

複数種の液体クロマトグラフ質量分析計を用いたオリゴヌクレオチド不純物の相対定量の比較解析

高嶺 竜太郎^{*1}, 山口 卓男^{*1}, 廣瀬 賢治^{*2}, 関口 光明^{*3}, 唐澤 薫^{*4}, 岩崎 了教^{*4},
高原 健太郎^{*5}, 瀬崎 浩史^{*6}, 早川 禎宏^{*7}, 騰川 博之^{*8}, 大久保 貴史^{*8}, 長野 裕夫^{*9},
櫻井 周^{*10}, 寄本 捺愛^{*11}, 富田 恵麗沙^{*11}, 吉田 徳幸^{*12}, 井上 貴雄^{*12}, 小比賀 聡^{*1},
川上 純司^{*11, *13}

(受付: 令和7年10月29日, 受理: 令和8年3月2日)

A Comparative Study on the Relative Quantification of Oligonucleotide Impurities Using Several Different Types of Liquid Chromatography-Mass Spectrometers at Analytical Facilities of Multiple Institutions

Ryutaro TAKAMINE^{*1}, Takao YAMAGUCHI^{*1}, Kenji HIROSE^{*2}, Mitsuaki SEKIGUCHI^{*3},
Kaoru KARASAWA^{*4}, Noriyuki IWASAKI^{*4}, Kentaro TAKAHARA^{*5}, Hiroshi SEZAKI^{*6},
Yoshihiro HAYAKAWA^{*7}, Hiroyuki TOGAWA^{*8}, Takashi OKUBO^{*8}, Hiroo NAGANO^{*9},
Amane SAKURAI^{*10}, Nae SAKIMOTO^{*11}, Elisa TOMITA-SUDO^{*11}, Tokuyuki YOSHIDA^{*12},
Takao INOUE^{*12}, Satoshi OBIKA^{*1} and Junji KAWAKAMI^{*11, *13}

- *1 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, The University of Osaka, 1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan
- *2 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-ku, Tokyo 140-0001, Japan
- *3 塩野義製薬株式会社 大阪府豊中市二葉町3丁目1-1 (〒561-0825)
Shionogi & Co., Ltd., 3-1-1 Futaba-cho, Toyonaka, Osaka 561-0825, 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)
SCIEX, Gotenyama Trust Tower 21F, 4-7-35 Kitashinagawa, Shinagawa-ku, Tokyo 140-0001, Japan
- *5 サーマ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 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9-1 (〒192-8510)
Agilent Technologies Japan, Ltd., 9-1 Takakura-machi, Hachioji-shi, Tokyo 192-8510, Japan
- *7 株式会社島津製作所 京都市中京区西ノ京桑原町1番地 (〒604-8511)
Shimadzu Corporation, 1 Nishinokyo Kuwabara-cho, Nakagyo-ku, Kyoto 604-8511, Japan
- *8 一般財団法人化学物質評価研究機構 大分県日田市石井町3-822 (〒877-0061)
Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan (CERI), 3-822 Ishii-machi, Hita-shi, Oita 877-0061, Japan
- *9 株式会社住化分析センター 大阪府大阪市中央区高麗橋4-6-17 (〒541-0043)
Sumika Chemical Analysis Service, Ltd., 4-6-17 Koraibashi, Chuo-ku, Osaka 541-0043, Japan
- *10 株式会社東レリサーチセンター 神奈川県鎌倉市手広6-10-1 (〒248-0036)
Toray Research Center, Inc., 6-10-1 Tebiro, Kamakura, Kanagawa 248-0036, Japan
- *11 甲南大学 核酸医薬研究所 (KOLOT) 兵庫県神戸市中央区港島南町7-1-20 (〒650-0047)
Konan Laboratory for Oligonucleotide Therapeutics (KOLOT), 7-1-20 Minatojima-minamimachi, Chuo-ku, Kobe, Hyogo 650-0047, Japan
- *12 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
- *13 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

Summary

Oligonucleotide therapeutics, including antisense oligonucleotides and small interfering RNAs, are promising modalities for treating intractable diseases. Their development, however, is complicated by the presence of product-related impurities with similar physicochemical properties to the desired product, that may persist after purification. Therefore, accurate structural characterization and quantification of these impurities are crucial, and liquid chromatography-mass spectrometry (LC/MS) has become a central tool for impurity profiling. In our previous multi-institutional study assessing the practical limits of relative quantification, we observed substantial inconsistencies in LC/MS data across systems and institutions, mainly due to non-standardized protocols. The present study aimed to ameliorate these issues by introducing standardized conditions.

Specifically, we standardized mobile-phase preparation, analytical protocols, and data-processing methods, and conducted a comparative evaluation across nine institutions and eleven LC/MS systems. Model oligonucleotides were spiked with one-or three-nucleotide deletion impurities at relative amounts of 0.05-10% (w/w) and analyzed using both flow injection analysis (FIA) and LC/MS.

Chromatographic separation effectively mitigated matrix effects, even when peaks were not fully resolved, thereby lowering detection limits and improving quantification compared with FIA. At impurity levels above 1.0%, recoveries converged across all sequences, reaching $100 \pm 50\%$ with relative standard deviations of $\leq 21\%$, indicating markedly improved reproducibility over our previous study. In contrast, accuracy and precision at or below 0.20% did not meet thresholds proposed by the Oligonucleotide Safety Working Group, although accurate mass identification remained feasible. Quantitative accuracy was further compromised by multivalent ion overlap or when impurities differed from the product by only 1 Da.

Overall, this study demonstrates that LC/MS with standardized protocols enables reliable quantification of impurities at levels above 1.0%, while highlighting the limitations of relative quantification at lower levels. However, in the low-level impurity region at or below 0.20%, sufficient accuracy and precision cannot be attained by relative quantification alone. The introduction of absolute quantification using authentic reference standards, as well as careful consideration of sequence-dependent spectral characteristics, will be essential for accurate impurity assessment in this low-concentration range.

Key words

Oligonucleotide therapeutics, Relative quantification, Impurity, Liquid chromatography, Mass spectrometry, Co-elution

1. 緒言

アンチセンス医薬やsiRNA医薬に代表される核酸医薬は、これまでに治療法のなかった疾患に対する新たな創薬モダリティとして注目されている。オリゴヌクレオチドを基本骨格とする核酸医薬の製造は、一般的に固相上にて逐次的にアミダイト体（モノマー）を連結するホスホロアミダイト法によって行われる。ホスホロアミダイト法では、モノマーの連結反応が目的の塩基長に達するまで精製されず、連結反応が終了した後に固相からの切り出し反応を行う。固相から切り出されたオリゴヌクレオチド

は、主に液体クロマトグラフィー（LC）により精製されるが、ヌクレオチド欠損体（目的物質からヌクレオチドが一部欠損したオリゴヌクレオチド）等の目的物質由来不純物の多くは、有効成分であるオリゴヌクレオチドと物理化学的性質が類似しているため、一部の不純物は除去されずに原薬中に残存する。そのため、これらのオリゴヌクレオチド不純物をどのように特定・評価・管理し、原薬の品質を担保するかが、核酸医薬の品質評価において重要な考慮事項となる。

核酸医薬の品質評価の手法としては、低分子医薬や抗体医薬と同様に、LCと紫外可視分光（UV）検

出もしくはLCと質量分析計（MS）検出を組み合わせたLC/UV, LC/MSが中心的に用いられている。LC/UVは、以前から医薬品分析に汎用的に用いられており、目的物質と不純物をクロマトグラム上で分離させ、ピーク面積から不純物含有量を定量することができる。この手法は、核酸医薬においてもピーク分離できる不純物を定量する際には有効であるが、目的物質と構造が類似した目的物質由来不純物については、スループット性を重視した汎用的なLC条件では目的物質とピーク分離できず、定量が難しい場合が多い¹⁾。一方、MSを検出器として利用するLC/MSについては、質量差により目的物質と不純物の識別が可能となるため、得られた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（EIC）のピーク面積から、目的物質及び不純物の含有量を便宜的に算出することが可能である。

開発初期段階においては、オリゴヌクレオチド不純物の構造が明らかではない、あるいは明らかであっても十分量の標準品を合成することが困難な場合がある。このような状況では、標準品を用いることなく、目的物質及び不純物の質量スペクトルのイオン強度やEICのピーク面積の相対比から、定量対象となる不純物の相対量を算出する手法（相対定量法）が不純物の量を概算する手法として有用である。しかしながら、オリゴヌクレオチドのLC/MSでは、一般的に得られる質量スペクトルが多価イオンとして検出され、かつ価数分布が配列や分析条件に依存する²⁾。加えて、目的物質と不純物のイオン化効率が異なる場合が多い^{3, 4)}。そのため、オリゴヌクレオチドの定量的な品質評価を行うにあたっては、上記のMS測定の特性を考慮して解析することが望まれる。

以上の特性について装置間の違いを実験的に検証するため、我々は先行研究において、目的物質（オリゴヌクレオチド）とその不純物（ヌクレオチド欠損体：欠損部位の異なる複数の配列）のモデルを4機関・4種のLC/MS装置で比較解析し、その分離や相対定量等について以下の知見を得た⁵⁾。

- ① イオンペア逆相クロマトグラフィー（IPRP-LC）を用いた目的物質と不純物との分離検討では、いずれの分析装置でも、目的物質と1塩基欠損体（N-1体）の完全分離は、ほとんどのN-1体について困難であったが、3塩基欠損体（N-3

体）については概ね完全分離された。

- ② 目的物質に不純物を一定の割合でスパイクした試料についてLC/MS解析を行った結果、不純物の相対定量値が分析機関・機種間で比較的大きくばらついた。
- ③ 目的物質の精密質量測定では、装置間で異なる価数分布のスペクトルが得られたものの、デコンボリューション処理後は全ての分析装置で3 ppm以内の精度で目的質量が確認できた。また、MS/MSを用いた配列解析では精度良く目的物質の配列解析が可能であった。
- ④ 不純物の構造推定においては、いずれの分析装置についても、スパイクした不純物が0.1%以上では質量精度が2 ppm以内で分析可能であった。

以上の検討より、目的物質と不純物の分離（①）、目的物質の精密質量測定（③）及び不純物の構造推定（④）については、分析装置間で概ね同等の解析結果が得られるが、不純物の相対定量（②）については、装置間での解析結果がばらつくことが明確化した。この差異が装置に固有の特性に起因するものか、あるいは、移動相の調製方法の違いなど他の要因によるものかは明らかでなく、新たな検討課題となった。

