投稿 ▶原著

複数種の液体クロマトグラフ質量分析計を用いたモデル核酸医薬品の分析データの比較

廣瀬 賢治*1,†，吉田 徳幸*2,†，寺崎 真樹*1，瀬崎 浩史*3，唐澤 薫*4，岩崎 了教*4，高原 健太郎*5，滝口 直美*6，関口 光明*7，南海 浩一*8，斎藤 恵美*8，佐藤 秀昭*9，大澤 昂志*10，山口 卓男*10，伊藤 浩介*11，川上 純司*12，小比賀 聡*10,#，井上 貴雄*2,#

（受付：令和5年2月27日，受理：令和5年7月3日）

Comparison of Analysis Data of Model Oligonucleotide Therapeutics Obtained with Different Types of Liquid Chromatograph–Mass Spectrometers

Kenji HIROSE*1,†, Tokuyuki YOSHIDA*2,†, Maki TERASAKI*1, Hiroshi SEZAKI*3, Kaoru KARASAWA*4, Noriyuki IWASAKI*4, Kentaro TAKAHARA*5, Naomi TAKIGUCHI*6, Mitsuaki SEKIGUCHI*7, Hirokazu NANKAI*8, Emi SAITO*8, Hideaki SATO*9, Takashi OSAWA*10, Takao YAMAGUCHI*10, Kosuke ITO*11, Junji KAWAKAMI*12, Satoshi OBIKA*10,# and Takao INOUE*2,#

Summary

In evaluating the quality of oligonucleotide therapeutics, it is necessary to pay close attention to the presence of

＊1　日本ウォーターズ株式会社　東京都品川区北品川1-3-12 第5小池ビル（〒140-0001）
Nihon Waters K. K., Koike No.5 building, 1-3-12, Kitashinagawa, Shinagawa, Tokyo 140-0001, Japan
＊2　国立医薬品食品衛生研究所　神奈川県川崎市川崎区殿町3-25-26（〒210-9501）
National Institute of Health Sciences, 3-25-26 Tonomachi, Kawasaki-ku, Kawasaki, Kanagawa 210-9501, Japan
＊3　アジレント・テクノロジー株式会社　東京都八王子市高倉町9番1号（〒192-8510）
Agilent Technologies Japan, Ltd., 9-1 Takakura-cho, Hachioji, Tokyo 192-8510, Japan
＊4　株式会社エービー・サイエックス　東京都品川区北品川4-7-35 御殿山トラストタワー21F（〒140-0001）
K.K. AB SCIEX, Gotenyama Trust Tower 21F, 4-7-35 Kitashinagawa, Shinagawa-ku, Tokyo 140-0001, Japan
＊5　サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社　神奈川県横浜市神奈川区守屋町3-9（〒221-0022）
Thermo Fisher Scientific Inc., 3-9 Moriya-cho, Kanagawa-ku, Yokohama, Kanagawa 221-0022, Japan
＊6　住友ファーマ株式会社　大阪府吹田市江の木町33-94（〒564-0053）
Sumitomo Pharma Co., Ltd., 33-94 Enoki-cho, Suita, Osaka 564-0053, Japan
＊7　塩野義製薬株式会社　兵庫県尼崎市杭瀬寺島2-1-3（〒660-0813）
Shionogi & Co., Ltd., 2-1-3 Kuise Terajima, Amagasaki, Hyogo 660-0813, Japan
＊8　味の素バイオファーマサービス株式会社ジーンデザイン　大阪府茨木市彩都あさぎ7-7-29（〒567-0085）
Ajinomoto Bio-Pharma Services, GeneDesign, Inc., 7-7-29 Saitoasagi, Ibaraki, Osaka 567-0085, Japan
＊9　ルクサナバイオテク株式会社　大阪府吹田市山田丘2-8 テクノアライアンスC棟C907（〒565-0871）
Luxna Biotech Co., Ltd., C907 Bldg. C, Techno-Alliance Complex, 2-8 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan
＊10　大阪大学大学院薬学研究科　大阪府吹田市山田丘1-6（〒565-0871）
Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan
＊11　独立行政法人医薬品医療機器総合機構　東京都千代田区霞が関3-3-2新霞が関ビル（〒100-0013）
Pharmaceuticals and Medical Devices Agency, Shin-Kasumigaseki Building, 3-3-2 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-0013, Japan
＊12　甲南大学フロンティアサイエンス学部（FIRST）生命化学科　兵庫県神戸市中央区港島南町7-1-20（〒650-0047）
Faculty of Frontiers of Innovative Research in Science and Technology, Konan University, 7-1-20 Minatojima-minamimachi, Chuo-ku, Kobe, Hyogo 650-0047, Japan
†　共同第一著者 Co-first authors
#　責任著者Corresponding author

No reproduction or translation of articles in this journal without permission. Moreover, copy or reproduction without permission is prohibited except for exception under copyright laws.

oligonucleotide impurities. As an analysis method, LC/MS, combining liquid chromatography (LC) and mass spectrometry (MS), is generally used for quality assessment. However, since the physicochemical properties of active pharmaceutical ingredient (API)-derived impurities are likely to be similar to those of the API, there are technical limitations on their separation and purification. Therefore, it is important to be aware of such limitations and to understand the capabilities of the analytical techniques used in evaluating the quality of oligonucleotide therapeutics with due consideration of the characteristics of the oligonucleotides and their manufacturing processes.

In order to achieve this, we analyzed model oligonucleotides using several different types of commercial liquid chromatograph-mass spectrometers (LC-MS). We investigated the LC separation of impurities from the parent oligonucleotide, the relative quantification of impurities, the characterization of the parent oligonucleotide, and the identification of impurities. In the LC separation of the impurities from the parent oligonucleotide, none of the LC-MS analyses achieved complete separation (Rs > 1.5) of all the major impurities. However, almost complete separations were observed between the parent oligonucleotide and three or more nucleotide-deleted oligonucleotide impurities. The relative quantification of impurities was not consistent among the LC-MS instruments tested here, and inconsistent ion suppressions or enhancements were observed. For the characterization of the parent oligonucleotide, the accuracy of deconvoluted mass was demonstrated to be within 3 ppm for all LC-MS analyses, and MS/MS sequence analysis showed 100% coverage in more than half of the cases. For the structural estimation of impurities, the mass accuracy was within 2 ppm for all LC-MS analyses when impurities were spiked at 0.1% or more, and the MS/MS sequence coverage was 76% or more when the spiked amounts of impurities were 1% or more. These results indicate that generally used LC/MS methods could provide reliable information for estimating the composition of impurities present at a level of 1% or more.

Key words

Oligonucleotide therapeutics, Quality evaluation, Impurities, Liquid chromatography, Mass spectrometry

1. 緒言

近年，アンチセンスやsiRNAに代表される核酸医薬品の実用化が急速に進んでおり，2023年8月までに日米欧のいずれかで承認された核酸医薬品は，アンチセンス医薬品10品目，siRNA医薬品5品目を含む17品目にのぼる．核酸医薬品は「核酸（ヌクレオチド）が十数～数十塩基連結したオリゴヌクレオチド」を有効成分とする医薬品であり，その分子量は数千から数万に及ぶ．また，ヌクレオチド間のリン酸ジエステル結合部に負電荷が存在することから，分子全体としてポリアニオンの性質を有する（ただし，電荷を持たないホスホロジアミデート結合で構成されるモルフォリノ核酸はこれにあたらない）．このような特徴から，核酸医薬品は低分子医薬品や抗体医薬品などの既存の医薬品とは分離分析における特性が異なり，特有の考慮事項が存在する．

核酸医薬品は化学合成により製造されるが，その製造過程や品質管理においては，不純物として混入する「オリゴヌクレオチド類縁物質」の評価に特に留意が必要である．具体的には，N塩基長のオリゴヌクレオチドにおいて，N-1, N+1塩基長などの鎖長の異なるオリゴヌクレオチド（ヌクレオチド欠損体/付加体）や，一部の塩基が変化したオリゴヌクレオチド（塩基部変換体）がオリゴヌクレオチド類縁物質として混入する．また，これら以外にも特にアンチセンス医薬品で多く用いられているS化オリゴヌクレオチド〔リン酸ジエステル結合部における非結合酸素原子（O）の一つを硫黄原子（S）に置換したホスホロチオアートオリゴヌクレオチド〕については，一部のSがOに変換されたオリゴヌクレオチド（PSPO変換体）が類縁物質として混入する[1,2]．オリゴヌクレオチドは一般的に固相合成で製造されるため精製の機会が少なく，また，有効成分（原薬）であるオリゴヌクレオチドとオリゴヌクレオチド類縁物質は物理的化学的性質が類似していることから，分離/精製には技術的な限界が存在する．この

