, J. Okami, K. Honma, K. Goto, and K. Nishino. *Lung Cancer*, 179, 107190 (2023).
- 8) 厚生労働省, 新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) 病原体検査の指針 (第6版) (令和4年12月22日改訂).
- 9) 国立感染症研究所, インフルエンザ診断マニュアル (第4版).
- 10) M. A. Najeeb, Z. Ahmad, R. A. Shakoob, A. M. A. Mohamed, and R. Kahraman. *Talanta*, 168, 52-61 (2017).
- 11) S. K. Vashist, A. G. Venkatesh, E. M. Schneider, C. Beaudoin, P. B. Luppá, and J. H. Luong. *Biotechnology Advances*, 34(3), 272-290 (2016).
- 12) H. Ashiba, M. Yasuura, T. Fukuda, K. Hatano, and M. Fujimaki. *Analytica Chimica Acta*, 1213, 339926 (2022).
- 13) 株式会社矢野経済研究所, 2024年版 遺伝子検査・解析に関する市場調査.
- 14) 株式会社矢野経済研究所, 2024年版 POCT 市場の展望.
- 15) S. C. Taylor, G. Laperriere, and H. Germain. *Scientific Reports*, 7(1), 2409 (2017).
- 16) M. Vynck, W. Trypsteen, O. Thas, J. Vandesompele, and W. De Spiegelaere. *Briefings in Bioinformatics*, 25(6), bbae507 (2024).
- 17) C. M. Hindson, J. R. Chevillet, H. A. Briggs, E. N. Gallichotte, I. K. Ruff, B. J. Hindson, R. L. Vessella, and M. Tewari. *Nature Methods*, 10(10), 1003-1005 (2013).

- 18) 柴山祥枝. *計測と制御*, 60(8), 559-564 (2021).
- 19) Y. Hou, S. Chen, Y. Zheng, X. Zheng, and J. M. Lin. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 158, 116897 (2023).
- 20) S. J. Salipante, and K. R. Jerome. *Clinical Chemistry*, 66(1), 117-123 (2020).
- 21) 野地博行, 皆川慶嘉, 上野博史. *応用物理*, 第94巻, 第1号 (2025)
- 22) B. Rotman. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 47, 1981-1991 (1961).
- 23) A. Lievens, S. Jacchia, D. Kagkli, C. Savini, and M. Querci. *PLoS One*, 11(5), e0153317 (2016).
- 24) M. A. Unger, H. P. Chou, T. Thorsen, A. Scherer, and S. R. Quake. *Science*, 288(5463), 113-116 (2000).
- 25) W. Du, L. Li, K. P. Nichols, and R. F. Ismagilov. *Lab on a Chip*, 9(16), 2286-2292 (2009).
- 26) A. S. Basu. *SLAS Technology: Translating Life Sciences Innovation*, 22(4), 369-386 (2017).
- 27) L. Cohen, and D. R. Walt. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 10(1), 345-363 (2017).
- 28) B. J. Hindson, K. D. Ness, D. A. Masquelier, P. Belgrader, N. J. Heredia, A. J. Makarewicz, I. J. Bright, M. Y. Lucero, A. L. Hiddessen, T. C. Legler, T. K. Kitano, M. R. Hodel, J. F. Petersen, P. W. Wyatt, E. R. Steenblock, P. H. Shah, L. J. Bousse, C. B. Troup, J. C. Mellen, D. K. Wittmann, N. G. Erndt, T. H. Cauley, R. T. Koehler, A. P. So, S. Dube, K. A. Rose, L. Montesclaros, S. Wang, D. P. Stumbo, S. P. Hodges, S. Romine, F. P. Milanovich, H. E. White, J. F. Regan, G. A. Karlin-Neumann, C. M. Hindson, S. Saxonov, and B. W. Colston. *Analytical Chemistry*, 83(22), 8604-8610 (2011).
- 29) C. W. Kan, C. I. Tobos, D. M. Rissin, A. D. Wiener, R. E. Meyer, D. M. Svancara, A. Comperchio, C. Warwick, R. Millington, N. Collier, and D. C. Duffy. *Lab on a Chip*, 20(12), 2122-2135 (2020).
- 30) M. Campana, S. L. Hosking, J. T. Petkov, I. M. Tucker, J. R. P. Webster, A. Zarbakhsh, and J. R. Lu. *Langmuir*, 31(20), 5614-5622 (2015).
- 31) P. Quan, M. Sauzade, and E. Brouzes. *Sensors*, 18(4), 1271 (2018).
- 32) S. Das, M. K. Dey, R. Devireddy, and M. R. Gartia. *Sensors*, 24(1), 37 (2023).