そこで本研究では、LC/MSによるオリゴヌクレオチド不純物の相対定量解析において先行研究で観察された差異の要因を明らかにすることを目的に、移動相の組成や調製手順を統一した条件下で測定し、検討を行った。また、定量計算に用いるスペクトルデータの抽出法の差異やバックグラウンド減算法に関する検証を行った。

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Mipomersen, Inotersen及びNusinersenと同一の化学構造を有するオリゴヌクレオチドを用いた（以下、目的物質合成品）（Table 1: 目的物質配列）。したがって、医薬品として用いられているMipomersen, Inotersen及びNusinersenそのものを解析したわけではないが、以降では簡便のため、解析に用いたオリゴヌクレオ

Table 1 本研究に用いたモデル核酸医薬品

	Mipomersen	Inotersen	Nusinersen
分類	RNA 分解型	RNA 分解型	スプライシング制御型
塩基長	20 mer	20 mer	18 mer
目的物質配列	5'-GCCTCAGTCTGCTTCGCACC-3'	5'-TCTTGGTTACATGAAATCCC-3'	5'-TCACTTTCATAATGCTGG-3'
N-1 体配列	5'-CCTCAGTCTGCTTCGCACC-3'	5'-CTTGGTTACATGAAATCCC-3'	5'-CACTTTCATAATGCTGG-3'
N-3 体配列	5'-TCAGTCTGCTTCGCACC-3'	5'-TGGTTACATGAAATCCC-3'	5'-CTTTCATAATGCTGG-3'
修飾	2'-MOE, ホスホロチオアート修飾	2'-MOE, ホスホロチオアート修飾	2'-MOE, ホスホロチオアート修飾

* [配列] N : DNA (C=5-methylcytosine), N : 2'-MOE RNA (C=5-methylcytosine), リン酸骨格部は全てホスホロチオアート修飾.

チドを Mipomersen, Inotersen 及び Nusinersen と記載する. Mipomersen 及び Inotersen は, 配列両端の各5塩基に 2'-O-methoxyethyl (2'-MOE) 修飾を導入した20塩基長の gapmer 型アンチセンス核酸であり, 両者は配列のみが異なる. Nusinersen は全長を 2'-MOE で修飾した18塩基長のアンチセンス核酸である. これらのモデル核酸医薬品はいずれも, 全てのリン酸ジエステル結合部の一つの酸素原子 (O) が硫黄原子 (S) に置換された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. 本検討に用いる不純物として, 5'側の N-1 体及び N-3 体を, それぞれ合成した (Table 1: N-1 配列及び N-3 配列). なお, いずれの合成品も LC/UV 純度は 95% 以上であった.

2.2 分析装置及びソフトウェア

本研究で用いた分析装置と解析ソフトウェア, 及び解析方法を Table 2 にまとめた.

2.3 分析機関

本研究において分析を担当した機関は, AMED 次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業における「核酸医薬品実用化のための製造及び分析基盤技術開発」研究班 (研究代表 小比賀聡) に参画する分析機器メーカーや医薬品開発業務受託機関 (CRO) を中心とする 8 機関である (Table 3: 分析機関 A~H). 各分析機関では, 上述した Mipomersen, Inotersen, Nusinersen のうち, 2 検体あるいは 3 検体についてそれぞれ分析を行った (Table 3: 分析検体). なお, 試験実施者の手技の違いの影響を排除するため, 本研究班が設置した「核

Table 2 分析装置及び解析ソフトウェア一覧

メーカー	LC	MS	解析ソフトウェア	解析方法
Agilent Technologies	1290 Infinity II LC	6545XT AdvanceBio LC/ Q-TOF	BioConfirm	(i)
Shimadzu	Prominence UFLC XR Nexera XS Nexera XR	LCMS-9030	LabSolutions Insight Biologics	(i)
SCIEX	—	TripleTOF 6600+ system	SCIEX OS	(i)
Thermo Fisher Scientific	Vanquish Flex UHPLC	Orbitrap Exploris 120 MS Orbitrap Fusion Lumos Tribid MS Orbitrap Eclipse Tribid MS	BioPharma Finder	(ii)
Waters	ACQUITY UPLC H-class Bio Plus	Xevo G2-XS QTof	INTACT Mass MaxEnt1	(ii) (ii)

(i) 関連する多価イオンを全て合算した EIC のピーク面積 (ただし, 重なっているイオンは排除して解析)

(ii) 各種ソフトウェアでデコンボリューションして得られたスペクトルのイオン強度

Table 3 分析機関一覧

識別番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
分析機関	A	B	C	D	E	F	G	H	H	H	H
分析装置 (MS・解析ソフトウェア)	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k
解析方法	(i)	(i)	(i)	(ii)	(ii)	(ii)	(ii)	(i)	(i)	(i)	(ii)
分析検体	M, I	M, N	M, I	M, N	M, I, N	I, N	I, N	M, I, N	M, I, N	M, I, N	M, I, N

(i) 関連する多価イオンを全て合算したEICのピーク面積（ただし、重なっているイオンは排除して解析）

(ii) 各種ソフトウェアでデコンボリューションして得られたスペクトルのイオン強度

M: Mipomersen, I: Inotersen, N: Nusinersen

なお、識別番号8は1と、9は2と、10は3と、11は5と同一のMS機種を用いているが、機体が異なるため別装置として取り扱う。

酸医薬分析技術拠点（大阪大学吹田キャンパス内）」において、同一試験者による分析も同時に実施している（Table 3：分析機関H，識別番号8-11）。核酸医薬分析技術拠点にはAgilent Technologies, Shimadzu, SCIEX, Watersの分析装置が設置されており、これらの装置を用いて、同一検体を同時期に同一試験者が分析した。

2.4 LCの移動相の調製

市販のLCグレードあるいはLC/MSグレードのメタノール、トリエチルアミン、1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロ-2-プロパノール（HFIP）を用いて調製した。先行研究の結果から、移動相組成や調製方法のわずかな違いがMS感度などに影響することが考えられたため、試薬・手技による差が生じないように、調製手順や定容方法などを統一した詳細なプロトコルを作成し、各機関に配布した。LC/MSに用いた移動相は、移動相A、Bの二種類であり、移動相Aは10 mmol/Lトリエチルアミン/100 mmol/L HFIP水溶液、移動相Bは移動相Aとメタノールの1:1混液（v/v）である。なお、トリエチルアミンなどのイオンペア試薬が含まれる移動相では、調製後からの劣化が早く、MSの感度に違いが生じることが広く知られている。そのため、移動相の調製については、各分析機関で統一した調製手順にて用時調製することにした。具体的には、LC用メディウム瓶に148.2 mLの超純水を入れ、1.56 mLのLC用HFIP、209.2 μ LのLC/MS用トリエチルアミンを添加し、よく混和させたものを移動相Aとした。調製した移動相AとLC/MS用メタノールを1:1（v/v）で混和させたものを移動相Bとした。

2.5 分析サンプルの調製

各目的物質合成品0.1 mgにN-1体及びN-3体合成品を一定割合（0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.50, 1.0, 1.5, 2.0, 5.0, 10.0% w/w）で添加した溶液を調製し、分注後に凍結乾燥させた。本作業は甲南大学において一括して実施した。各分析機関に分配した凍結乾燥サンプルは、その後、後述の移動相Aを用いて各分析機関で希釈し、分析に用いた。

2.6 分析条件

カラムについては、オリゴヌクレオチド分析で最もよく使用されているカラム長50~100 mmのオクタデシルシリル基（ODS）を官能基として有するODSカラムを使用した（ODSカラムの種類は各分析機関・装置の間で統一していない）。移動相の流速、カラム温度、分析サンプル中の目的物質の濃度及び注入量は、各分析機関・装置で最適と考えられる条件を使用した。カラム分離を行わないフローインジェクション分析法（FIA：flow injection analysis）では、ODSカラムは装着せず、移動相A及び移動相Bを50%ずつ送液するアイソクラティック条件で分析した。LC/MS及びFIAでは、各不純物含量につき繰り返し3回分析し、不純物の相対定量について評価した。MS分析については、ネガティブモードのエレクトロスプレーイオン化（ESI：electrospray ionization）法によりイオン化したオリゴヌクレオチドをMS測定した。キャピラリー電圧などの装置の各種パラメーターについては、各分析機関・装置において最適と考えられるパラメーターを使用した（Table 4）。

Table 4 分析条件一覧

識別番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
移動相 A	10 mM TEA, 100 mM HFIP										
移動相 B	10 mM TEA, 100 mM HFIP/Methanol (1 : 1 (v/v))										
カラム	カラム内径2.1 mm, カラム長50-100 mm ODS カラム (任意条件)										
カラム温度	任意条件										
目的物質濃度 (μg/mL)	1000	5	50	20	10	100	100	50	10	50	10
注入液量 (μL)	1	2	1	2	2	1	1	1	1	1	2
カラムロード量 (ng)	1000	10	50	40	20	100	100	50	10	50	20
流速	任意条件										
グラジエント	任意条件										
MSモード	ネガティブモード										
MS条件	任意条件 (各分析機関・装置の最適条件)										

3. 結果

3.1 分析条件の設定

先行研究で見られた定量性の差異が分析条件の違いに起因するかを明らかにすることを目的として、各分析機関・装置において同程度のピーク分離が得られるLC条件の設定を行った。一般に、LCで分離されていない不純物の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、移動相に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、その定量結果に影響する現象として知られている。そこで本検討では、マトリックス効果が相対定量に与える影響を複数種のLC/MS装置で比較・検証するために、N-1体が目的物質と共溶出し、N-3体が完全に分離するLC条件を探索した。各分析機関にて移動相のグラジエント条件を調整したところ、いずれの分析機関・装置を使用した場合においても、N-1体が目的物質と共溶出し、かつ、N-3体が目的物質と完全分離する条件を設定することができた。Fig. 1にその代表的なクロマトグラムを示す。以降の解析では、本分離条件を用いて、MS相対定量に関する検証を実施した。また、完全に共溶出した場合を模した比較対象として、別途FIAによる相対定量もあわせて実施した。

