

Hybridizationを利用したLigand-Binding Assayによるヒト血漿中 DNA/RNA heteroduplex oligonucleotide (HDO) 定量法の開発

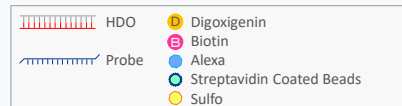
○ 才原良子, 松山慎一郎, 黒岩樹, 福本幸起, 松崎智也, 斎藤朋子, 星野雅輝, 新井浩司, 會田由美子, 新田真一郎, 三浦公道 (メディフォード株式会社 事業統括部門 治験事業部 医薬品分析部)

要約

今回我々は、中枢神経系に送達可能なコレステロール結合HDO (Chol-HDO) [Nagata T. et al. Nat Biotechnol. (2021)] を用い、Hybridizationを利用したLigand-Binding Assayによるヒト血漿中のChol-HDO定量法の開発を行った。ヒト血漿10 µLを使用し、Complement (単一) タイプのTemplate probeを用いてHybridizationした後、S1 Nucleaseを用いて未反応の1本鎖DNAを分解し、ECL (Meso Scale Diagnostics, LLC) にて検出する方法 (Hybridization-electrochemiluminescence: Hyb-ECL) を採用した。Chol-HDOアンチセンス鎖 (ASO) を用いて調製した検量線にて、既知濃度の二本鎖Chol-HDOをヒト血漿に添加し調製した精度管理サンプル (QCサンプル) を定量することで定量法の妥当性を検証した。その結果、ヒト血漿中濃度として50-20000 pg/mLの範囲で良好な検量線が得られ、測定内変動及び測定間変動では良好な真度・精度が確認された。また、良好な選択性が確認された。

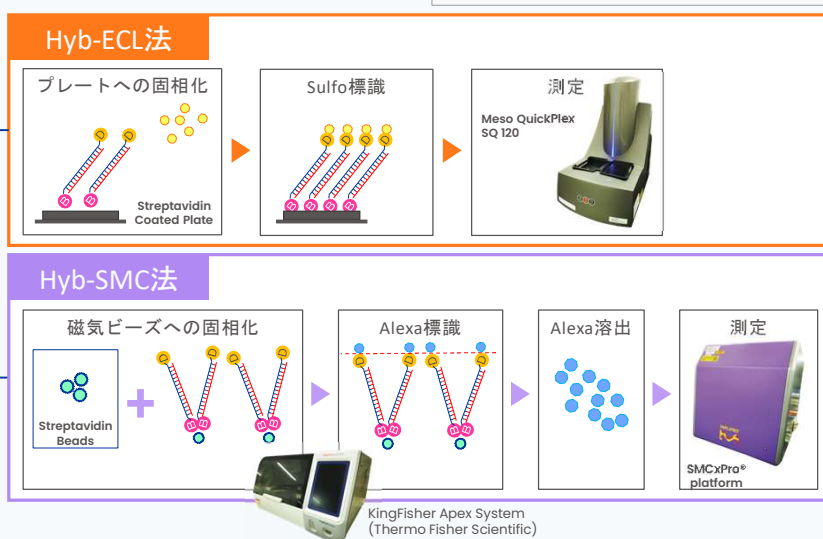
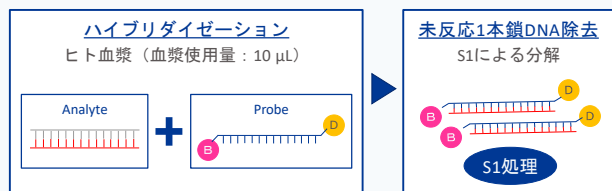
更に、ヒト血漿中のChol-HDO安定性も検証し、室温で24時間、凍結融解5回および冷凍 (-80°C) にて8箇月の長期安定性が確認された。

次に、超高感度イムノアッセイシステムSMC×PRO® platform (Merck, Germany) での検出法 (Hybridization-SMC: Hyb-SMC) について検証を行い、ヒト血漿中ASO濃度として10-10000 pg/mLの範囲で良好な検量線が得られ、血漿中HDOの定量下限濃度として25 pg/mLを設定することが可能であった。



前処理・測定方法概要

血漿は10 µL使用した。Complement (単一) タイプのTemplate probeを用いてHybridizationした後、S1 Nucleaseを用いて未反応の1本鎖DNAを分解し、ECL/SMCそれぞれにて測定した。



結果

Hyb-ECL法

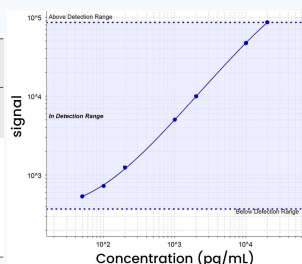
解析ソフト: Discovery Workbench 4.0 (Meso Scale Diagnostics, LLC.)

