

## ●Dot blot 法および ELISA による dsRNA の定性、定量分析

TN528

## Qualitative and Quantitative Analyses for dsRNA by Dot blot Assay and ELISA

## 【概要】

当社では、mRNA(messenger RNA)医薬品の不純物として知られている dsRNA(double-stranded RNA)について、これまでの知見を活かして測定条件の妥当性を検証し、Dot blot 法を用いて定性分析を、ELISA(Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)を用いて定量分析を行う手法を開発しました。以下に本手法を用いて標準化した不純物の品質評価事例を紹介いたします。なお、本分析サービスは信頼性基準および GMP(Good Manufacturing Practice)規制下でも実施可能であり、当社は他の分析サービスと合わせて mRNA 医薬品の国内外の製造販売承認申請向けのデータ取得を支援します。

**Keywords:** 抗原抗体反応、二本鎖 RNA、伝令リボ核酸、メッセンジャーRNA、純度試験

## 【背景】

mRNA 医薬品は DNA を鋳型にして転写合成された mRNA を投与することで、標的タンパク質を産生させ、治療や予防効果を発揮します。しかしながら、有効成分である mRNA は不安定であり、合成過程で生成する不純物(mRNA 分子内および分子間架橋による多様な構造など)が免疫原性を示すことで、人体に副作用を及ぼすことが知られています。そのため、mRNA 医薬品の品質評価が重要になりますが、標準化された評価方法がなく、米国薬局方の mRNA ワクチンの分析法に関するドラフトガイドライン<sup>1)</sup> および厚生労働省の生物学的製剤基準<sup>2)</sup> を参考に品質評価が実施されています。

## 【測定手法】

Dot blot 法は Western blot 法を簡略化した方法であり、目的タンパク質を検出および可視化する定性的手法です。電気泳動によって目的タンパク質を分子量の違いにより分離する Western blot 法に対し、Dot blot 法ではこの分離過程を省いています。一方、ELISA は、目的タンパク質を認識する特異的抗体で捕捉し、酵素反応により検出する定量的手法です。これらの手法は核酸にも適用されます。

## 【事例】

mRNA 中の dsRNA の分析法を開発するにあたって、標準物質は 142 塩基対の dsRNA を、mRNA は市販の EGFP(996 塩基)、FLuc(1929 塩基)および beta gal(3420 塩基)を使用しました。

## ① Dot blot 法

Dot blot 法では、熱変性条件(95°Cで5分間処理)と非変性条件で調製した標準溶液(2~100 µg/mL)と各 mRNA 溶液をメンブレンにプロットしました。次に、dsRNA を認識する抗体と反応させ、発色基質を添加してゲル・メンブレン撮影装置で検出を行い、ブランクの強度を差し引いた各ドット強度を算出しました。以下に標準溶液(Fig.1)および各 mRNA(Fig.2)における撮影した画像とドットの強度を示します。非変性条件の標準溶液では、濃度依存的に dsRNA が検出されました。また、熱変性条件では全ての濃度において dsRNA の強度が減少しました。これは dsRNA 構造が熱変性により一本鎖に解離することを示しています。これらの標準溶液の結果から、dsRNA の測定条件は妥当であると判断しました。各 mRNA で dsRNA が検出されましたが、熱変性によってその強度は減少しました。この熱変性の影響は EGFP と比較して、FLuc や beta gal で低いことが示されており、これは mRNA の塩基長が大きいほど、分子内で dsRNA を形成する可能性が高いことを示唆しています。

## ② ELISA

ELISA では、96 well plate に dsRNA を認識する一次抗体を固相化して dsRNA を認識する別の二次抗体を反応させるサンドイッチ法を用いて、標準物質および各 mRNA における dsRNA の吸光度をマイクロプレートリーダーで測定しました。Fig.3 に標準物質を検量線として用いた 4 係数ロジスティック曲線(4 parameter

logistic curve)とその検量線から算出した各 mRNA における dsRNA 濃度を示します。各 mRNA の dsRNA 濃度はそれぞれ EGFP では 3.9  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、FLuc では 4.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、beta gal では 5.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  を示しました。これらの結果を換算すると、使用した市販 mRNA に 0.5 %程度の dsRNA が含まれていることがわかりました。

以上のように、塩基長の異なる 3 種の mRNA を用いて測定条件の妥当性を検証し、mRNA 医薬品に不純物として含まれる dsRNA の定性 (Dot blot 法) および定量 (ELISA) 法を確立しました。測定条件の検証は知識と経験が必要ですが、当社のこれら確立した手法は様々な種類の mRNA 医薬品の dsRNA の定性と定量的評価に適用でき、不純物を適切に評価致します。