本誌掲載記事の無断転載・翻訳を禁止します．また，無断複写・複製は著作権法上の例外を除き禁止されています．

ことから，核酸医薬品は一般的な化学合成医薬品と比較して，不純物の含量（割合）が高い傾向にある．

核酸医薬品の品質評価の手法としては，低分子医薬品や抗体医薬品と同様に，液体クロマトグラフィー（LC）と質量分析（MS）を組み合わせた分離分析法（LC/MS）が中心的に用いられる．核酸医薬品の分離分析においては，LCについては超高性能液体クロマトグラフィー（Ultra-High Performance Liquid Chromatography：UHPLCあるいはUPLC）が汎用されている．従来のHPLCが粒子径5 μm程度のカラム充塡剤を用いるのに対し，UHPLCは2 μm以下のカラム充塡剤を用いて，より高い線流速で高い分離能を得ることを目的に開発された分離技術であり，2004年に市販機が販売されてから急速に普及した．原理や実用例については既報の論文に詳しく記載されているのでここでは省略するが[3]，HPLCと比較して分析時間が約10分の1となり，かつ数倍の分離能が得られる性能を有している．特に近年では，核酸医薬専用の種々の分離モードの市販カラムが増え，UHPLCは核酸医薬品の品質評価のための汎用的な分離分析技術として定着している．MSについては，近年の著しい機器性能向上と上述のUHPLCの組み合わせにより，医薬品開発のあらゆるステージにおいて，中心的な分析技術として活用されている．核酸医薬品の特性解析においては，特に精密質量情報から化合物組成を推定する定性分析能力が重要となり，質量確度が数ppm程度となるような高い性能が求められる（＊計算精密質量と計測値の差の絶対値，又は百万分率ppmで表す）．また，分子量が数千を超える核酸医薬品を測定するためには幅広い質量範囲が必要で，更に，分子構造を推定するために実施するMS/MS法によるフラグメント解析機能や，不純物含量や純度といった量的評価に関する能力（定量性，ダイナミックレンジ，感度）も必須要件となる．これらを満たす代表的な質量分析計タイプとして，四重極飛行時間型（Quadrupole–Time of Flight：Q-Tof）やキングドントラップ型があり，核酸医薬品の品質評価の現場で汎用されている．

以上に述べた背景から，核酸医薬品の品質評価にあたっては，オリゴヌクレオチドの製造上の特性や物理化学的特性を踏まえた上で，技術的限界を意識しながら分離分析を行っていく必要がある．また，核酸医薬品の品質評価の在り方を議論する際には，核酸医薬品の分析技術の現状を把握することが望まれる．しかしながら，オリゴヌクレオチドの分離分析に関する知見については，解析対象であるオリゴヌクレオチドの構造（長さ，修飾核酸の種類・配置）や解析に用いる液体クロマトグラフ質量分析計（LC-MS）の種類が各論文で異なっており，分離分析の原理，機器のグレード，データ解析のアルゴリズム，分離分析の条件なども論文により異なる[4]．したがって，核酸医薬品の分析技術の現状について統一的な見解が得られておらず，また，分析技術の現状・限界を積極的に把握するための試みも行われていない．

以上の背景を踏まえ，本研究では，同一のモデルオリゴヌクレオチドを解析対象とし，複数種のLC-MSで分離分析データを取得した．具体的には，国内でLC-MSを取り扱うアジレント社，サーモフィッシャーサイエンティフィック社，エービー・サイエックス社，日本ウォーターズ社の4社において，既承認の核酸医薬品であるミポメルセン及びヌシネルセンの配列を元に作製したオリゴヌクレオチドについて，同じ試験項目を実施し，これらの分離分析データを比較した．解析に用いるLC-MSシステムについては，実際に核酸医薬品の品質評価・品質管理に汎用されている機器とし，LCについては4社全てがUHPLCを採用し，質量分析計タイプとしては3社がQ-Tofで1社がキングドントラップ型を使用した（なお，ここではUHPLCとMSの組み合わせについても広義のLC/MSとして略記している）．分離分析の条件については統一せず，各社が適切と考える条件を採用することとした．本研究では，オリゴヌクレオチドの分離分析に関する最先端技術（各社において最も性能が高い機種）を用いたわけではなく，あくまで，核酸医薬開発において現実的に採用可能な機器・手法を用いた点にご留意頂きたい．

2. 実験方法

2.1 分析検体

本研究では，分析対象のモデル核酸医薬品として，既承認のアンチセンス医薬品であるミポメルセン及びヌシネルセンと同一の配列・構造を有するオ

No reproduction or translation of articles in this journal without permission. Moreover, copy or reproduction without permission is prohibited except for exception under copyright laws.

リゴヌクレオチド（以下，本稿ではこれらをミポメルセン及びヌシネルセンと表記する）を用いた．ミポメルセンはオリゴヌクレオチドの両端の各5ヌクレオチドに2’-*O*-methoxyethyl（2’-MOE）を導入した20塩基長のgapmer型アンチセンスである．一方，ヌシネルセンは全てのヌクレオチドに2’-MOEを導入した18塩基長のアンチセンスである．ミポメルセンとヌシネルセンはともに，全てのリン酸ジエステル結合部にホスホロチオアート修飾を有するS化オリゴヌクレオチドである．不純物の相対定量の解析においては，モデル不純物として各アンチセンスの5’末端の1塩基を欠損させたオリゴヌクレオチド（1ヌクレオチド欠損体）を用いた．各オリゴヌクレオチドは味の素バイオファーマサービス株式会社ジーンデザインにて合成を行った．配列の詳細を以下に示す．

ミポメルセン：5’-G^{m}C^{m}CT^{m}Cagt^{m}ctg^{m}ctt^{m}cG^{m}CA^{m}C^{m}C-3’

ミポメルセン1ヌクレオチド欠損体：5’-^{m}C^{m}CT^{m}Cagt^{m}ctg^{m}ctt^{m}cG^{m}CA^{m}C^{m}C-3’

ヌシネルセン：

5’-T^{m}CA^{m}CTTT^{m}CATAATG^{m}CTGG-3’

ヌシネルセン1ヌクレオチド欠損体5’-

^{m}CA^{m}CTTT^{m}CATAATG^{m}CTGG-3’

小文字：DNA

大文字：2’-*O*-methoxyethyl（2’-MOE）

^{m}C：2’-MOE_5-methylcytosine

^{m}c：DNA_5-methylcytosine

2.2　試薬

LCの移動相に用いたメタノール，アセトニトリル，トリエチルアミン（TEA），*N*,*N*-ジイソプロピルエチルアミン（DIPEA），1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロ-2-プロパノール（HFIP）は市販のLCグレードあるいはLC/MSグレードを用いた．

2.3　装置及び分析条件

各社が用いたLC-MSシステム及び分析条件をTable 1にまとめた．分析条件は，現時点で各装置において，今回のモデル核酸医薬品の分析に適して

Table 1　各社の使用LC-MSシステムと分析条件

	液体クロマトグラフ	質量分析計	分離カラム	移動相	データ解析ソフトウェア
アジレント・テクノロジー社	1290 Infinity II LC（Agilent）	6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF（Agilent）	Poroshell 120 HPH-C18（Agilent）	A: 16 mM TEA, 400 mM HFIP in Water B: Methanol	BioConfirm（Agilent） MassHunter Qualitative Analysis（Agilent） OligoSearch（Agilent） Oligonucleotide Sequencer（Agilent）
エービー・サイエックス社	Prominence UFLC XR（Shimadzu）	TripleTOF® 6600+ system（SCIEX）	Kinetex® EVO C18（Phenomenex） ACQUITY UPLC™ Oligonucleotide BEH C18（Waters）	A: DIPEA, HFIP in Water B: DIPEA, HFIP in Acetonitrile/Water ＊試薬，溶媒の濃度は測定項目ごとに最適化した	SCIEX OS（SCIEX） PeakView®（SCIEX） Molecule Profiler（SCIEX）
サーモフィッシャーサイエンティフィック社	Vanquish™ Flex UHPLC（Thermo Fisher Scientific）	Q Exactive™ Plus Orbitrap MS（Thermo Fisher Scientific）	DNAPac™ RP（Thermo Fisher Scientific）	A: 15 mM TEA, 400 mM HFIP in Water B: 15 mM TEA, 400 mM HFIP in 50% Methanol/Water	BioPharma Finder™（Thermo Fisher Scientific）
日本ウォーターズ社	ACQUITY UPLC™ H-class Bio Plus（Waters）	Xevo™ G2-XS QTof（Waters）	ACQUITY UPLC™ Oligonucleotide BEH C18（Waters）	A: 15 mM TEA, 400 mM HFIP in Water B: 15 mM TEA, 400 mM HFIP in 50% Methanol/Water	MassLynx™（Waters） MaxEnt1™（Waters） TargetLynx™（Waters） Promass for MassLynx（Novatia）