3.2 オリゴヌクレオチド不純物分析におけるマトリックス効果の検証

まず、MSスペクトルのデコンボリューションで得られたイオン強度又は関連する多価イオンのEICのピーク面積から、目的物質に対する不純物の含有率を算出した(式1)。これらの値を一定割合の不純物添加率(2.5分析サンプルの調製の項を参照)で除することにより、添加回収率を求めた。得られた添加回収率をもとにヒートマップを作成した(Figs. 2~4)。なお、いずれの分析検体においても目的物質合成品自体に対象の不純物を最大1.0%程度認めたため、これらをバックグラウンドとして減算して回収率を算出した(式2)。

$$\text{不純物含有率 (\%)} = \frac{\text{不純物のイオン強度又はEIC面積}}{\text{目的物質のMSイオン強度又はEIC面積}} \times 100 \quad (\text{式1})$$

$$\text{添加回収率 (\%)} = \frac{\text{検体の不純物含有率 (\%)} - \text{目的物質合成品の不純物含有率 (\%)}}{\text{一定割合の不純物添加率 (\%)}} \times 100 \quad (\text{式2})$$

ヒートマップでは、Ionis社による先行文献⁶⁾に基づき、回収率 $100 \pm 25\%$ をイオン化促進・抑制の判定基準とした。具体的には、回収率が75%未満の場合を「イオン化抑制」として青色、125%を超える場合を「イオン化促進」として赤色で示し、その程度に応じて色の濃淡で視覚的に表現した。白色の領域は、回収率が $100 \pm 25\%$ の範囲にあり、マトリックス効果の影響が低いことを示す。なお、不純物が

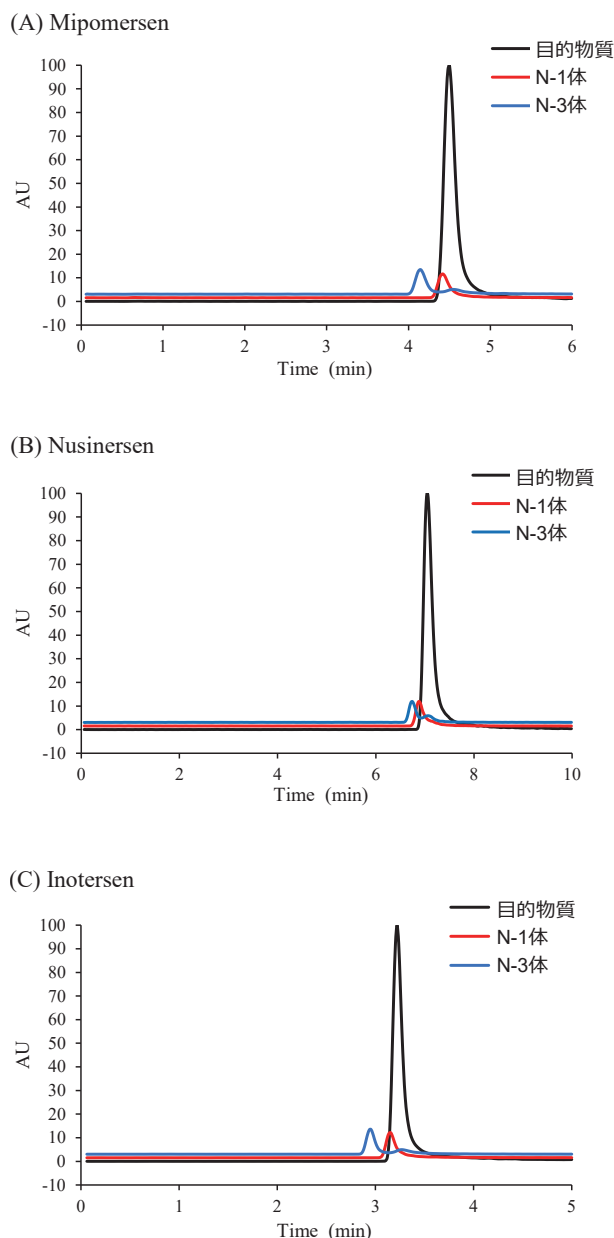


Fig. 1 目的物質及び不純物（添加量 10.0%）の抽出イオンクロマトグラム

識別番号9で分析されたクロマトグラムを示す。

検出されなかった場合は灰色で示した。また、識別番号8～11は分析機関を統一しており、試験者による影響を排除して評価するために設定したものである。これらはいずれも他の識別番号と同一機種を使用しており、識別番号8は1と、9は2と、10は3と、11は5と同一のMS機種を用いて分析が行われた。

MipomersenのN-1体に関するLC/MS分析において、添加量1.0%以上の測定含量域における回収率が $100 \pm 25\%$ の範囲に収まった分析数（白色で示

す）は、先行研究⁵⁾では16分析中6分析（Fig. 2A）であったのに対し、本検証では45分析中36分析（Fig. 2B）であった。同様に、Nusinersenにおいても、先行研究では16分析中8分析（Fig. 3A）であったのに対し、本検証では45分析中37分析（Fig. 3B）であった。これらの結果から、添加量1.0%以上の含量域において、移動相組成や調製方法などの分析条件及びデータ解析方法（式2）を統一したことにより、過半数の分析結果で回収率が $100 \pm 25\%$ を示し、先行研究と比較して定量結果のばらつきが低減され、より良好な定量性が得られたと考えられる。しかしながら、添加量1.0%未満の測定含量域においては、分析機関及び装置の組み合わせによって定量結果にばらつきが認められた。不純物の精密質量については、0.1%以上の添加含量であっても、大半の分析機関・装置で検出できたことから、定量結果にばらつきがあっても、不純物の定性分析は可能であることが示された。

更に、分析機関を統一しても、使用装置の違いによる定量結果のばらつきは改善されなかった（Figs. 2～4、識別番号8～11）。同一機種の識別番号1と8の結果を比較すると、識別番号1ではMipomersen及びInotersenにおいて多くの含量域で顕著なイオン化促進が観察されたのに対し、識別番号8ではその傾向はみられなかった（Figs. 2, 4、識別番号1及び8）。両者とも同一機種及び移動相組成を使用していたにもかかわらず定量結果に差異が生じたことから、カラムへのロード量の差が影響している可能性が示唆された。ESIを用いたMS分析においては、ロード量の増加によりイオン生成が飽和し、定量精度が低下することが知られている⁶⁾。実際、識別番号1では目的物質を $1 \mu\text{g}$ 注入しており（Table 3）、イオン化の飽和により目的物質のイオン強度が相対的に抑制され、不純物のシグナルが強調されたことで、相対的なイオン化促進が顕著となったと考えられる。一方、識別番号8では注入量を50 ngとすることで、イオン化の飽和を回避し、より適切な回収率が得られた。そのほかの異なる機関の同機種間の比較（識別番号9及び2、10及び3、11及び5）においては、同量の注入量で分析されていたため、分析機関間で顕著な差は認められなかった（Figs. 2～4）。以上より、LC/MSによるオリゴヌクレオチド不純物の定量においては、カラムへのロード量が

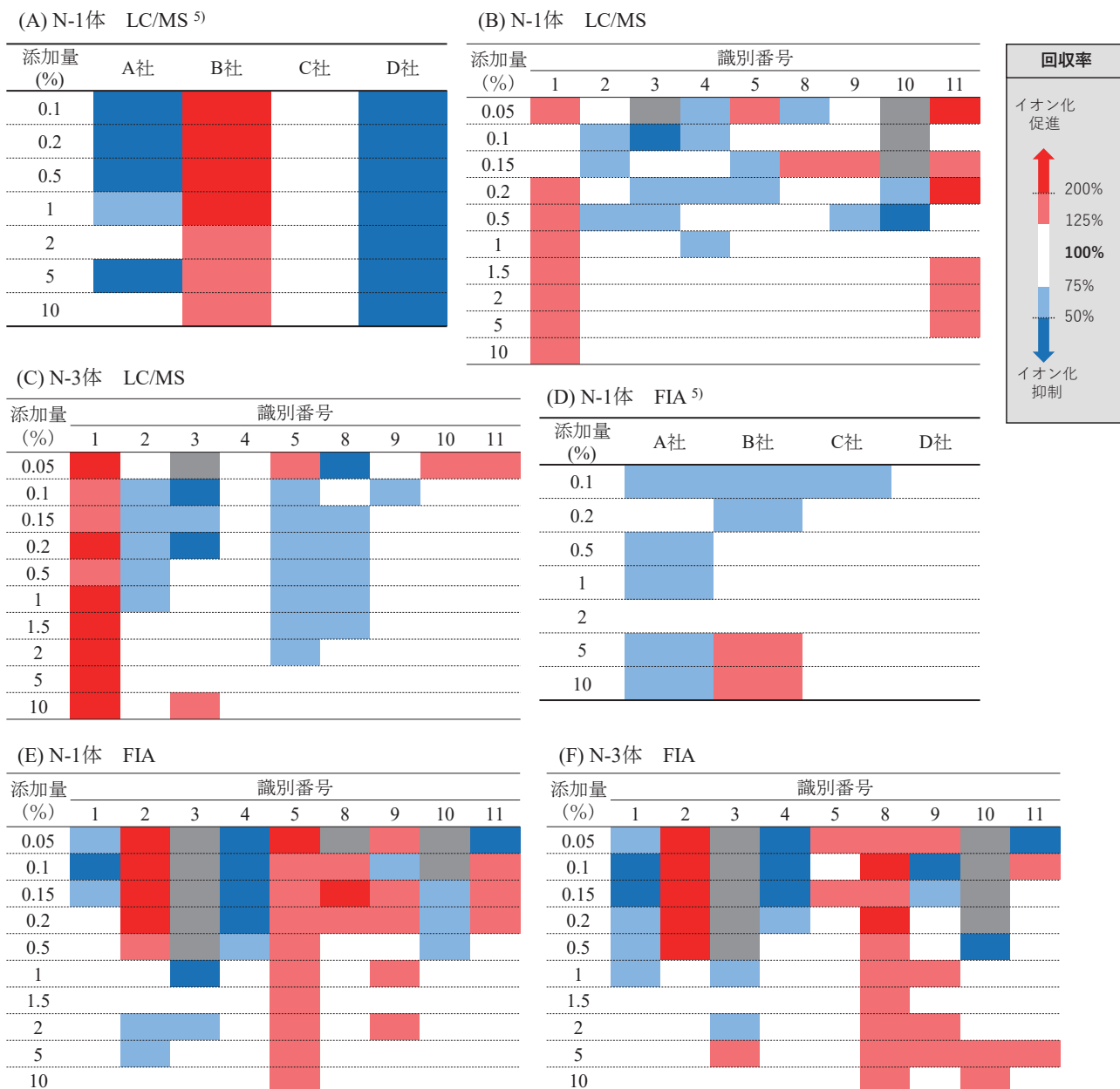


Fig. 2 Mipomersen不純物相対定量における添加回収率のヒートマップ

(A) 先行研究⁵⁾のN-1体のLC/MS (B) N-1体のLC/MS (C) N-3体のLC/MS (D) 先行研究⁵⁾のN-1体のFIA (E) N-1体のFIA (F) N-3体のFIAの結果を示す。Ionis社の報告⁶⁾を参考に100±25%をイオン化抑制・促進の基準として評価している。(A)と(D)は先行研究⁵⁾の結果を元に作成した。