- 33) H. A. Erlich. *PCR technology* (Vol. 246). New York: Stockton press. (1989).
- 34) S. Shibayama, Y. Osumi, A. Takatsu, and M. Kato. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 416.23: 5049-5058 (2024).
- 35) dMIQE Group, and J. F. Huggett. *Clinical chemistry*, 66(8), 1012-1029 (2020).
- 36) L. Dong, J. Zhou, C. Niu, Q. Wang, Y. Pan, S. Sheng, X. Wang, Y. Zhang, J. Yang, M. Liu, Y. Zhao, X. Zhang, T. Zhu, T. Peng, J. Xie, Y. Gao, D. Wang, X. Dai, and X. Fang. *Talanta*, 224, 121726 (2021).
- 37) D. Yang, T. Hu, X. Wu, K. Li, Q. Zhong, and W. Liu. *Journal of Medical Virology*, 90(12), 1868-1874 (2018).
- 38) F. B. Clausen, K. M. C. L. Jørgensen, L. W. Wardil, L. K. Nielsen, and G. R. Krog. *PLoS One*, 18(2), e0282332 (2023).
- 39) A. Strati, M. Zavridou, P. Economopoulou, S. Gkolfinopoulos, A. Psyrris, and E. Lianidou. *Clinical Chemistry*, 67(4), 642-652 (2021).
- 40) D. Zucha, P. Androvic, M. Kubista, and L. Valihrach. *Clinical Chemistry*, 66(1), 217-228 (2020).
- 41) L. T. Guo, S. Olson, S. Patel, B. R. Graveley, and A. M. Pyle. *Nucleic Acids Research*, 50(12), 6980-6989 (2022).
- 42) A. S. Devonshire, E. J. Busby, G. M. Jones, D. M. O' Sullivan, A. Fernandez-Gonzalez, L. Hernandez-Hernandez, X. Dai, L. Dong, C. Niu, J. Xie, X. Wang, X. Qiao, X. Fang, C. Morris, N. Almond, M. H. Cleveland, P. M. Vallone, E. Castro Galván, M. Pérez Urquiza, M. G. Herrera López, A. S. Khan, S. M. Fuentes, J. E. Leguizamon Guerrero, S. L. Davila Gonzalez, A. F. León Torres, A. V. Folgueras Flatschart, M. N. de Medeiros, A. M. Saraiva, R. Becht Flatschart, C. Divieto, M. Pegoraro, M. Zucco, L. Revel, M. Mazzara, P. Corbisier, G. Buttinger, I. Yang, Y.-K. Bae, A. Bogožalec Košir, M. Milavec, M. Hawkins, A. P. Sanzone, P. Morris, S. Temisak, D. Lynch, J. McLaughlin, M. Forbes-Smith, F. Hall, D. Burke, S. Shibayama, S.-i. Fujii, M. Kato, S. Falak, R. Macdonald, A. Kummrow, A. Komissarov, K. Komissarova, S. Akyurek, M. Akgoz, S. N. Sanal Demirci, M. Vonsky, A. Runov, E. Kulyabina, D. Rebrikov, and J. F. Huggett. *bioRxiv*, 2024-03 (2024).
- 43) W. Zhang, K. Zheng, Y. Ye, J. Ji, X. Cheng, and S. He. *Analytical Chemistry*, 93(46), 15288-15294 (2021).
- 44) Y. L. Tan, A. Q. Huang, L. J. Tang, and J. H. Jiang. *Chemical Science*, 12(24), 8445-8451 (2021).
- 45) G. Cao, J. Li, Z. Xing, Z. Zhang, W. Zhang, C. Li, L. Li, Z. Guo, S. Li, X. Gao, Y. Ma, L. Zhou, and M. Guan. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 346, 130493 (2021).
- 46) H. Shinoda, T. Iida, A. Makino, M. Yoshimura, J.

- Ishikawa, J. Ando, K. Murai, K. Sugiyama, Y. Muramoto, M. Nakano, K. Kiga, L. Cui, O. Nureki, H. Takeuchi, T. Noda, H. Nishimasu, and R. Watanabe. *Communications Biology*, 5(1), 473 (2022).
- 47) K. Wang, H. Yin, S. Li, Y. Wan, M. Xiao, X. Yuan, Z. Huang, Y. Gao, J. Zhou, K. Guo, and J. Wang. *Biosensors and Bioelectronics*, 267, 116825 (2025).
- 48) T. Tian, B. Shu, Y. Jiang, M. Ye, L. Liu, Z. Guo, Z. Han, Z. Wang, and X. Zhou. *ACS nano*, 15(1), 1167-1178 (2020).