本誌掲載記事の無断転載・翻訳を禁止します．また，無断複写・複製は著作権法上の例外を除き禁止されています．

Table 2　核酸医薬の液体クロマトグラフィーで用いられる分離モード

分離モード	分離原理	利点	欠点	MS検出
サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）	分子サイズ	• 目的物とは異なる分子サイズを有する不純物の分離（凝集体，分解物など） • 短鎖長から長鎖長まで対応	• 分離能が高くない • 分子サイズの近い不純物は分離できない • 移動相に高濃度の塩を使用	原則不可
イオン交換クロマトグラフィー（IEC）	電荷（鎖長・修飾）	• 短いオリゴヌクレオチド（<20～25 mer）で良好な分離 • PSPO変換体の分離に汎用	• 鎖長が長くなるほど分離能は低下 • 移動相に高濃度の塩を使用	原則不可
逆相クロマトグラフィー（RPC）	疎水性	• 保護基の有無を効果的に分離	• 核酸塩基の弱い疎水性が保持の不規則性を引き起こす可能性がある • 特に長いオリゴヌクレオチドで分離能が低下する	可
イオンペア逆相クロマトグラフィー（IP-RPC）	電荷・疎水性（鎖長）	• 逆相カラムを用いるため分離能が高い • リン酸基由来の電荷数に基づき分離するため，鎖長の異なる不純物に有効（N-1, N+1体など） • 揮発性のイオンペア試薬を用いればLC/MS分析に適用できる	• 鎖長が同じ場合は分離が困難（PSPO変換体） • 移動相の調製法が複雑で，保存安定性が低い	条件付可
親水性相互作用クロマトグラフィー（HILIC）	親水性（塩基の種類・修飾）	• 目的物と同じ鎖長で塩基の違いにより分離できることもある • 不揮発性の塩を用いないのでLC/MS分析に適用 • 鎖長の異なる不純物の分離への応用に期待	• カラム種によって挙動が異なる • 逆相よりも分離能は高くない	可

いると考えられる条件を各社が選択・採用した．

3. 結果・考察

3.1　目的物と不純物のLC分離

核酸医薬品の品質評価を実施するためには，有効成分（目的物）を不純物とできるだけ分離することがまず重要である．この際，分離対象となる不純物の構造によって適切なLCの分離モードが選択されることになる（Table 2）．例えば，目的物と分子サイズが大きく異なる凝集体や分解物を分離する場合ではサイズ排除クロマトグラフィー（Size Exclusion Chromatography : SEC）が用いられ，また，S化オリゴヌクレオチドにおいてPSPO変換体を分離識別する場合には，イオン交換クロマトグラフィー（IEC）が選択される．本研究で測定検体として用いるミポメルセン（20塩基長）及びヌシネルセン（18塩基長）はいずれもS化オリゴヌクレオチドであることから，リン原子（P）の立体異性に由来するジアステレオマーの混合物となる．例えば，20塩基長のミポメルセンについては、リン原子が19存在するため，$2^{19} \fallingdotseq 52$万種のオリゴヌクレオチドの混合物となる．このため，S化オリゴヌクレオチドはLCにおけるピークがブロード化し，S化されていないオリゴヌクレオチドと比べ，不純物との分離が困難になる特徴を有する[5]．一般にオリゴヌクレオチドの不純物は目的物よりも短鎖長の不純物の割合が高いが，これら鎖長の異なる不純物を分離するには，カラム担体とオリゴヌクレオチドのリン酸基との保持効率を改善する目的で，逆相クロマトグラフィー（RPC）にイオンペア試薬（アミン類）を添加するイオンペア逆相クロマトグラフィー（IP-RPC）が汎用されている．この際の検出方法としては，目的物と不純物のピーク面積比から純度を算出する場合にはUV検出が必要となり，目的物の確認や不純物構造の推定，並びにピーク未分離の不純物の量的な評価をする場合にはMS検出も必須となる．そのため，LC/MSのイオン化法であるエレクトロスプレーイオン化法（ESI）と相性の良い揮発性のイオンペア試薬やpH調整用の添加剤を使用し

No reproduction or translation of articles in this journal without permission. Moreover, copy or reproduction without permission is prohibited except for exception under copyright laws.

て，これら検出器を直列で組み合わせて用いる場合が多い．本節の解析では，ミポメルセン及びヌシネルセンの純度が90–95%（LC分離したオリゴヌクレオチドのUV面積値を基に算出した純度：以降，LC純度）となるように精製したものを測定検体として用い，IP-RPCのUV検出クロマトグラムから目的物を含むピークと不純物ピーク，並びに不純物間のピークの分離度を評価した．また，各ピークの面積百分率（%）を算出し，汎用的な品質評価試験法を見据えて現状と改善点を把握すべく考察した．

ミポメルセンのIP-RPCクロマトグラムの一例をFig. 1に示した．目的物を含む主ピーク（⑥）前後に複数の不純物ピークが観測されており，このうちピーク⑥より前に検出されているピーク①～⑤については，短鎖長の不純物（5'末端から2塩基欠損体（N-2）から同6塩基欠損体（N-6））が主要成分であることを同時に取得したMSデータ解析から確認している（Table 3）．また，1塩基欠損体（N-1体）のピークは確認できておらず，ピーク⑥に含まれると考えられる．A社からD社の4社を比較した際，概ねクロマトグラムのパターンに共通性は確認できるが，用いたカラム，移動相組成，グラジエントなどLC条件はそれぞれ異なるため，データ細部においては差異も見られた．

ミポメルセンのMSデータから各社で共通して確認された短鎖長の五つの不純物ピーク（①から⑤）に注目し，分離度，含量（%）をTable 3（a）にまとめて比較した．なお，ここでは日本薬局方での計算方法に準じて分離度（Rs）を算出しており，Rsが1.0以上であれば二つのピークを十分に識別可能，1.5以上であればピークが完全分離しているとみなし，データを評価している．Table 3（a）を見ると，ピーク①から⑥の溶出順は各社で一致していた．Rsについて見てみると，ほとんどの場合で1.0以上を示しており，ピーク同士を識別するには十分な結果となった．各社のRsを比較したところ，目的物を含むピーク⑥と⑤についてはA社とD社は完全分離を達成したが，C社ではRs=1.4と完全分離に至らず，B社では未分離であった．その他の不純物ピーク間のRsを見ると，A社，D社ではピーク①と②が完全分離していなかった．一方で，B社とC社ではA社，D社と比較して，不純物ピーク②と③，並びにピーク③と④間のRsが比較的大きく各社で差異がみられた．各ピークの面積百分率（%）をみてみると，目的物を含むピーク⑥は各社とも96%以上で得られており，3社（A社，B社，D社）で98%台と共通していた．また，不純物①から⑤の面積百分率は各社とも1%未満で共通していた．