定量精度に大きく影響する因子であり、装置ごとに適切な注入量の設定が重要であることが示された。

LC/MSとFIAを比較した結果、いずれの分析機関・装置及び配列においても、LC/MSを用いた方が未検出(灰色で示す)のデータが減少する傾向が確認された(Figs. 2~4)。特にNusinersenにおいて、最小添加含量である0.05%における検出結果に顕著な差がみられた。FIA分析では、共溶出によるマトリックス効果の影響により、N-1体では9分析

中3分析が未検出、N-3体では8分析が未検出であった(Figs. 3E, 3F)。一方、LC/MSでは、共溶出するN-1体及び分離可能なN-3体は9分析中8分析で検出が可能であった(Figs. 3B, 3C)。N-1体及びN-3体のLC/MSにおいて、目的物質と共溶出するN-1体ではマトリックス効果の影響により定量性が低下することが予想されたが、実際にはN-3体と比較しても大きな差は観察されなかった(Figs. 2B, 2C, 3B, 3C, 4A, 4B)。N-1体のEICに注目する

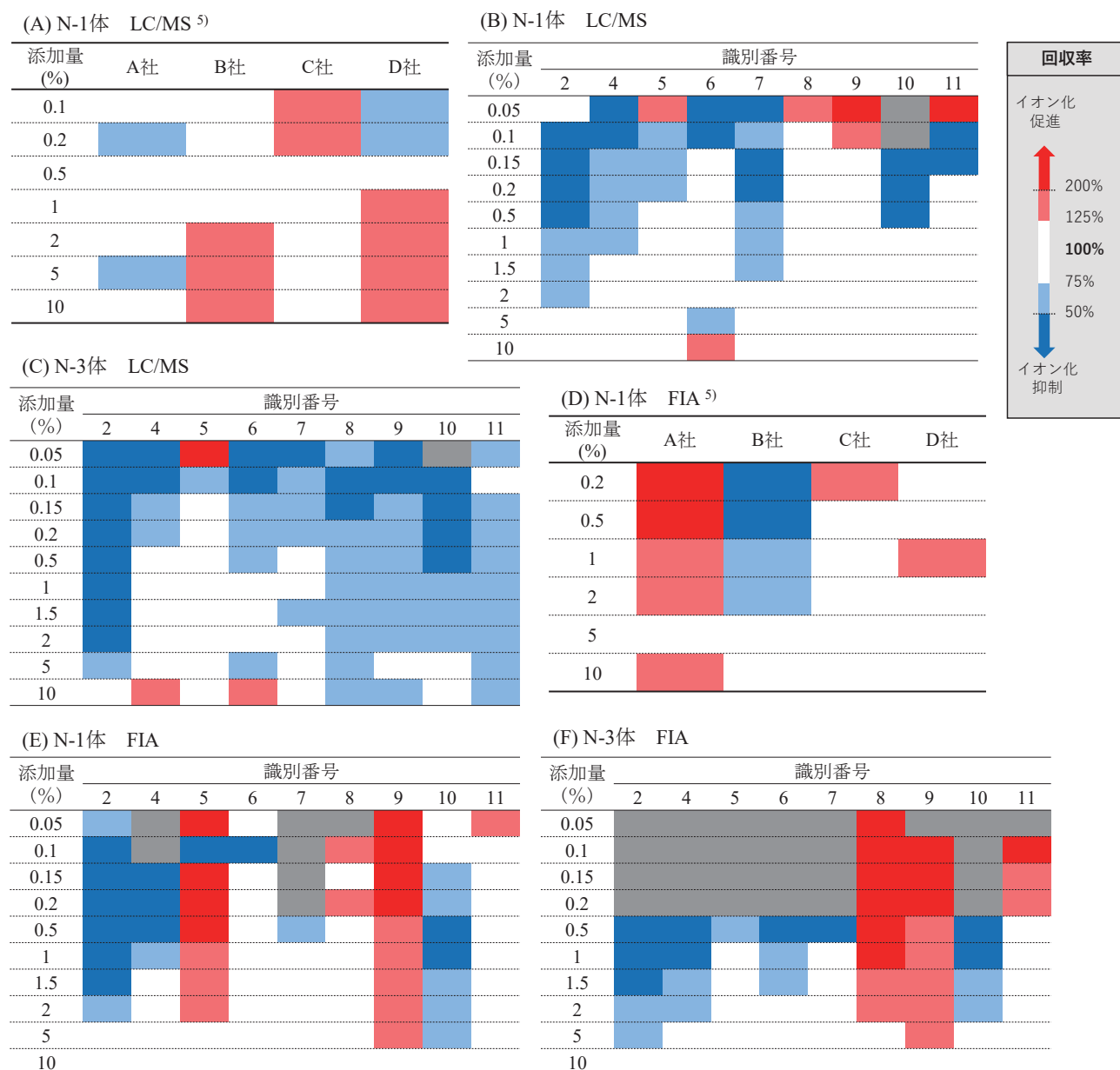


Fig. 3 Nusinersen不純物相対定量における添加回収率のヒートマップ

(A) 先行研究⁵⁾のN-1体のLC/MS (B) N-1体のLC/MS (C) N-3体のLC/MS (D) 先行研究⁵⁾のN-1体のFIA (E) N-1体のFIA (F) N-3体のFIAの結果を示す。Ionis社の報告⁶⁾を参考に100±25%をイオン化抑制・促進の基準として評価している。(A)と(D)は先行研究⁵⁾の結果を元に作成した。

と、目的物質と完全な共溶出ではなく、保持時間のわずかに早まっていることがわかる (Fig. 1)。このわずかな保持の違いにより、マトリックス効果が緩和され、共溶出しているにもかかわらず定量が可能となったと考えられる。一方、FIAでは目的物質と不純物のピークトップが完全に一致していた (data not shown)。このため、マトリックス効果が顕著に発現し、定量性及び検出感度に大きな影響を与えたと推察される。以上の結果から、不純物と完全に

分離できない場合であっても、LC/MSにおいてカラム分離を介することでマトリックス効果を軽減でき、相対定量法における定量性向上に寄与することが示唆された。

3.3 MSを用いたオリゴヌクレオチド不純物の相対定量方法の妥当性評価

3.3.1 直線性

一般的に、医薬品開発に用いられる分析方法は

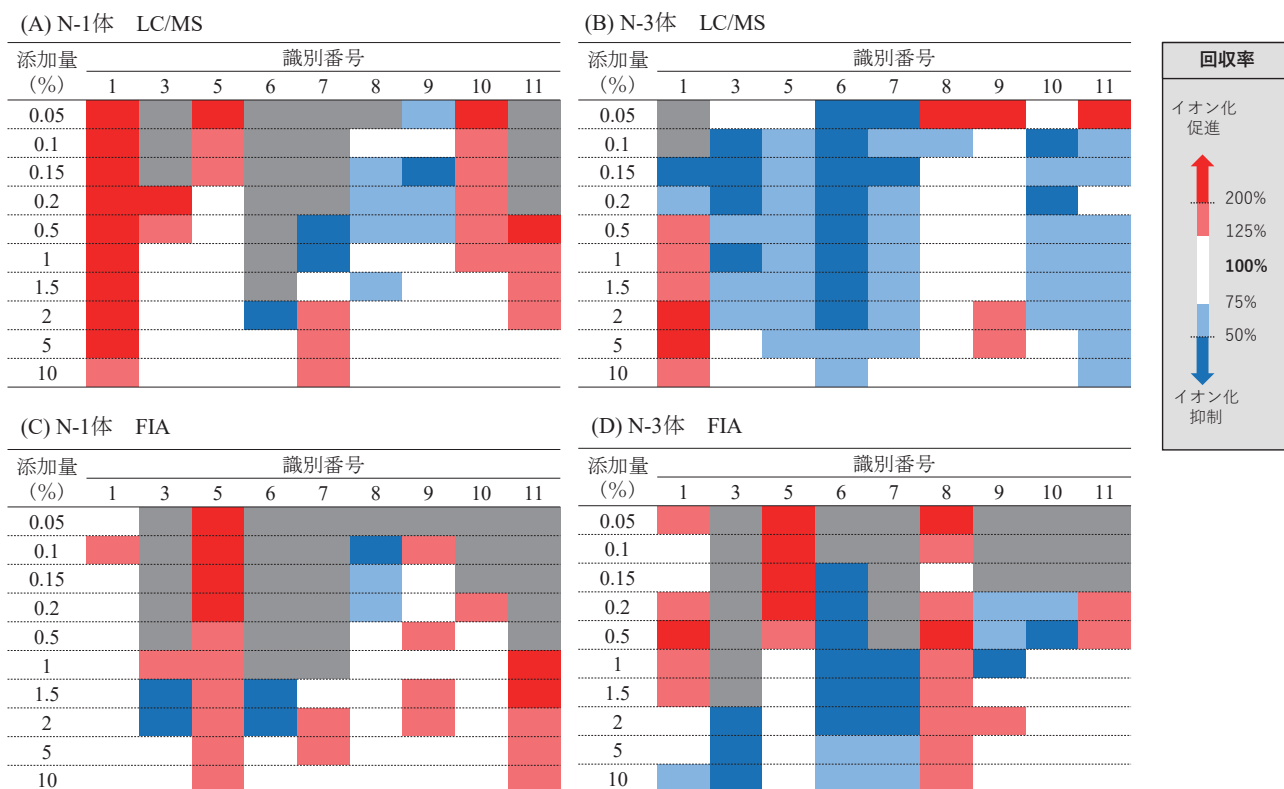


Fig. 4 Inotersen不純物相対定量における添加回収率のヒートマップ

(A) N-1体のLC/MS (B) N-3体のLC/MS (C) N-1体のFIA (D) N-3体のFIAの結果を示す。Ionis社の報告⁶⁾を参考に100±25%をイオン化抑制・促進の基準として評価している。