- 49) Y. Jiang, S. Zhang, H. Qin, S. Meng, X. Deng, H. Lin, X. Xin, Y. Liang, B. Chen, Y. Cui, Y. Su, P. Liang, G. Zhou, and H. Hu. *European journal of medical research*, 26(1), 147 (2021).
- 50) T. Notomi, H. Okayama, H. Masubuchi, T. Yonekawa, K. Watanabe, N. Amino, and T. Hase. *Nucleic Acids Research*, 28(12), e63-e63 (2000).
- 51) M. M. Ali, F. Li, Z. Zhang, K. Zhang, D. K. Kang, J. A. Ankrum, X. C. Le, and W. Zhao. *Chem Soc Rev*, 43(10), 3324-41 (2014).
- 52) T. Ishikawa, and Y. Hayashizaki. *Pharmacogenomics: Methods and Protocols*, 55-69 (2013).
- 53) R. K. Daher, G. Stewart, M. Boissinot, and M. G. Bergeron. *Clinical Chemistry*, 62(7), 947-958 (2016).
- 54) S. Panno, S. Matić, A. Tiberini, A. G. Caruso, P. Bella, L. Torta, R. Stassi, and A. S. Davino. *Plants*, 9(4), 461 (2020).
- 55) H. Lee, H. Lee, S. H. Hwang, W. Jeong, and D. E. Kim. *Analytica chimica acta*, 1212, 339909 (2022).
- 56) K. S. Makarova, D. H. Haft, R. Barrangou, S. J. Brouns, E. Charpentier, P. Horvath, S. Moineau, F. J. Mojica, Y. I. Wolf, A. F. Yakunin, J. van der Oost, and E. V. Koonin. *Nat Rev Microbiol*, 9(6), 467-77 (2011).
- 57) J. A. Doudna, and E. Charpentier. *Science*, 346(6213), 1258096 (2014).
- 58) F. Yan, W. Wang, and J. Zhang. *Cell Biology and Toxicology*, 35, 489-492 (2019).
- 59) J. S. Chen, E. Ma, L. B. Harrington, M. Da Costa, X. Tian, J. M. Palefsky, and J. A. Doudna. *Science*, 360(6387), 436-439 (2018).
- 60) M. J. Kellner, J. G. Koob, J. S. Gootenberg, O. O. Abudayyeh, and F. Zhang. *Nature Protocols*, 14(10), 2986-3012 (2019).
- 61) E. Engvall, and P. Perlmann. *Immunochemistry*, 8(9), 871-874 (1971).
- 62) D. H. Wilson, D. M. Rissin, C. W. Kan, D. R. Fournier, T. Piech, T. G. Campbell, R. E. Meyer, M. W. Fishburn, C. Cabrera, P. P. Patel, E. Frew, Y. Chen, L. Chang, E. P. Ferrell, V. von Einem, W. McGuigan, M. Reinhardt, H. Sayer, C. Vielsack, and D. C. Duffy. *J Lab Autom*, 21(4), 533-47 (2016).
- 63) D. M. Rissin, C. W. Kan, T. G. Campbell, S. C. Howes, D. R. Fournier, L. Song, T. Piech, P. P. Patel, L. Chang, A. J. Rivnak, E. P. Ferrell, J. D. Randall, G. K. Provuncher, D. R. Walt, and D. C. Duffy. *Nat Biotechnol*, 28(6), 595-9 (2010).
- 64) T. Hasegawa, S. Shibayama, Y. Osumi, H. Sentsui, and M. Kato. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 415(10), 1897-1904 (2023).
- 65) S. Ye, X. Sun, B. Kang, F. Wu, Z. Zheng, L. Xiang, M. Lesénéchal, F. Heskia, J. Liang, and H. Yang. *BMC Cancer*, 20(1), 138 (2020).
- 66) K. V. Tabata, Y. Minagawa, Y. Kawaguchi, M. Ono, Y. Moriizumi, S. Yamayoshi, Y. Fujioka, Y. Ohba, Y. Kawaoka, and H. Noji. *Sci Rep*, 9(1), 1067 (2019).
- 67) S. Sakamoto, T. Komatsu, R. Watanabe, Y. Zhang, T. Inoue, M. Kawaguchi, H. Nakagawa, T. Ueno, T. Okusaka, K. Honda, H. Noji, and Y. Urano. *Sci Adv*, 6(11), eaay0888 (2020).
- 68) Y. Takahara, Y. Nakaya, M. Yasuura, H. Ashiba, P. K. R. Kumar, and M. Fujimaki. *Sensors and Materials*, 31(1), 79-87 (2019).
- 69) W. Chae, P. Kim, H. Kim, Y. C. Cheong, Y. S. Kim, S. M. Kang, and B. L. Seong. *Scientific reports*, 9(1), 19675 (2019).