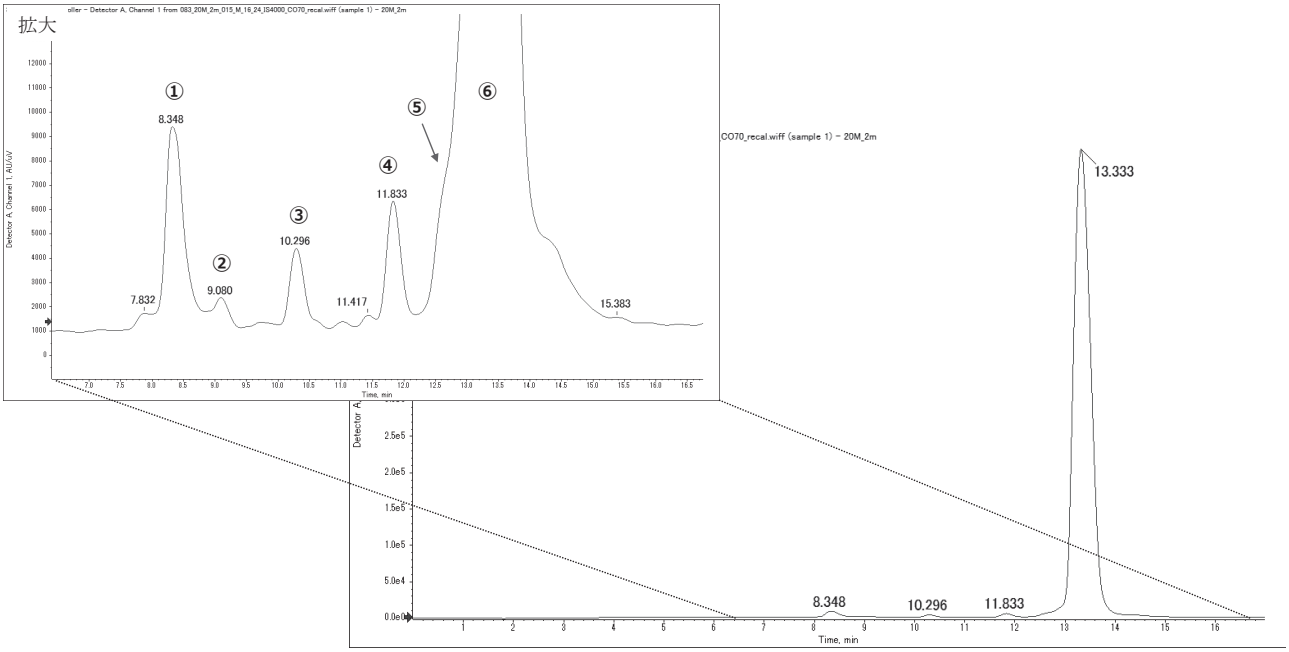

Fig. 1　目的物と不純物のLC分離例

ミポメルセンのIP-RPCクロマトグラム（UV検出，B社のデータ）を示す．

本誌掲載記事の無断転載・翻訳を禁止します．また，無断複写・複製は著作権法上の例外を除き禁止されています．

Table 3　目的物と不純物の分離度及び面積百分率

(a) ミポメルセン

ピーク	主要成分	A社			B社			C社			D社		
		R.T.	分離度	%	R.T.	分離度	%	R.T.	分離度	%	R.T.	分離度	%
①	5' N-6	1.29	-	0.12	8.35	-	0.96	7.63	-	0.34	4.24	-	0.18
②	5' N-5	1.47	1.19	0.43	9.11	1.758	0.07	8.17	1.94	0.15	4.47	1.29	0.22
③	5' N-4	1.96	1.62	0.20	10.30	2.988	0.34	8.83	3.12	0.36	4.80	2.41	0.24
④	5' N-3	2.87	2.12	0.45	11.83	3.684	0.45	9.38	2.61	0.47	5.15	2.26	0.35
⑤	5' N-2	4.03	2.19	0.10	-	-	-	9.84	2.28	0.37	5.40	1.75	0.37
⑥	FLP	5.06	1.91	98.70	13.33	2.855	98.10	10.31	1.40	96.53	5.71	1.61	98.52

(b) ヌシネルセン

ピーク	主要成分	A社			B社			C社			D社		
		R.T.	分離度	%	R.T.	分離度	%	R.T.	分離度	%	R.T.	分離度	%
①	5' N-9	1.57	-	0.05	7.42	-	0.13	6.50	-	0.17	3.58	-	0.13
②	5' N-8	2.29	1.37	0.11	8.79	2.215	0.15	7.61	2.53	0.12	4.04	2.17	0.11
③	5' N-7	2.98	1.34	0.07	9.31	0.818	0.16	8.33	2.3	0.13	4.33	1.33	0.1
④	5' N-6	4.01	1.77	0.10	10.54	2.233	0.19	8.93	2.33	0.23	4.72	1.58	0.15
⑤	5' N-5	4.88	1.82	0.09	11.56	2.188	0.29	9.39	1.84	0.29	5.02	1.32	0.21
⑥	5' N-4	5.51	1.57	0.17	12.44	1.997	0.42	9.83	1.76	0.48	5.26	1.23	0.3
⑦	5' N-3	6.07	1.53	0.22	12.69	0.578	0.39	10.17	1.47	0.46	5.41	1.03	0.45
⑧	FLP	7.32	2.85	99.08	14.2	3.072	96.18	11.05	2.40	98.13	5.97	2.70	98.19

FLP：Full Length Product（目的物），R.T.：Retention time（保持時間，単位は分），%：面積百分率
表中の分離度は該当ピークの前のピークとの分離度を示している．また，分離度1.5未満のピークについて，グレーでハイライトした．

ただし数値のばらつきは見られ，例えばA社とB社ではピーク①の面積百分率がB社で8倍高かったのに対し，ピーク②ではA社で6倍以上高いという結果であった．なお，Table 3（a）ではピーク①から⑤以外の不純物ピークの面積値を記載していないため，面積百分率の合計が100％にはならない点に注意されたい．

同様にヌシネルセンのデータをTable 3（b）にまとめた．ミポメルセンと比較して多くの短鎖長不純物ピーク（N-3からN-9）が各社共通で確認された．N-1体，N-2体については，目的物を含む主ピーク⑧との分離ができていないため確認できなかったと考えられる．ここでもそれぞれのピーク間のRsは各社で差異が見られ，ミポメルセン同様にRsが1.5以上を示したピーク対が半数以上であり，一部を除きRsは1.0以上であった．各ピークの面積百分率（%）については，目的物を含むピーク⑧は各社とも96％以上，3社（A社，C社，D社）で98％以上であった．不純物①から⑦の面積百分率は各社とも0.5％未満で共通していた．数値のばらつきは3倍程度が見られたものの，ピーク⑥と⑦の面積百分率が高い点で各社共通していた．

4社のLC分離条件は，IP-RPCモードでpH調整用の酸としてHFIPを用いている点で共通しているが，カラム種やグラジエント条件は異なる．特にA社とD社では目的物ピークが10分以内に溶出する条件で測定している．これはピーク分離よりもスループット性を重視したためであるが，より長いカラム長（150mm程度）の使用，あるいは移動相グラジエントの調整，並びにアミンや酸の変更などの検討により，ピーク分離は改善できると予想される．しかしながら，オリゴヌクレオチドの製法上，鎖長の異なる多様な不純物が完全にはピーク分割されずに連続的に溶出するクロマトグラムになることは避

No reproduction or translation of articles in this journal without permission. Moreover, copy or reproduction without permission is prohibited except for exception under copyright laws.

けられず，更にホスホロチオアート修飾した場合には1箇所につき1対のジアステレオマーが生じてピークがブロードになるため分離能が下がる．加えて今回のデータでは，面積百分率1%以下の不純物ピーク面積の比率が各社で異なる結果が示されたが，UVクロマトグラムの複雑さや分離能の限界によるものと考えられる．全ての不純物ピークをクロマトグラフィーだけで完全に分離するのは困難であるため，MS検出を併用して，マススペクトル上で不純物を分離識別する方法が現実的であると考えられる．

次に，UVクロマトグラム上の各ピークを構成する成分に注目し，質量分析のデータを解析した．IP-RPCでは主として鎖長に応じて保持力が決まるため，同じ保持時間帯に複数の成分が同時溶出することがある．Table 4にミポメルセン分析時に得られた代表的な解析結果を示した．目的物（計算精密質量7172.0916）のピーク⑥が溶出する5.71分には，質量の異なる成分が複数種確認され，そのうち2種は5’末端並びに3’末端の1塩基欠損体であった．またそれ以外にも2種のピークが明確に帰属でき，それぞれの質量からPSPO変換体（計算精密質量7156.1144）及びシアノエチル基付加体（計算精密質量7225.1181）であると推定された（Table 4（a））．同様にピーク⑤が溶出する5.40分には，5’末端の2塩基欠損体を主成分として，そのリン酸付加体，及び3’末端の2塩基欠損体の存在が示唆された（Table 4（b））．つまり，低分子医薬品と核酸医薬品の違いとして，UVクロマトグラムのピーク面積から純度算出や不純物の含量を算出する際には，他の類似不純物が共存している可能性が高いという点に留意すべきである．そのような場合には，より分解能が高く，質量の違いで各成分を分離識別できるMSスペクトルのイオン強度により定量を行うのが一般的である．Table 4には各成分のイオン強度とそこから算出した相対比率を示している．各成分のESI法によるイオン化効率は厳密には同等ではなく，またイオン化の際に競合が起こることは周知の事実ではあるが，これらのイオン強度の数値は各成分の存在量を反映しているとみなされている．これらの数値から相対定量することの妥当性については次の節で述べる．

3.2　不純物の相対定量（イオン化抑制/促進について）

品質評価試験の重要項目として，不純物の定量分析がある．代表的な不純物の一つとしてヌクレオチド欠損体（N-1体）があげられるが，前節でも示したようにスループット性を重視した汎用的なIP-RPCでは全長の目的物とはピーク分離できない