ICH Q2ガイドライン⁷⁾に従って分析方法のバリデーションを実施し、その妥当性が評価される。その中で、類縁物質を評価する純度試験では、求められる要件の一つとして目的物質又は不純物のレスポンスに対する直線性の検証が挙げられている。そこで本節では、前節の添加回収試験においてLC/MS分析及びFIAの各分析条件から得られた不純物ピークのMSスペクトルのイオン強度又はEIC面積を基に検量線を作成し、各装置の直線性について検証した。

測定範囲の広い検量線を作成する際には、低含量側の測定のばらつきにより直線性が損なわれることが多いため、重みづけした検量線を用いて直線性を評価することが認められている⁸⁾。また、LC/MSを用いた核酸医薬品バイオアナリシス法の分析法バリデーションにおいても、含量(x)の重みづけ(1/x²)をした検量線を作成し、直線性を評価することが多い⁹⁾。これらの報告に基づき、本節においても各検体の不純物のMSレスポンスから含量の重みづけ(1/x²)をした検量線を作成(Fig. 5)し、その相

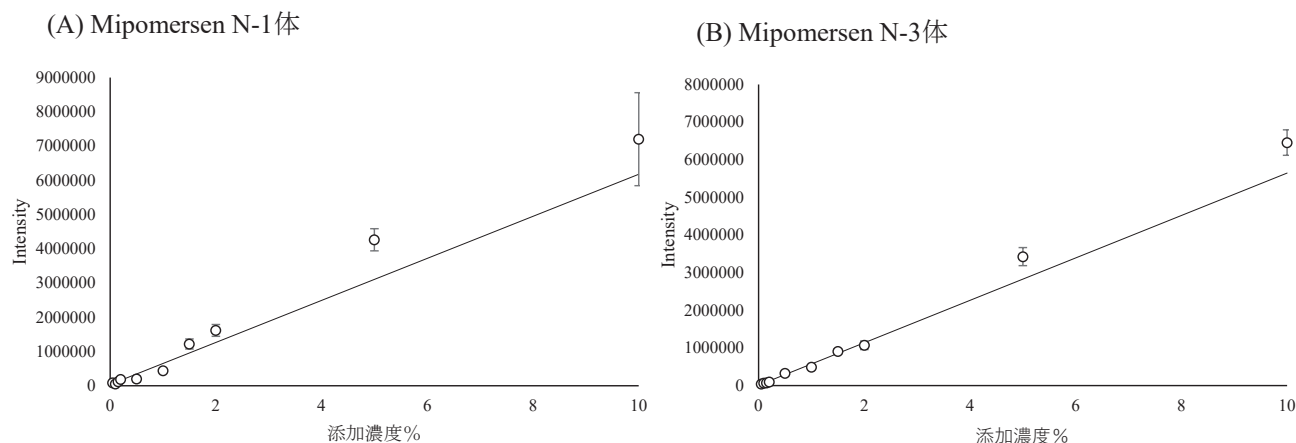
関性と定量下限について評価した(Tables 5~7)。なお、検量線における定量下限は、ICH Q2ガイドラインに記載の手法に基づき、作成した検量線から推定される切片の標準偏差から算出した(式3)。

$$\text{定量下限} = \frac{10\sigma}{S} \quad (\text{式3})$$

σ : 検量線から推定される切片の標準偏差

S : 検量線の傾き

各含量での繰り返し測定相対標準偏差(RSD)が20%以内である含量を用いて決定係数(R²)値0.990以上となる検量線を作成した(Tables 5~7)。その結果、配列によらずほぼ全ての分析機関・装置でFIAよりもLC/MSの方が、検量線範囲の拡大及び定量下限の低下を認め、良好な直線性を示した。これは、前節で述べたとおりカラム分離によりマトリックス効果が低減するため、低含量側においても正確な検出が可能であったためと考えられる。特にMipomersen N-3体のFIAでは各分析機関で算出した定量下限の範囲が0.08-1.17%であった一方で、LC/MSでは定量下限の範囲は0.05-0.22%であった

Fig. 5 $1/x^2$ で重みづけした検量線の例

白丸は実測値、実線は $1/x^2$ で重みづけした検量線を示す。

Table 5 Mipomersen不純物の相対定量方法の妥当性評価（直線性・定量限界）

識別番号			1	2	3	4	5	8	9	10	11
LC/MS	N-1	検量線範囲 (%)	0.10-10.0	0.05-10.0	0.50-10.0	0.05-10.0	0.05-10.0	0.10-10.0	0.50-10.0	1.0-10.0	0.15-10.0
		決定係数 R^2	0.991	0.992	0.991	0.994	0.991	0.990	0.994	0.996	0.997
		定量限界 (%)	0.17	0.10	0.72	0.08	0.10	0.19	0.54	1.00	0.15
	N-3	検量線範囲 (%)	0.05-10.0	0.05-10.0	0.15-10.0	0.05-10.0	0.05-10.0	0.10-10.0	0.10-10.0	0.20-10.0	0.05-10.0
		決定係数 R^2	0.997	0.993	0.990	0.997	0.992	0.996	0.999	0.997	0.995
		定量限界 (%)	0.22	0.09	0.22	0.05	0.09	0.11	0.10	0.20	0.07
FIA	N-1	検量線範囲 (%)	0.50-10.0	2.0-10.0	N/A	0.10-10.0	0.05-10.0	0.15-10.0	0.50-10.0	0.50-10.0	0.20-10.0
		決定係数 R^2	0.996	0.994	N/A	0.994	0.999	0.995	0.992	0.995	0.992
		定量限界 (%)	0.50	2.30	N/A	0.13	0.05	0.19	0.68	0.52	0.33
	N-3	検量線範囲 (%)	0.50-10.0	1.50-10.0	N/A	0.05-10.0	0.05-10.0	0.10-10.0	1.50-10.0	0.50-10.0	0.15-10.0
		決定係数 R^2	0.995	0.997	N/A	0.995	0.994	0.997	0.999	0.998	0.997
		定量限界 (%)	0.53	1.17	N/A	0.08	0.08	0.10	0.27	0.50	0.15

(Table 5). しかしながら、サンプル間で比較すると、Nusinersen 及び Inotersen の配列では、Mipomersen と比較してほとんどの分析機関・装置で、定量評価が可能な検量線の濃度範囲がより狭い傾向を示した。特に Inotersen の N-1 体では、LC/MS においても定量下限が最大で 2.0% を示す分析機関・装置があり、定量下限の濃度が高かった (Table 7)。

3.3.2 真度・精度

次に、相対定量の真度及び精度について評価した。ここでは、3.2. でシグナルが検出された結果のみを評価した。各含量における繰り返し分析の

RSD を横軸、添加回収率を縦軸とするプロット図としてまとめた (Figs. 6~8)。

核酸医薬における不純物分析の真度及び精度の評価に関しては、Ionis 社が MS を用いた分析法のバリデーション結果を報告している⁶⁾。同報告では、欧米製薬企業を中心とする Oligonucleotide Safety Working Group (OSWG) が提案する、定量下限に相当する 0.20% を報告閾値とし¹⁰⁾、真度評価基準を回収率 $100 \pm 25\%$ 、精度評価基準を RSD 21% 以下と設定している。本検討においても、この評価基準に準拠し、分析結果の評価を行った。

添加回収率の観点では、添加量が 0.20% であった

Table 6 Nusinersen 不純物の相対定量方法の妥当性評価（直線性・定量下限）

識別番号			2	4	5	6	7	8	9	10	11
LC/MS	N-1	検量線範囲（％）	0.05-10.0	0.05-10.0	0.15-10.0	0.20-10.0	0.10-10.0	0.05-10.0	0.05-10.0	0.15-10.0	0.15-10.0
		決定係数 R^2	0.992	0.995	0.999	0.998	0.995	0.998	0.994	0.993	0.993
		定量限界（％）	0.09	0.07	0.15	0.20	0.13	0.05	0.08	0.20	0.21
	N-3	検量線範囲（％）	0.50-10.0	0.05-10.0	0.10-10.0	0.05-10.0	0.15-10.0	0.15-10.0	0.05-10.0	0.15-10.0	0.05-10.0
		決定係数 R^2	0.999	0.995	0.998	0.996	0.997	0.997	0.997	0.995	0.993
		定量限界（％）	1.3	0.07	0.10	0.05	0.15	0.15	0.07	0.17	0.09
FIA	N-1	検量線範囲（％）	0.10-10.0	0.15-10.0	0.15-10.0	0.15-10.0	1.0-10.0	0.10-10.0	0.05-2.0	0.50-10.0	0.15-10.0
		決定係数 R^2	0.990	0.993	0.996	0.998	0.997	0.996	0.991	0.998	0.993
		定量限界（％）	0.18	0.26	0.15	0.15	0.77	0.10	0.08	0.50	0.22
	N-3	検量線範囲（％）	0.50-10.0	0.50-10.0	0.50-10.0	0.50-10.0	0.50-10.0	2.0-10.0	0.10-10.0	N/A	0.15-10.0
		決定係数 R^2	0.999	0.995	0.994	0.990	0.997	0.997	0.997	N/A	0.990
		定量限界（％）	0.81	0.49	0.57	0.75	0.50	2.0	0.19	N/A	0.25