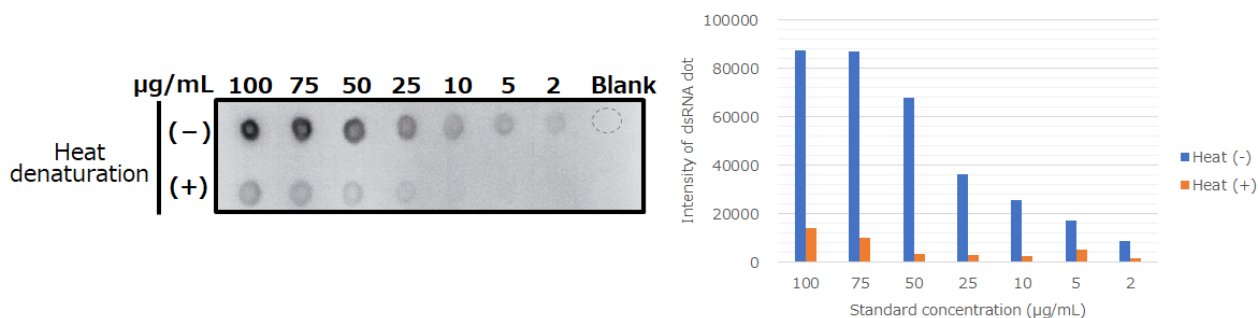


Fig. 1 Dot blot assay for standard dsRNA (142 base pair), and intensity of dsRNA dots

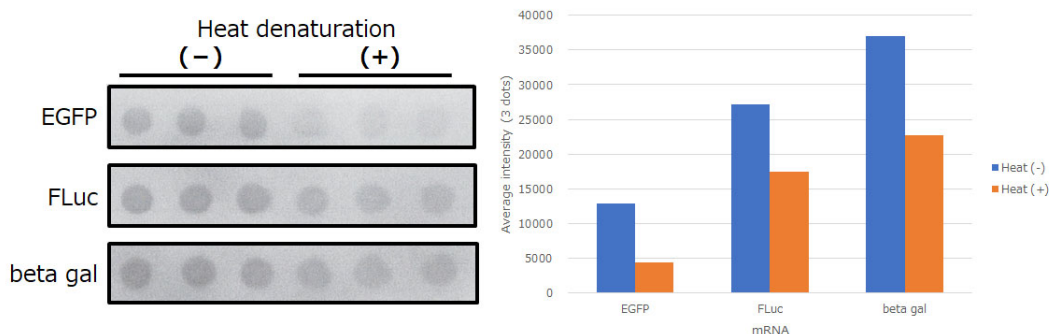


Fig. 2 Dot blot assay for mRNA and intensity of dsRNA dots

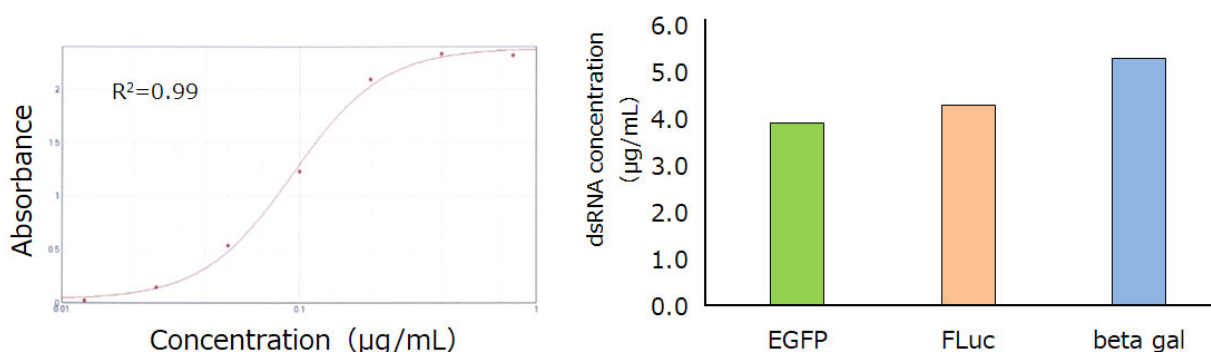


Fig. 3 Standard curve for ELISA, and dsRNA concentrations in mRNA (EGFP, FLuc and beta gal)

#### [文献]

- 1) United States Pharmacopeia: "Analytical Procedures for mRNA Vaccine Quality (Draft Guidelines)- 2nd Edition" <<https://go.usp.org/mRNAVaccineQuality>>, (accessed 2023.12.23).
- 2) 厚生労働省：厚生労働省告示第 277 号，"生物学的製剤基準(令和 5 年 9 月 25 日)"(2023 年)。