Table 4　同一保持時間を示す不純物の質量分析例（ミポメルセン，D社）

（a）ピーク⑥目的物（5.71分）					
計算精密質量（Da）	測定精密質量（Da）	質量確度	イオン強度	相対比率	配列
7172.0916	7172.107	0.0154 Da（2.1 ppm）	2.20E+09	100	目的物（全長）
6779.0156	6779.024	0.0084 Da（1.2 ppm）	1.41E+07	0.64	3’末端の1塩基欠損体
6753.0252	6753.032	0.0068 Da（1.0 ppm）	9.36E+06	0.42	5’末端の1塩基欠損体
7156.1144	7156.129	0.0146 Da（2.0 ppm）	7.42E+06	0.34	目的物のPSPO変換体
7225.1181	7225.122	0.0039 Da（0.5 ppm）	2.55E+06	0.12	目的物のシアノエチル基付加体
（b）ピーク⑤ N-2（5.40分）					
計算精密質量（Da）	測定精密質量（Da）	質量確度	イオン強度	相対比率	配列
6359.9492	6359.954	0.0048 Da（0.8 ppm）	6.81E+06	100	5’末端の2塩基欠損体
6455.8927	6455.897	0.0043 Da（0.7 ppm）	8.40E+04	1.23	5’末端の2塩基欠損体のリン酸基付加体
6385.9397	6385.947	0.0073 Da（1.1 ppm）	7.56E+04	1.11	3’末端の2塩基欠損体

D社の分析条件で取得したデータを示す．

本誌掲載記事の無断転載・翻訳を禁止します．また，無断複写・複製は著作権法上の例外を除き禁止されています．

ケースもあり，UVクロマトグラムのピーク面積から量的評価をすることに限界点もある．そこでLC/MSにより，質量スペクトルのイオン強度や抽出イオンクロマトグラムのピーク面積から相対定量を行うことが多いが、鎖長の違いなどによるイオン化効率の違いを考慮する必要がある[5]．また，一般的には，LCで分離されていない成分のMSによる定量分析においてはマトリックス効果を考慮する必要がある．マトリックス効果とは，共存する成分間でイオン化の競合が起こることによりイオン化効率が変化してイオン強度等の定量結果に影響する現象であり，特にESIによるイオン化ではしばしばみられる．

本節では，オリゴヌクレオチドの合成時に生じうる典型的な不純物の相対定量分析法として，LC/MSの問題点を把握する目的でイオン化抑制，イオン化促進の実際について検討する．検体として，全長のミポメルセン及びヌシネルセン（純度95%超）に，それぞれに混入しうる不純物を想定し，5'側の1塩基欠損体（純度95%超）を一定割合（0.1%から10%の7濃度ポイント）で添加し，質量スペクトルのイオン強度から添加量を評価した．実施方法として，各社にてLC/MS，並びにLC分離を伴わないフローインジェクション法（FIA）を用いた分析を行い，両者を比較した．

結果をFig. 2に示す．ここでは，マトリックス効果の状況について，イオン化抑制を青色，イオン化

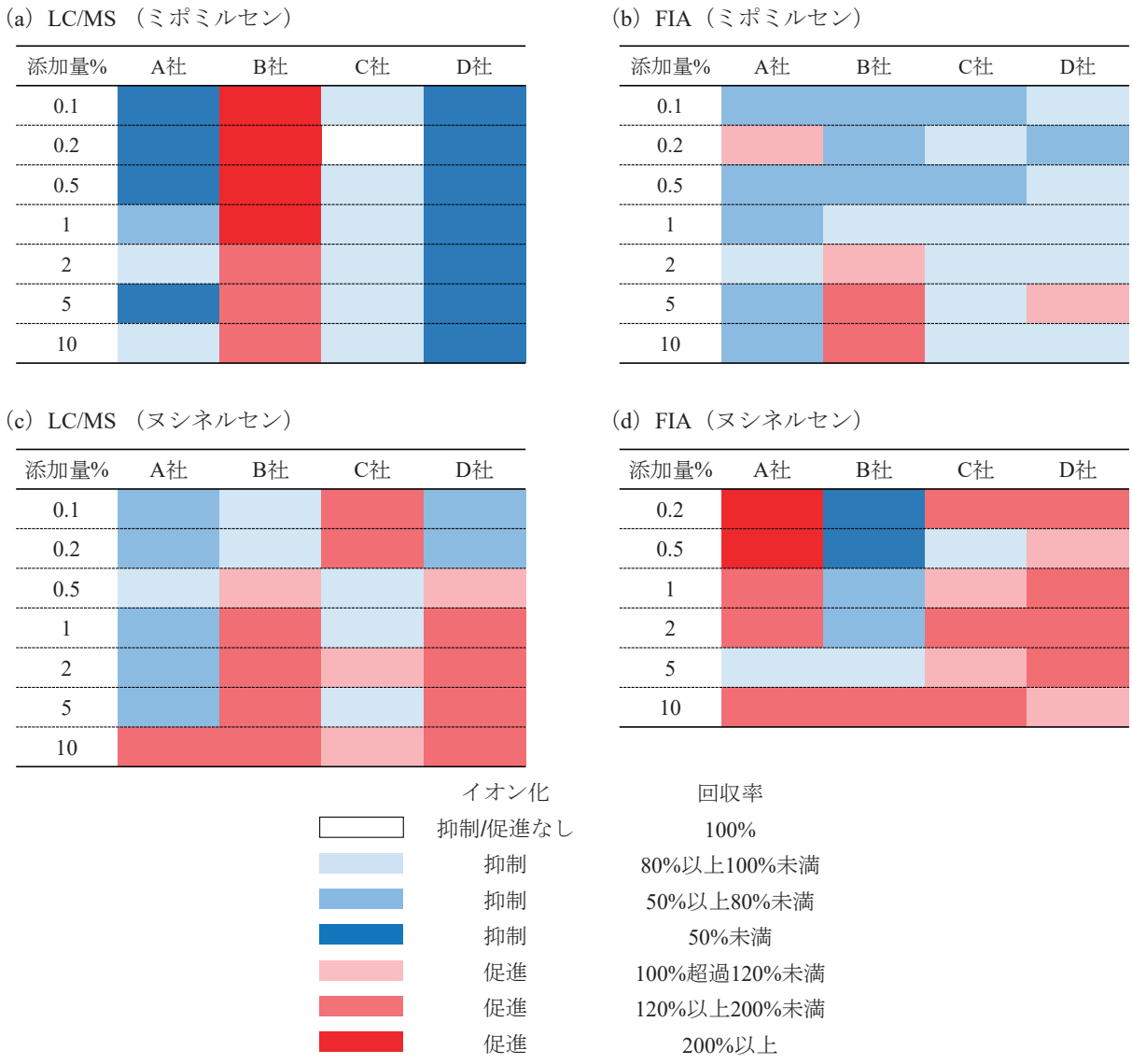

Fig. 2　不純物の相対定量におけるマトリックス効果のヒートマップ
(a) LC/MS（ミポミルセン）(b) FIA（ミポミルセン）(c) LC/MS（ヌシネルセン）(d) FIA（ヌシネルセン）

No reproduction or translation of articles in this journal without permission. Moreover, copy or reproduction without permission is prohibited except for exception under copyright laws.

促進を赤色で示し，それらの程度を色の濃淡で表現している．回収率は，目的物に不純物を添加した場合に得られるイオン強度を，不純物単独で測定した場合のイオン強度に対する割合（%）として算出した．ミポメルセンのLC/MSの結果をFig. 2（a）に示した．各社の結果に共通性が見られず，A社，C社及びD社ではイオン化抑制がみられたのに対し，B社は全ての測定ポイントでイオン化促進が確認された．また，イオン化抑制を示した3社においてもその程度はさまざまであり，C社では全ての測定ポイントにおいて回収率80%以上（添加量0.2%では回収率100%）でイオン化抑制としては弱い程度であったのに対し，D社では回収率50%未満と強いイオン化抑制がみられた．また，データは示さないが，4社中2社で別日に同一条件で2回目の測定を実施したところ，1回目とは異なる傾向でイオン化抑制あるいはイオン化促進が様々な程度で起こり，日間再現性は見出せなかった．同じサンプルの定量をFIAで実施した結果をFig. 2（b）に示した．LC/MSの結果と同様に各社の結果に共通性は見られず，イオン化抑制あるいはイオン化促進が様々な程度で起こっており，添加量に依存的な傾向も見られなかった．また，FIAでも同様に2回目の測定を実施したが，日間再現性は見出せなかった．以上の検証からLC/MSとFIAを比較した場合，結果に共通性があるとは言えず，マトリックス効果の程度についてもどちらがより強いという判断ができる結果は得られなかった．