Table 7 Inotersen 不純物の相対定量方法の妥当性評価（直線性・定量下限）

識別番号			1	3	5	6	7	8	9	10	11
LC/MS	N-1	検量線範囲（％）	0.05-10.0	N/A	0.05-10.0	2.0-10.0	0.50-10.0	0.50-10.0	1.0-10.0	0.20-10.0	0.50-10.0
		決定係数 R^2	0.993	N/A	0.999	0.997	0.997	0.992	0.995	0.996	0.995
		定量限界（％）	0.09	N/A	0.05	2.0	0.50	0.62	1.0	0.21	0.53
	N-3	検量線範囲（％）	0.15-10.0	0.10-10.0	0.10-10.0	0.05-10.0	0.10-10.0	0.05-10.0	0.05-10.0	0.05-10.0	0.15-10.0
		決定係数 R^2	0.999	0.991	0.994	0.995	0.998	0.992	0.999	0.995	0.996
		定量限界（％）	0.15	0.15	0.14	0.07	0.10	0.11	0.14	0.08	0.15
FIA	N-1	検量線範囲（％）	0.50-10.0	1.5-10.0	0.15-10.0	1.5-10.0	2.0-10.0	0.20-10.0	1.0-10.0	0.20-2.0	1.0-10.0
		決定係数 R^2	0.999	0.999	0.999	0.995	0.999	0.998	0.997	0.993	0.993
		定量限界（％）	0.50	1.5	0.15	1.6	2.0	0.20	1.0	0.22	1.2
	N-3	検量線範囲（％）	0.50-10.0	N/A	0.15-10.0	0.50-10.0	1.5-10.0	0.50-10.0	0.50-10.0	1.0-10.0	0.20-10.0
		決定係数 R^2	0.998	N/A	0.997	0.996	0.999	0.990	0.996	0.994	0.994
		定量限界（％）	1.2	N/A	0.15	0.50	1.5	0.50	1.1	1.0	0.29

場合、LC/MS及びFIAのいずれの分析方法においても、N-1体については3配列全てで真度基準（100±25％）を満たす分析はほとんど認められなかった（Figs. 6A, 6E, 7A, 7E, 8A, 8E）。また、目的物質と完全に分離されているN-3体においても、多くの分析において回収率が真度基準を満たさなかった（Figs. 6A, 7A, 8A）。特に、NusinersenにおけるN-3体不純物及びInotersenにおけるN-1体不純物については、真度基準を満たす分析が一例も認められなかった（Figs. 7A, 8A）。一方で、LC/MS分

析では、FIAと比較して不純物の添加量が1.0％以上となると、いずれの配列においても回収率が一定の範囲に収束する傾向がみられ、大半の分析機関・装置で回収率が100±50％の範囲に収まっていた（Figs. 6C-6D, 7C-7D, 8C-8D）。

次に精度についてRSDを指標に検討した。LC/MS分析及びFIAのいずれにおいても、添加含量が低下するにつれて、配列に依存した精度の低下傾向が認められた。一方で、添加含量が1.0％以上の場合には、全ての配列においてRSDが21％以下に収

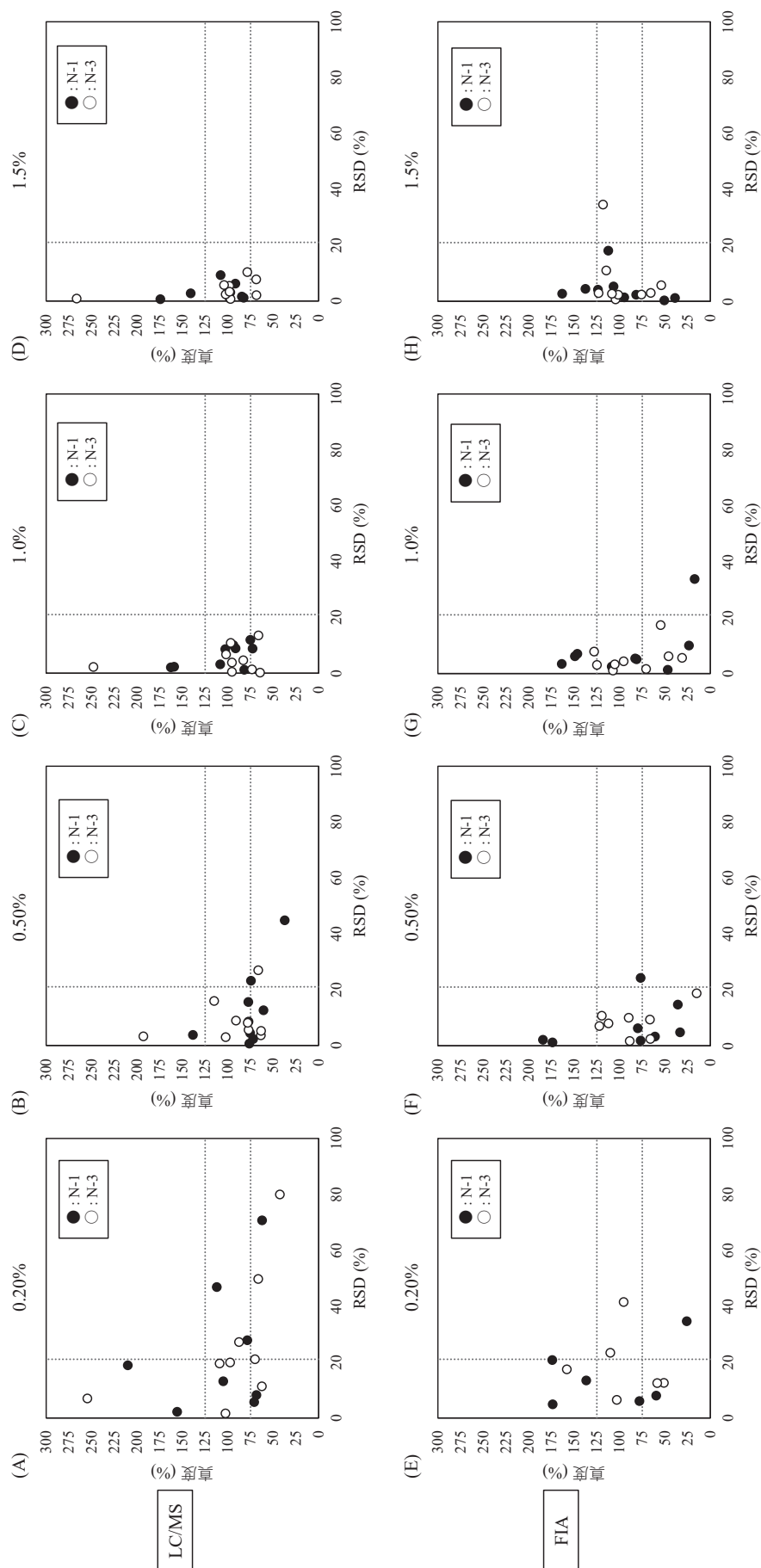


Fig. 6 Mipomersen不純物相対定量における真度・精度評価

各不純物濃度におけるLC/MS (A-D) とFIA (E-H) の真度 (添加回収率) と精度 (相対標準偏差: RSD) の相関図を示す。点線は、Ionis社の報告⁶⁾を参考に真度75%, 125%及び精度21%を示す。

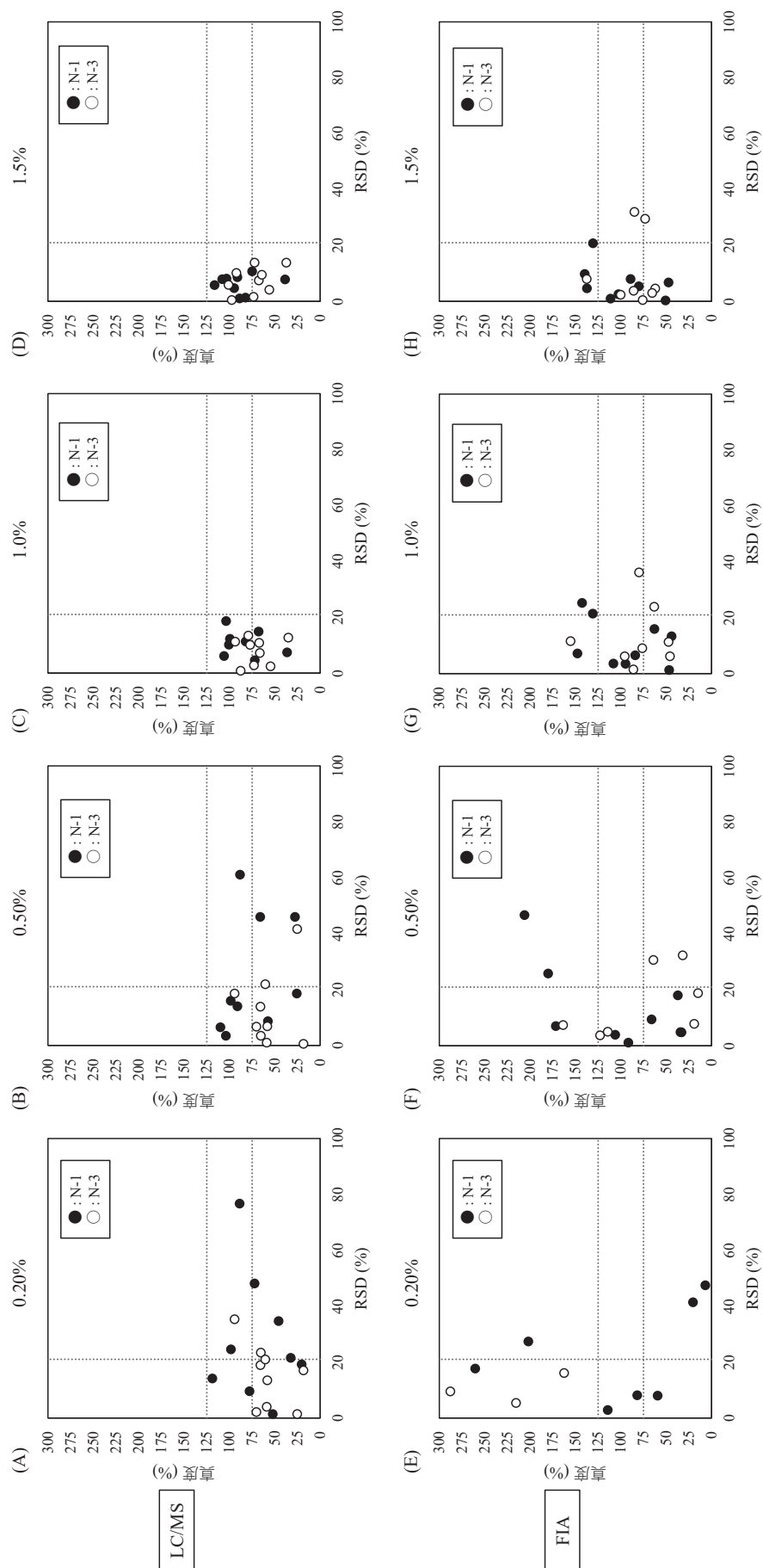


Fig. 7 Nusinersen不純物相対定量における真度・精度評価

各不純物濃度におけるLC/MS (A-D) とFIA (E-H) の真度 (添加回収率) と精度 (相対標準偏差: RSD) の相関図を示す。
点線は、Ionis社の報告⁶⁾を参考に真度75%、125%及び精度21%を示す。