Hyb-ECLにおける定量法の妥当性を確認した。

血漿中濃度として 50-20000 pg/mLにおいて良好な検量線が得られ、選択性、希釈直線性および各種安定性が確認された。

Calibration Curve

regression method	4-parameter logistic
weighting	1/Y
r	0.999
Nominal Conc. (pg/mL)	signal
0	336
50	535
100	727
200	1243
1000	5037
2000	9940
10000	46933
20000	86407



Dilution Linearity

Nominal Conc. (pg/mL)	Dilution factor	HDO Conc. (n=3) (pg/mL)	CV (%)	Accuracy (%)
100000	10	86500	2.4	86.5
	100	90700	1.2	90.7
	1000	107000	4.3	107.3

Accuracy and Precision

Nominal Conc. (pg/mL)	within-run (n=6)			between-run (n=6)		
	Accuracy (%)	CV (%)	TE (%)	Accuracy (%)	CV (%)	TE (%)
LLoQ 50.0	95.9	6.0	10.1	98.7	7.1	8.4
Low-QC 150	91.9	5.0	13.1	95.8	4.2	8.4
Middle-QC 1000	88.4	4.2	15.8	88.0	3.6	15.6
High-QC 15000	87.0	4.0	17.0	88.8	7.1	18.3
ULoQ 20000	92.1	4.0	11.9	95.5	7.8	12.3

Stability

Name	Low-QC 150 (pg/mL)		High-QC 15000 (pg/mL)	
	HDO Conc. (n=3) (pg/mL)	Accuracy (%)	HDO Conc. (n=3) (pg/mL)	Accuracy (%)
Initial	156	103.8	12300	82.0
Room temperature 24 hr	151	100.9	12500	83.0
-80°C 8 months	146	97.3	13900	92.7
Freeze/thaw 5 cycle	154	102.7	13200	87.7

Hyb-SMC法

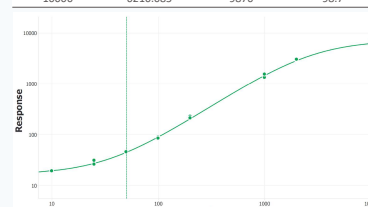
解析ソフト: xPRO (バージョン:1.2.68) (Merck, Germany)

Hyb-SMCにおける定量法について検討した。

血漿中ASO濃度として 10-10000 pg/mLにおいて良好な検量線が得られ、血漿中HDOの定量下限として25 pg/mLが測定可能であることが確認された。

Calibration Curve

regression method	4-parameter logistic
R Squared	0.999
Nominal Conc. (pg/mL)	Response
0	10.289
10.0	19.354
25.0	28.466
50.0	45.073
100	86.332
200	218.748
1000	1434.128
2000	2967.115
10000	6210.085



Limit of quantification

Name	Nominal Conc. (pg/mL)	Response	HDO Conc. (pg/mL)	Average (pg/mL)	Accuracy (%)
Low-QC	25.0	28,654 27,170	27.0 24.6	25.8	103.2
High-QC	8000	6038.930 6028.468	8590 8530	8560	107.0

結語

HDOを用いたHyb-ECL測定法を開発し、ICH M10ガイドライン記載の評価項目である検量線、真度・精度、選択性、希釈直線性、安定性において簡易バリデーションを実施した結果、その評価基準を充たした。

ASOの測定機器として報告のあるECLにて、HDOを50-20000 pg/mLの濃度範囲にて測定が可能であった。

超高感度イムノアッセイシステムSMC×PRO®を用いることで、血漿中ASO濃度として10-10000 pg/mLの範囲において検量線の作成が可能であった。

血漿中HDOとしては定量下限濃度として25 pg/mLを設定可能であった。今後はバリデーションを実施した後、LC-MS/MS及びHyb-ECLとの相関確認を予定している。