同様の検討をヌシネルセンについても実施し，その結果をFig. 2（c）及び（d）に示した．各社のLC/MSの結果Fig. 2（c）をミポメルセンの結果と比較したとき，同様の傾向を示す結果とはならなかった．例えばD社はミポメルセンでは強いイオン化抑制を示していたが，ヌシネルセンでは添加量0.5%以上でむしろイオン化促進を示す結果となった．また，ヌシネルセンのLC/MS結果を各社で比較した場合にも共通の傾向があるとは言えず，イオン化抑制あるいは促進が様々な程度でみられた．FIAの結果も同様であり，ミポメルセンの結果との比較，各社の比較をしても，共通性や規則性はみられなかった（Fig. 2（d））．

当初予想したように，FIAでマトリックス効果が観察されたが，イオン化の抑制あるいは促進の観点では，今回の解析条件においては，不純物の添加量や機器システムに依存しない結果となった．また，LC/MSで分析対象物をカラム分離して保持時間に差を出すことで，これらのマトリックス効果を軽減できることを予測して本検討を実施したが，それを示す結果は得られなかった．

このような結果に至った原因について考察する．まず，各社が使用した汎用型の質量分析計は少なくとも1,000倍のスペクトルダイナミックレンジを有する市販機であるため，不純物の添加量が0.1%以上の相対定量分析を安定的に実施できる能力に疑問はない．また，今回の検討において添加回収率の算出方法は各社で異なり，ア）マススペクトル上の全ての関連イオン（電荷数の異なるイオンや同位体イオン）の強度の合算，イ）最も存在率の高い電荷数の同位体イオンの強度の合算，及び，ウ）最も存在率の高い電荷数のイオンによる抽出イオンクロマトグラムのピーク面積の三つに大別されるが，いずれの方法で算出するにしても結果の傾向には大きな影響を与えるものではないと考えられる．各社が用いたLC及びFIAの移動相の組成はそれぞれ完全に一致はしないものの，オリゴヌクレオチド分析で一般的に用いられる試薬を用いている点で共通している．つまり，水と有機溶媒の混液にイオンペア試薬としてのアミンとpH緩衝用のHFIPを添加して用いている．このイオンペア用移動相については，調製から測定までの時間経過により，MS感度の低下や，金属アダクトイオンの生成が一般的に知られており，できるだけ用時調製することが望ましい．また，調製方法の僅かな差異が結果に影響することも考えられ，調製手順の詳細を統一することも必要と考えられている．このことが，今回の結果の要因となったかについては追加の検証が必要と考える．また，各社のグラジエントやカラム長といった分離条件については，前節でも考察したように，目的物とN-1体が最大限に分離できる条件というよりもスループット優先の条件ともいえ，マトリックス効果を抑えるための改善検討は可能と考えられる．目的物と不純物が混在している状態で不純物の相対量をMSのイオン強度から直接的に評価可能であるか，あるいはLCで分離してマトリックス効果を軽減させるべきか，今回の検討では結論を出すことはできなかった．今後，この課題を追加検討するためのよ

本誌掲載記事の無断転載・翻訳を禁止します．また，無断複写・複製は著作権法上の例外を除き禁止されています．

り包括的な後続研究が必要になると考えられる．

3.3　目的物の特性解析（精密質量測定，MS/MS配列解析）

本節では，目的物の同定のための特性解析について述べる．LC/MSを用いた化合物の同定法として，まず精密質量の確認がある．現在市販されている汎用型の高分解能質量分析計の性能は，質量が500 Da程度の低分子化合物の場合，質量確度が2 ppm以内であるとされる．これは絶対値で示すと1 mDaレベルの確度ということになる．一方，オリゴヌクレオチドを考えた場合，質量が5,000 Da以上であり，ESI-MSではリン酸基の脱プロトン化が複数個所で起こることにより電荷数の異なる複数のイオン（多価イオン）がm/z（相対質量電荷数比）500～2500程度の領域に観測され，それらのm/zを基に質量へと変換する計算過程（デコンボリューション）が加わることとなり，最終的に得られる質量の確度は低分子の場合よりも低くなることが一般的である．また，更に高度な同定法として内部構造に関連する情報を得るためにMS/MSを行うことが多い．MS/MSの解離法のうち，多くの市販機に搭載され最も使用されている手法は衝突誘起解離（CID）である．低分子化合物ではこの手法により官能基レベルの情報が得られることから構造推定のための手法として汎用されている．また，ペプチドにおいては，CIDにより主にペプチド結合（C-N結合）が選択的に切断されて特異なイオン種（bイオン及びyイオン）を生成することから，アミノ酸一つ分の質量差を判別することができ，配列の確認や翻訳後修飾が起こったアミノ酸の特定に利用される．

以上を踏まえ本節では，現実的な質量確度の確認

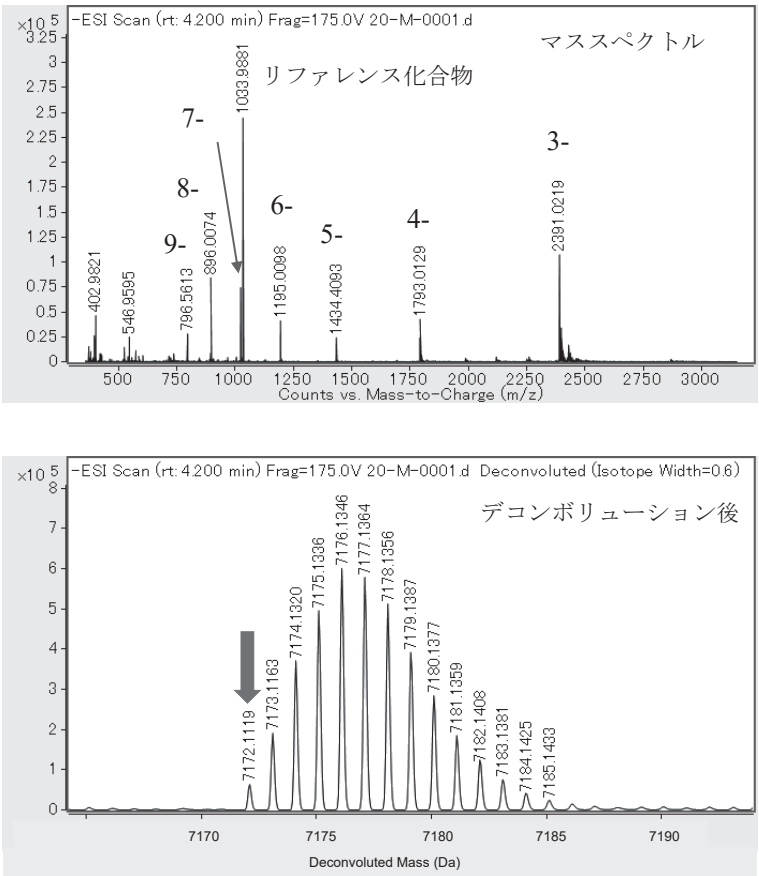

Fig. 3　目的物の特性解析例

ミポメルセンのマススペクトル（A社のデータ）を示す．

上図：フルスキャン測定による多価イオンマススペクトルの生データ（横軸は質量と電荷数の比：m/z）．各多価イオンの価数（n-）をピーク上部に付記した．

下図：上図の生スペクトルをデコンボリューション処理した後のスペクトル（横軸は質量：Da）．モノアイソトピック質量を赤矢印で示した．

No reproduction or translation of articles in this journal without permission. Moreover, copy or reproduction without permission is prohibited except for exception under copyright laws.