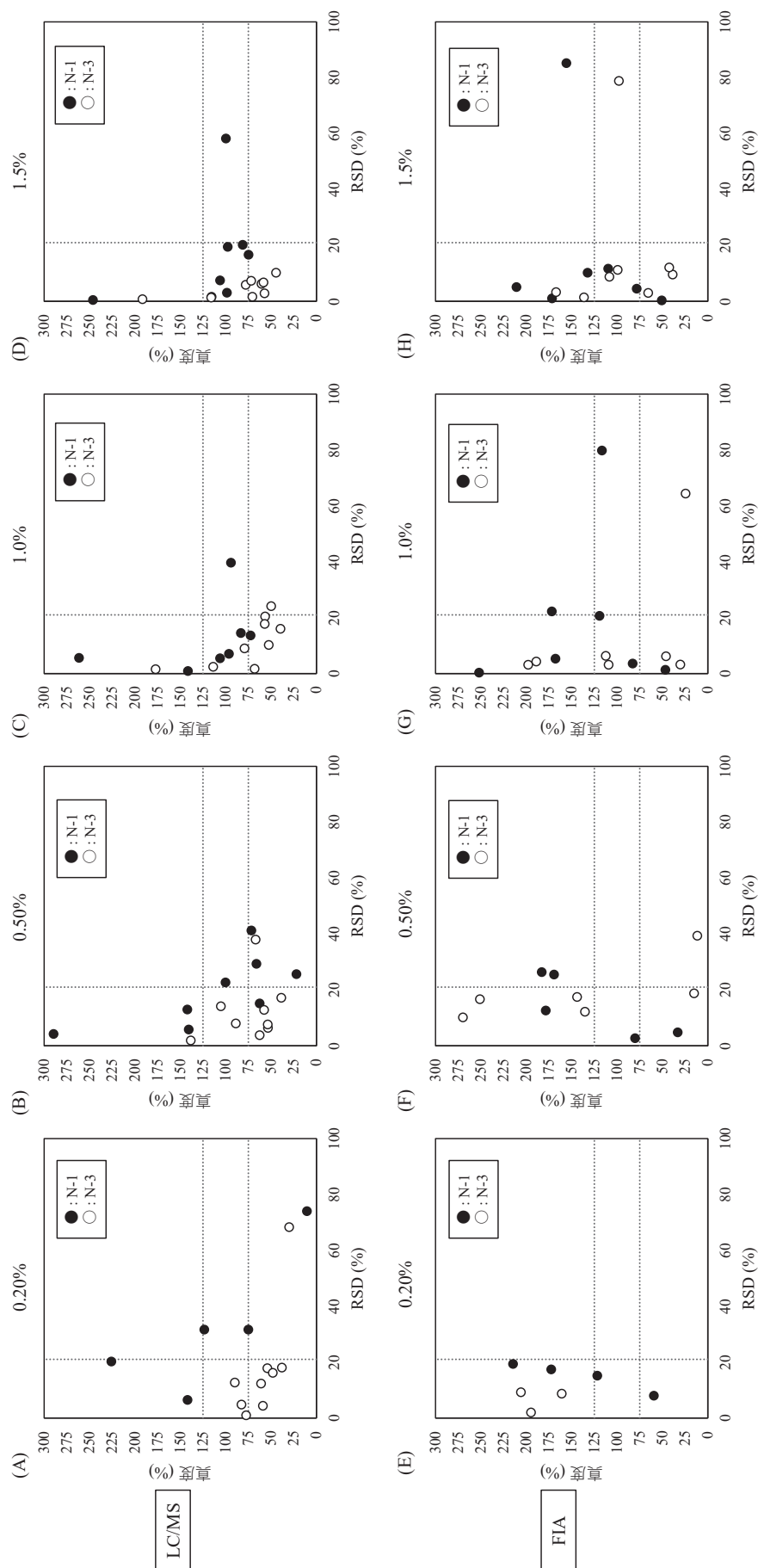


Fig. 8 Inotersen不純物相対定量における真度・精度評価

各不純物濃度におけるLC/MS (A-D) とFIA (E-H) の真度 (添加回収率) と精度 (相対標準偏差: RSD) の相関図を示す。点線は、Ionis社の報告⁶⁾を参考に真度75%, 125%及び精度21%を示す。

束する傾向がみられ、十分な精度での分析が可能であった。

本結果より、FIAと比較してLC/MSによる分離を行うことで、より高い定量性が得られる傾向が示され、MSを用いたオリゴヌクレオチド不純物の相対定量において、カラム分離が真度及び精度確保の観点からも重要であることが明らかとなった。

4. 考察

4.1 配列によって相対定量性が異なる原因について

今回、分析条件及びデータ解析方法を統一させた事で機関及び装置間の結果のばらつきは軽減できたものの、配列によりその定量性が異なっていた。定量性の低下を認めたNusinersenのN-3不純物 (Fig. 7A) 及びInotersenのN-1不純物 (Fig. 8A) について原因を考察した結果、以下の二つの要因が定量性の低下をもたらしたと考えられた。

1) 多価イオンピークの重なり

NusinersenのN-3不純物の定量性低下については、目的物質とN-3不純物の異なる価数のイオンの重なりが原因と考えられた。Nusinersenの平均質量は7127.24 Daであり、ESIによる質量分析では6価イオンが m/z 1186.05から1188.21の間で検出される。一方で、NusinersenのN-3不純物の平均質量は5932.07 Daであり、5価イオンが m/z 1185.41から1186.80の間で検出される (Fig. 9A)。そのため、実測定においては、目的物質とN-3不純物が

共存する条件ではその質量スペクトルの重なりが生じてしまう結果となった (Fig. 9B)。今回の解析では、目的物質の同位体イオンと重なっているN-3不純物の同位体イオンを排除して解析を行ったため、定量値が低下したものと考えられる。

2) 1Da違いの不純物の存在

InotersenのN-1不純物については、1Da違いの不純物が生じる事が原因と考えられた。本検証では、5'側からT (MOE) が欠損した不純物 (5'N-1体) を分析対象にしており、その平均質量は6788.82である。一方で、3'側から ^{13}C (MOE) が欠損したN-1不純物 (3'N-1体) の平均質量は6789.81であり、その質量差がおおよそ1 Daとなる。MSスペクトル上でこれらの不純物が共存していた場合、同位体イオンが重なるため、個々のイオン強度を識別することが困難となる (Fig. 10A)。実測定においても、目的物質合成品そのものに3'N-1体由来のイオンを認める結果となり (Fig. 10B)、不純物添加サンプルでは5'N-1体及び3'N-1体が合算されたスペクトルを得る結果となった (Fig. 10C)。各分析装置の解析ソフトウェアでは、スペクトルデータ抽出の違いにより、合算されたスペクトルを誤って3'N-1体と同定したことで解析対象から外された分析機関・装置や、5'N-1体と同定したことで回収率が100%を超える分析機関・装置を認めたことにより、正確な定量値を得ることが困難であったと考えられる。

以上の二つが定量性の低下及び配列依存性をもたらす大きな要因となり得る。

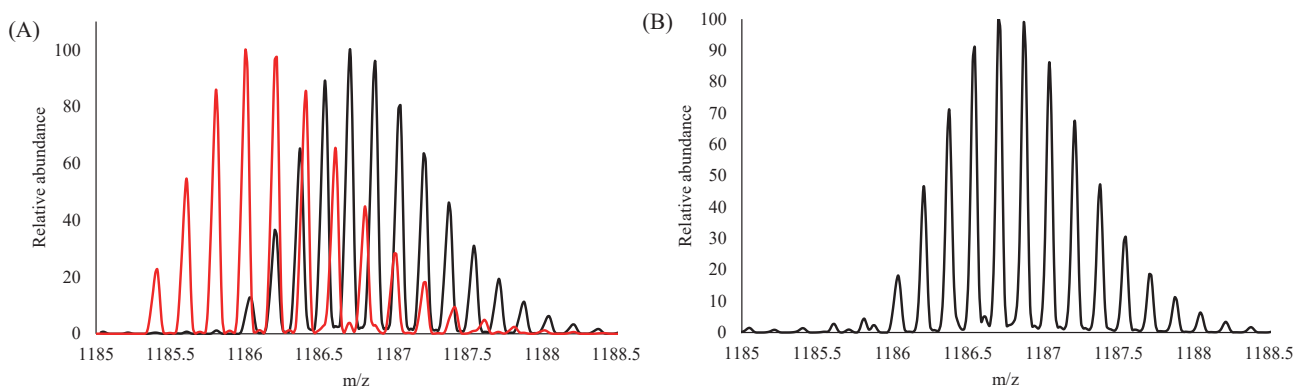


Fig. 9 Nusinersenの同位体イオンの重なり

(A) 目的物質 (6価, 黒), N-3体 (5価, 赤) のMSスペクトルの重ね書き (計算値)
 (B) 不純物10%添加サンプルの m/z 1185-1188のMSスペクトルを示す。