を行い，更に，MS/MSによる配列確認の実用性（配列カバレージがどの程度か）を検証した．モデル配列として，ミポメルセン全長（LC純度90–95％）とヌシネルセン全長（LC純度90–95％）を用いた．ミポメルセンのマススペクトルをFig. 3に示す．上段が多価イオンのスペクトルで，*m/z*796.56から2391.02にわたり，9価から3価までの多価イオンが連続的に検出されている．これをデコンボリューションしたのが下段となるが，横軸が質量となり1 Daずつ異なる同位体が分離して観測される．このうち矢印で示したのが主同位体のみからなる精密質量（モノアイソトピック質量）であり，計算精密質量と照らして化合物の同定に用いられる．各社から得られた測定精密質量の結果，並びに計算精密質量との差異及び百万分率（ppm）を質量確度としてTable 5に示した．各社とも，ミポメルセン，ヌシネルセンの両サンプルにて質量確度3ppm以内の結果となった．今回，各社が測定に使用した機器の性能は，前述の通り低分子の質量確度で2ppm以内と高性能であるが，多価イオンのデコンボリューション処理を伴うオリゴヌクレオチドにおいても3ppmの確度が得られたことから，ソフトウェアの解析能力も含めオリゴヌクレオチドの目的物を同定するための必要十分な性能を有しているといえる．オリゴヌクレオチドと同程度の分子サイズで，同じくデコンボリューションを伴うLC/MS品質試験法としてバイオ医薬品のペプチドマッピングがあるが，ペプチド同定の指標とされる質量確度は5ppm程度とされていることに鑑みると，今回の結果は十分に高い確度であると評価できる．

次にMS/MSによる配列確認について述べる．まずは一般的に実施されているオリゴヌクレオチドのMS/MSフラグメンテーションでは，リン酸ジエステル結合の4か所で主要な切断が起こることが知られており，生じたプロダクトイオンの命名についてはMcLuckeyらにより，5’側をa，b，c，dイオン，3’側をw，x，y，zイオンとすることが提唱されている[6]．配列確認の方法は各社の解析ソフトウェアの仕様によりそれぞれ詳細は異なるが，MS/MSにより生じた各プロダクトイオンの質量を確認し，理論計算される質量との一致から配列確認する点で共通している．全塩基数により配列確認できた塩基数を除してカバレージを百分率（％）で表し，検出されたイオン種とともにその強度を色分け表示することで，その確からしさを視覚的に判断できるよう工夫されている．Table 5に示した通り，配列カバレージ（％）はミポメルセンでは2社で100％，他の2社でも95％，ヌシネルセンでは3社で100％，残る1社も94％と高い結果が得られた．ここで，各社が選択したMS/MSのプリカーサーイオン（前駆イオン）の価数は必ずしも同じではなく，またCIDに使用する衝突ガスの種類や印加する衝突エネルギー値も異なるが，各社の適正条件でCIDを実施すれば良好な結果が得られることがわかった．生体高分子鎖の中でも，特にペプチドはCIDによる配列確認が長く活用され，技術的にも成熟している．一方のオリゴヌクレオチドは，上述の通り一つの結合の開裂で生じるイオンが8種あるいは脱塩基イオンなども含めてそれ以上の多種になり，また，二次開裂も起きやすいことが知られている[7]．このためスペ

Table 5　目的物の精密質量測定とMS/MS配列解析

	ミポミルセン				ヌシネルセン			
	計算精密質量	測定精密質量	質量確度（ppm）	MS/MS配列カバレージ（％）	計算精密質量	測定精密質量	質量確度（ppm）	MS/MS配列カバレージ（％）
A社	7172.0916	7172.112	2.7	100	7122.2762	7122.298	3.0	100
B社		7172.109	2.5	100		7122.286	1.4	100
C社		7172.103	1.6	95		7122.289	1.8	94
D社		7172.098	0.9	95		7122.296	2.8	100

本誌掲載記事の無断転載・翻訳を禁止します．また，無断複写・複製は著作権法上の例外を除き禁止されています．

クトルは複雑で，強度が分散することからシグナルノイズ比（S/N）が小さいスペクトルとなる．したがって各イオンの帰属が難しいと予想されたが，近年のデータ解析ソフトウェアの機能向上により，本法をオリゴヌクレオチドの目的物同定法として汎用的に使用できることが確認できたと考えている．

3.4　不純物の構造推定（精密質量測定，MS/MS配列解析）

前節では目的物の同定のためのLC/MS特性解析について，現状の技術レベルで得られる情報について述べた．本節では，含有量のより少ない不純物を対象に本分析技術の検討を行った．オリゴヌクレオチドの不純物については，Oligonucleotide Safety Working Group（OSWG）が2017年に発表したホワイトペーパー（WP）で，1.0％を構造決定（identification）の必要な閾値とする考え方を提起している[2]．一方，国内における不純物管理の考え方として，2020年に関口らがAMED医薬品等規制調和・評価研究事業「アンチセンス医薬品の品質及び安全性評価に関する研究」班の見解を記載しているが，そこでは構造決定の必要な閾値については明確な数値レベルは示しておらず「LC-UV/MSにより技術的に達成可能なレベルである」こと，並びに「適切に設定された安全性確認の閾値よりも十分に低いこと，及び不純物の管理戦略が適切に構築されていることが必要」と示されている[1]．

まず不純物として全長のミポメルセン及びヌシネルセン（LC純度95％超）にそれぞれ5’側の1ヌクレオチド欠損体（LC純度95％超）を一定割合（0.1％から50％の9濃度ポイント）で添加し，LC/MS分析を行った．どの程度の含有量であれば正確な質量測定が可能か，また，構造同定のためのMS/MS配列確認ができるかについて検証した．なお，ミポメルセンについては3社（B社，C社，D社）の機器，ヌシネルセンについては2社（B社，D社）の機器を用いて実施し，解析は各社推奨のソフトウェアを用いて行った．Table 6にミポメルセンの結果を示した．各社共通して，添加量0.1％以上で正確な質量が測定可能であった．質量誤差は多くの場合で1ppm未満，最大の場合でも1.3ppmと高い質量確度が得られることが確認できた．MS/MS配列カバレージについては，添加量0.1％でも94％というケースもあるが，各社共通としては，添加量1％以上でカバレージ78％以上が確認できており，添加量を増やすに従いカバレージも高くなる傾向にあった．また，データは示さないが，ヌシネルセンでも同様の結果が得られており，質量誤差は添加量0.1％以上であれば2ppm以内であり，MS/MSカバレージは添加量1％以上で76％以上であった．

WPが構造決定の必要な閾値を1.0％と提案していることと照らしてみると，質量確度は計算精密質

Table 6　添加不純物の精密質量測定とMS/MS配列解析（ミポメルセン）

不純物N-1添加量（％）	B社				C社				D社			
	計算精密質量	測定精密質量	質量確度（ppm）	MS/MS配列カバレージ（％）	計算精密質量	測定精密質量	質量確度（ppm）	MS/MS配列カバレージ（％）	計算精密質量	測定精密質量	質量確度（ppm）	MS/MS配列カバレージ（％）
0.1		6757.039	1.2	84		6753.026	0.1	94		6753.018	−1.0	10
0.2		6757.029	−0.3	100		6753.023	−0.3	83		6753.025	0.0	10
0.5		6757.026	−0.7	100		6753.024	−0.1	94		6753.026	0.1	36
1		6757.032	0.2	100		6753.021	−0.6	83		6753.024	−0.1	78
2	6757.0307	6757.032	0.2	100	6753.025	6753.019	−0.9	89	6753.025	6753.021	−0.6	89
5		6757.037	0.9	100		6753.021	−0.6	89		6753.023	−0.3	100
10		6757.031	0.0	100		6753.023	−0.3	89		6753.025	0.0	100
20		6757.026	−0.7	100		6753.025	0.0	89		6753.034	1.3	100
50		6757.029	−0.3	100		6753.028	0.4	89		6753.033	1.2	100

質量の確認は，B社は最もイオン強度の高い第5アイソトープイオン，C社とD社はモノアイソトープイオンを使用

No reproduction or translation of articles in this journal without permission. Moreover, copy or reproduction without permission is prohibited except for exception under copyright laws.

量に対して2ppm以下であり，また，配列の70％以上をMS/MSスペクトルから確認できたこととなる．不純物の構造決定の閾値については現状では明確な指針はないが，今回の結果は汎用的LC/MSが構造決定に必要となる重要な情報を提供する試験法の一つとして十分な能力を有することを示唆すると考えられる．

4. 結論

本研究では，核酸医薬品の分析技術の現状・限界を把握する目的で，同一のモデルオリゴヌクレオチドを対象に四つの評価項目（第3項）について複数種の汎用的なLC-MSを用いて分離分析を行い、結果を比較することで下記の結論を得た．

1） IP-RPCモードによるLC/MSにて，ミポメルセン，ヌシネルセンの目的物と不純物の分離を4社で比較したところ，全ての主要不純物を完全分離できるデータはいずれからも得られなかった．一方で，N-3以上の欠損体同士のピーク分離度は概ねRs 1.5以上を示し，鎖長に応じた不純物の分離法として有用であることが確認できた．今後，更なる分離向上のためにIP-RPCでは，より長いカラムの選択，移動相に用いるアミンや酸の種類，濃度の検討が必要となる．また，親水性相互作用クロマトグラフィー（HILIC）などイオンペア試薬を用いない分離モードの適用可能性の検討が課題となる[4, 8, 9]．

2） LC/MSによる不純物の添加回収の評価においては，ミポメルセン，ヌシネルセンともに各社で共通した結果とはならず，不規則なイオン化抑制やイオン化促進が認められ，今後の検討課題として，移動相の調製法に起因する差異を排除するため，同一の組成を共通の手順で調製したうえで比較検討する必要がある．また，定量計算に用いる質量スペクトルのデータ抽出法やバックグラウンド減算の方法などの比較検討も必要となる．

3） 目的物の精密質量測定では，ミポメルセン，ヌシネルセンいずれにおいても各社から3ppm以内の確度でデコンボリューション後の質量が確認できた．また，MS/MS配列解析では半数以上でカバレージ100％を示し，最も低い場合でも94％であった．各社装置の適正な測定条件にてデータを取得し，それに適応したソフトウェアと組み合わせてデータ解析することにより，高い質の特性解析ができることが確認できた．これらの再現性を担保するため，今後，各社より評価法の標準的操作手順の文書化が望まれる．

4） 不純物の構造推定については，添加量0.1％以上で質量確度が2ppm以内，添加量1％以上でMS/MS配列カバレージが76％以上であった．この結果より，汎用的LC/MSにて，1％以上の不純物の組成を高い確度で推定できることが確認できた．今後は，MS/MS配列カバレージを更に高いレベルに上げるため，現行のCID以外の解離法の検討が期待される．

核酸医薬品の品質管理に関しては国内外で閾値設定の議論もあるが，前述のWPで提案されている閾値は主に分離・定量分析の技術的限界を考慮して設定されている．今回行った検討は緒言でも述べた通り，LC/MSの一般ユーザーが現実的に実施可能な条件を想定して行ったものであるが，LCだけでは主要不純物の完全分離を実現することが困難であった．つまり，特に目的物ピークに重なる不純物含量についてはMS定量の必要性が示された．MS解析においては質量確度と構造推定ではほぼ満足できる結果を与えた一方で，相対定量は再現性・回収率ともに十分とは言い難いものであった．この問題は，再現性・回収率に乏しい結果を招いた原因を追求することで解決できると期待される．今回の検討では各社の測定装置において適切であると考えられる分析条件をそれぞれ採用したことも，検出限界に近い微量分析での定量結果に影響を及ぼした可能性がある．各社の測定装置に固有の特性を踏まえ，今後，不純物含量が厳密に制御された同一性の高い試料を用い，移動相等の組成や調製方法まで統一した条件で解析を行うことが必要であろう．

加えて，今回採用した汎用法以外の新しい分析技術の積極的検討により，核酸医薬の分析技術の向上を図ることが重要と考える．例えば，上述したHILICのような分離モードの採用や，それを現行のIP-RPCと組合わせた2次元LCにより分離能は大幅に向上すると期待できる[10]．更には不純物分離の目

本誌掲載記事の無断転載・翻訳を禁止します．また，無断複写・複製は著作権法上の例外を除き禁止されています．

的では，気相中で衝突断面積の違いで分離するイオンモビリティースペクトロメトリーをMSと組み合わせる技術も注目を集めている[11]．不純物の相対定量については，施設間や分析者間，及び日間差の再現精度を向上させるため，解析ソフトウェアの機能改善並びに移動相調製等を自動化するロボットの導入などの技術革新が望まれる．MS/MS配列解析については，電子捕獲のエネルギーにより解離させるETD（Electron Transfer Dissociation）及びEAD（Electron Activated Dissociation）や紫外線照射により解離させるUVPD（Ultraviolet Photodissociation）を用いた実例が報告されており，今後の発展を推し進めるべきである[12, 13, 14]．

謝　辞

本研究は日本医療研究開発機構（AMED）医薬品等規制調和・評価研究事業「アンチセンス医薬品の品質及び安全性評価に関する研究」班（課題番号：JP19mk0101119），並びにAMED次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業「核酸医薬品の製造・精製・分析基盤技術の開発」班（課題番号：JP21ae0121022, JP21ae0121023, JP21ae0121024）の支援を受けて実施したものである．

おことわり

本稿の著者にPMDAの職員が含まれるが，PMDAの公式見解を示すものではない．

利益相反

全ての著者に開示すべき利益相反はない．

文　献

1）関口光明，伊藤浩介，齊藤隼，滝口直美，製薬協核酸医薬品質評価タスクフォース，吉田徳幸，小比賀聡，井上貴雄．核酸医薬品に含まれる不純物の管理に対する考え方．医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス．2020，**51**（1），p.11–21.

2）Capaldi, D.; Teasdale, A.; Henry, S.; Akhtar, N.; den Besten, C.; Gao-Sheridan, S.; Kretschmer, M.; Sharpe, N.; Andrews, B.; Burm, B.; Foy, J. Impurities in Oligonucleotide Drug Substances and Drug Products. *Nucleic Acid Ther*. 2017, **27**(6), p.309–322. doi: 10.1089/nat.2017.0691.

3）Gilar, M.; Neue, UD. Peak capacity in gradient reversed-phase liquid chromatography of biopolymers Theoretical and practical implications for the separation of oligonucleotides. *J. Chromatogr. A*. 2007, **1169**（1–2），p.139–150. doi: 10.1016/j.chroma.2007.09.005.

4）Hannauer, F.; Black, R.; Ray, AD.; Stulz, E.; Langley, GJ.; Holman, SW. Advancements in the characterisation of oligonucleotides by high performance liquid chromatography–mass spectrometry in 2021: A short review. *Analytical Science Advances*. 2022, **3**（3–4），p.90–102. doi.org/10.1002/ansa.202100066.

5）Pourshahian, S. Therapeutic oligonucleotides, impurities, degradants, and their characterization by mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev*. 2021, **40**（2），p.75–109. doi.org/10.1002/mas.21615.

6）McLuckey, SA.; Van Berkel, GJ.; Glish, GL. Tandem mass spectrometry of small, multiply charged oligonucleotides. *J. Am. Soc. Mass Spectrom*. 1992, **3**（1），p.60–70. doi: 10.1016/1044-0305（92）85019-G.

7）Santos, IC.; Brodbelt, JS. Recent developments in the characterization of nucleic acids by liquid chromatography, capillary electrophoresis, ion mobility, and mass spectrometry（2010–2020）. *J. Sep. Sci*. 2021, **44**（1），p.340–372. doi: 10.1002/jssc.202000833.

8）Lobue, PA.; Jora, M.; Addepalli, B.; Limbach, PA. Oligonucleotide analysis by hydrophilic interaction liquid chromatography–mass spectrometry in the absence of ion-pair reagents. *J. Chromatogr. A*. 2019, **1595**, p.39–48. doi: 10.1016/j.chroma.2019.02.016.

9）Huang, M.; Xu, X.; Qiu, H.; Li, N. Analytical characterization of DNA and RNA oligonucleotides by hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*. 2021, **1648**, 462184. doi: 10.1016/j.chroma.2021.462184.

10）Roussis, SG.; Cedillo, I.; Rentel, C. Two-dimensional liquid chromatography–mass spectrometry for the characterization of modified oligonucleotide impurities. *Anal Biochem*. 2018, **556**, p.45–52. doi: 10.1016/j.ab.2018.06.019.

11）Omuro, S.; Yamaguchi, T.; Kawase, T.; Terasaki, M.; Hirose, K.; Obika, S. Physicochemical property evaluation of modified oligonucleotides by traveling-wave ion mobility mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2022, **36**（10），e9279. doi: 10.1002/rcm.9279.

12）Smith, SI.; Brodbelt, JS. Electron Transfer Dissociation of Oligonucleotide Cations. *Int J Mass Spectrom*. 2009, **283**（1–3），p.85–93.doi: 10.1016/j.ijms.2009.02.012.

13）Karasawa, K.; Duchoslav, E.; Baba, T. Fast Electron Detachment Dissociation of Oligonucleotides in Electron–Nitrogen Plasma Stored in Magneto Radio-Frequency Ion Traps. *Anal Chem*. 2022, **94**（44），p.15510–15517. doi: 10.1021/acs.analchem.2c04027.

14）Santos, IC.; Lanzillotti, M.; Shilov, I.; Basanta-Sanchez,

No reproduction or translation of articles in this journal without permission. Moreover, copy or reproduction without permission is prohibited except for exception under copyright laws.

M.; Roushan, A.; Lawler, R.; Tang, W.; Bern, M.; Brodbelt, JS. Ultraviolet Photodissociation and Activated Electron Photodetachment Mass Spectrometry for Top-Down Sequencing of Modified Oligoribonucleotides. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2022, **33** (3), p.510-520. doi: 10.1021/jasms.1c00340.

本誌掲載記事の無断転載・翻訳を禁止します．また，無断複写・複製は著作権法上の例外を除き禁止されています．