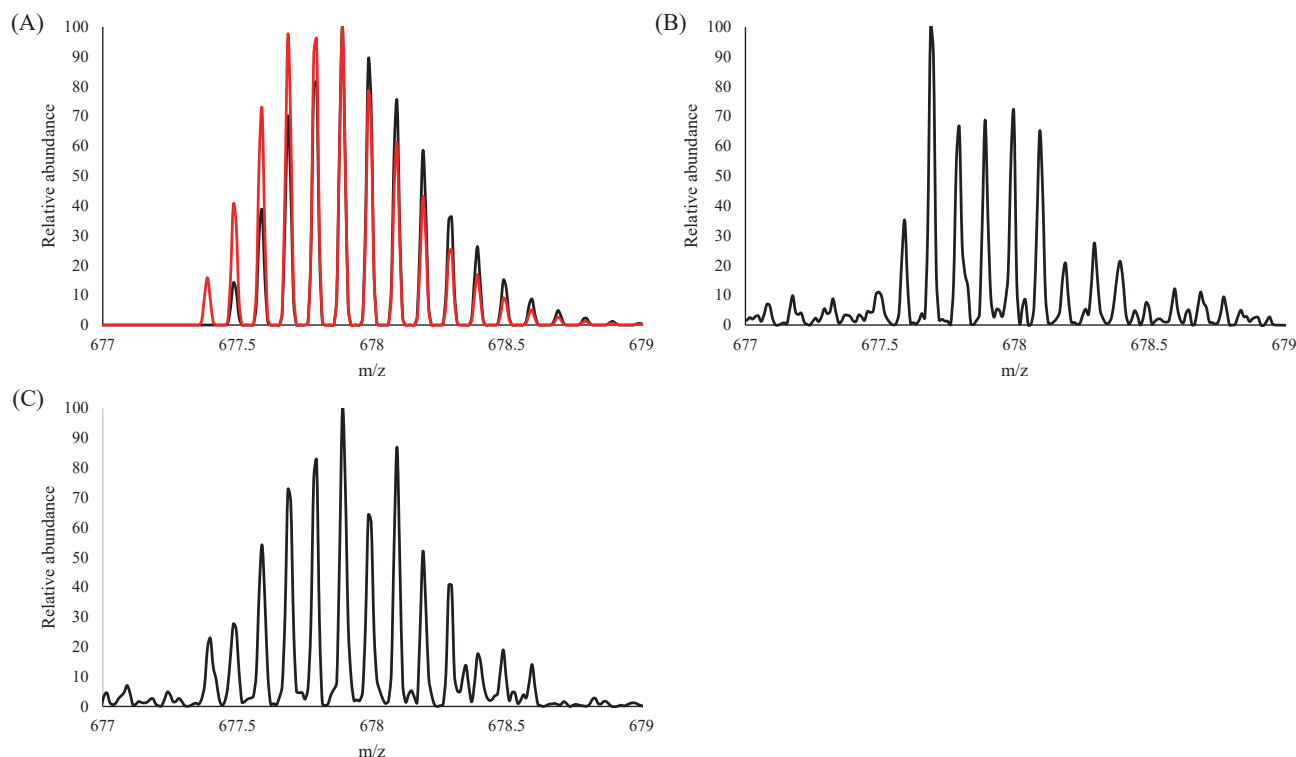


Fig. 10 Inotersenの5'欠損及び3'欠損N-1体の多価イオンスペクトルの比較

- (A) 3'欠損N-1体 (8価, 黒), 5'欠損N-1体 (8価, 赤) のMSスペクトルの重ね書き (計算値)
 (B) 目的物質合成品に含まれるN-1不純物由来のMSスペクトル
 (C) 1.0%添加サンプルに含まれるN-1不純物由来のMSスペクトルを示す.

4.2 MSを用いたオリゴヌクレオチド不純物の相対定量で定量可能な不純物量

OSWGから発出された核酸医薬品不純物に関するホワイトペーパーでは、定量下限含量に基づいて、報告の必要な閾値として0.20%が妥当であると提唱されている¹⁰⁾。本研究では、相対定量法を用いてこの閾値における真度及び精度を評価した。その結果、使用した配列及び分析法では、相対定量による評価において基準を十分に満たす結果は得られなかった(3.3.2参照)。更に、本研究においてはMSを用いた相対定量の定量性が低下する要因として、1) 多価イオンピークの重なり、2) 1 Da差の不純物の存在が挙げられ、核酸医薬の不純物評価ではこれらの影響を十分に考慮する必要があることが示唆された(3.4参照)。一方で、FIAと比較してLC/MSを用いた場合、配列や装置に依存せず、1.0%以上の不純物含量領域においては回収率が一定範囲(100±50%)に収束しており、再現精度も21%以内に収まる傾向が確認され、多くの分析機関・装置において定量が可能であった(3.3.2参照)。

以上より、MSによる相対定量法において、LCでの分離が困難な目的物質と構造が近い不純物においても、LC/MS分析により1.0%以上のオリゴヌクレオチド欠損体不純物を精度よく定量できる可能性が示された。なお、不純物含量1.0%未満の不純物の定量については、標準品を用いた絶対定量法を適用することで、より低含量域においても正確な定量が可能となることが期待される。

5. 結論

我々はこれまで、オリゴヌクレオチドの不純物分析における分離技術、MS相対定量におけるマトリックス効果の検証及びその定量性評価、オリゴヌクレオチドの配列解析における課題を把握することを目的として、汎用的なLC/MS装置を用いたオリゴヌクレオチドの品質評価に関する研究を行ってきた。先行研究では、目的物質と不純物の分離、精密質量測定及び構造推定については、各機関で統一した良好な結果が得られた一方で、装置間において不

純物の相対定量の結果に差異が確認された。この差異が装置固有の特性に起因するものか、あるいは移動相条件や調製方法など他の要因によるものかは明らかでなく、検討課題となっていた。

本研究では、この課題を解決することを目的に分析条件及びデータ解析手法を可能な限り統一した上で、国内8機関・計11台（一部同一機種も含む。）のLC/MS装置を用いて、MS相対定量法に基づくオリゴヌクレオチド不純物の分析を実施し、以下の結果・結論を得た。

① カラム分離によるマトリックス効果の低減

カラム分離を介さないFIAでは、目的物質と不純物のピークトップが完全に一致していたため、マトリックス効果が顕著に発現し、定量性及び検出感度に大きな影響を与える場合があった。不純物との完全な分離が得られない場合であっても、LC/MSにおいてカラム分離を介することでマトリックス効果の影響を軽減でき、相対定量法における定量性を向上させ得ることが明らかとなった。

② 分析条件統一による装置間差の低減

分析条件及びデータ処理法を統一させたことにより、異なる装置・機関間での結果のばらつきが低減した。特に不純物含量1.0%以上では、回収率が100±50%、相対標準偏差(RSD)が21%以下に収束し、再現性の高い定量結果が得られた。したがって、装置や分析機関が異なる場合でも、移動相組成やデータ処理法を統一することで再現性の高い定量結果へと結びつけられる。

③ MS相対定量に影響を及ぼす要因

カラム分離の実施、分析条件の統一を行ったにも関わらず、未だ不純物含有率1.0%未満では、先行研究からの改善は見られなかった。この要因として、1) 目的物質と不純物の多価イオンピークの重なり、及び 2) 質量差1 Daの異性不純物の共存が主因であることを明らかにした。これにより、配列依存的に定量性が変化し、特定の不純物において誤同定・過大評価・過小評価が生じ、特に不純物含量1.0%未満で顕著に影響を及ぼしうることが示された。

以上の結果より、オリゴヌクレオチド不純物の質量分析においてLCによるカラム分離を組み合わせることで、分析機関及び装置間のばらつきを大幅に低減でき、不純物含量1.0%以上で回収率100±

50%、RSD21%以下という基準を満たす一定の定量性及び精度で相対定量が可能であることが示された。一方で、今回検討した相対定量法では、不純物含量1.0%未満において、OSWGが提唱する定量下限0.20%における真度及び精度の基準を満たすことはできなかった。しかしながら、低含量域においても、不純物の定性分析は可能であることが示された。今後は、本研究の知見を基に、標準品を用いた定量法の導入により、より低含量領域における精度の高い不純物定量が実現できると期待される。相対定量においては、対象とする不純物の配列及び構造に加えて、イオン化の飽和や多価イオンの重なりといったスペクトル上の特性に十分配慮することにより、不純物含量1.0%以上で信頼性の高い定量を実現できると考えられる。

謝 辞

本研究は、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」（課題番号：JP21ae0121022, JP21ae0121023, JP21ae0121024）の支援を受けて実施したものである。

文 献

- 1) Hannauer, F.; Black, R.; Ray, A. D.; Stulz, E.; Langley, G. J.; Holman, S. W. Advancements in the characterisation of oligonucleotides by high performance liquid chromatography-mass spectrometry in 2021: A short review. *Anal. Sci. Adv.* 2022, 3(3-4), p.90-102. doi: 10.1002/ansa.202100066.
- 2) Bleicher, K.; Bayer, E. Various factors influencing the signal intensity of oligonucleotides in electrospray mass spectrometry. *Biol. Mass Spectrom.* 1994, 23(6), p.320-322. doi: 10.1002/bms.1200230604.
- 3) Gong, L.; McCullagh, J. S. O. Comparing ion-pairing reagents and sample dissolution solvents for ion-pairing reversed-phase liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry analysis of oligonucleotides. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2014, 28(4), p.339-350. doi: 10.1002/rcm.6773.
- 4) Liu, R.; Ruan, Y.; Liu, Z.; Gong, L. The role of fluoroalcohols as counter anions for ion-pairing reversed-phase liquid chromatography/high-resolution electrospray ionization mass spectrometry analysis of oligonucleotides. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2019, 33(7), p.697-709. doi: 10.1002/rcm.8386.
- 5) 廣瀬賢治, 吉田徳幸, 寺崎真樹, 瀬崎浩史, 唐澤薫, 岩崎了

- 教, 高原健太郎, 滝口直美, 関口光明, 南海浩一, 斎藤恵美, 佐藤秀昭, 大澤昂志, 山口卓男, 伊藤浩介, 川上純司, 小比賀聡, 井上貴雄. 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の分析データ比較. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス. 2023, 54(5), p.439-454. doi: 10.51018/pmdrs.54.5_439.
- 6) Rentel, C.; Gaus, H.; Bradey, K.; Luu, N.; Kolkey, K.; Mai, B.; Madsen, M.; Pearce, M.; Bock, B.; Capaldi, D. Assay, purity, and impurity profile of phosphorothioate oligonucleotide therapeutics by ion pair-HPLC-MS. *Nucleic Acid Ther.* 2022, 32(3), p.206-220. doi: 10.1089/nat.2021.0056.
- 7) 厚生省医薬安全局審査管理課長. 分析法バリデーションに関するテキスト（実施方法）について. 医薬審発338号, 平成9年10月28日.
- 8) 厚生労働省医薬食品局審査管理課長. 「医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法のバリデーションに関するガイドライン」について. 薬食審査発0711第1号, 平成25年7月11日.
- 9) 孫雨晨, 斎藤嘉朗. LC-MSを用いた核酸医薬品バイオアナリシス法の開発戦略と分析法検証手法. *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.* 2023, 71(2), p.62-68.
- 10) 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.