

核酸分析で気をつけること

伊藤 俊 輔

1 はじめに

近年、核酸の医薬品用途としての開発が盛んに行われており、国立医薬品食品衛生研究所（NIHS）のホームページにて公開されている情報によれば、2025年4月2日時点で22品目の核酸医薬品が日米欧のいずれかで承認されている。そのうち19品目が2016年以降に承認されていることからわかるように、核酸医薬品の市場は急速に拡大している。

また、2024年7月には欧州医薬品庁（European Medicines Agency, EMA）から核酸医薬品の開発におけるドラフトガイダンス¹⁾が公開されており、核酸医薬品の原薬において設定される分析項目の典型例が記載されている（表1）。

核酸医薬品の品質を保証するために、分析者はこれらの項目の分析を行い、正確な結果を出さなければならない。

本稿では医薬品用途の核酸分析を例に、表1に記載した分析項目のうち、特にカウンターイオン、水分及び液体クロマトグラフィー（LC）による分析について、コンタミネーション（コンタミ）やキャリーオーバーの観点で留意すべき点について述べる。

表1 核酸医薬（原薬）で設定される典型的な分析項目

性状
確認試験（分子量）
確認試験（配列解析）
確認試験（保持時間）
含量
カウンターイオン
純度/類縁物質
pH
水分含量
残留溶媒
元素不純物
エンドトキシン
微生物限度試験

2 核酸の構造

まず核酸の構造についておさらいする。核酸とは塩基、糖、リン酸からなるヌクレオチドがホスホジエステル結合で多数つながった構造を基本骨格とする化合物である（図1）。核酸医薬は、生体内の安定性や二本鎖形成能の向上などを目的として、しばしば化学的修飾がなされる。実際、前項で記載したNIHSのホームページにて公開されている22品目の核酸医薬品には、すべて化学的修飾がなされている。また、ナトリウム塩として開発されることが多く、上記22品目のうち16品目はナトリウム塩である。

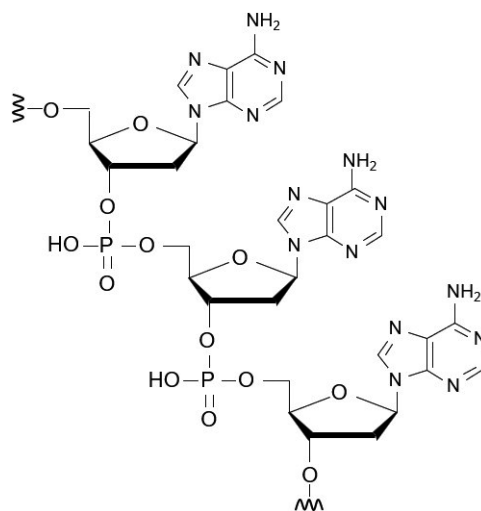


図1 核酸の基本構造

3 カウンターイオン分析時の留意点

カウンターイオンの分析は、イオンクロマトグラフィーや誘導結合プラズマ発光分析（ICP-AES 又は ICP-OES）等を用いることが多い。分析におけるコンタミは大きく試料調製時と機器分析中の二つに分けられるが、カウンターイオン分析の場合、特に試料調製時のコンタミに注意する必要がある。

前項でも述べた通り、核酸医薬はナトリウム塩として

開発されることが多く、ナトリウム含量を測定する機会が多い。ガラス器具を用いて試料調製する場合は、ガラス器具からのアルカリ金属イオンの溶出に注意が必要である。

筆者の失敗談を一つ紹介する。以前筆者の所属する部門でナトリウムイオンを測定した際、想定外の分析結果が得られたことがあった。原因を調査したところ、サンプル調製過程の一部でガラス製メスフラスコを用いており、メスフラスコからナトリウムイオンが溶出していたことが判明した。弊社で使用していた5 mL 容ガラスメスフラスコからは0.1 mg 程度のナトリウムの溶出が認められた。

ガラス器具からのアルカリ金属イオンの溶出に対し、最も簡単で確実な対策は、ポリプロピレン等の樹脂製の器具を使用し、ガラス製の器具を使用しないことである。図1に示したような一般的な核酸に含まれるナトリウム含量は5~6 wt% である。やむを得ずガラス製器具を使わざるを得ない場合は、分析への影響を十分に考慮しなければならない。

4 水分測定時の留意点

一般的に核酸は溶液を凍結乾燥して固体とするが、凍結乾燥後の核酸は環境中の湿度の影響を受けやすい。このため、水分測定の際は、環境からの水分のコンタミを防ぐことが重要である。

図2は、ある核酸の水蒸気吸脱着等温線である。

水蒸気吸脱着等温線とは一定温度における圧力と水蒸気の平衡吸着量をグラフ化したもので、相対湿度と水分量の関係がわかる。注意しなければならないのは、必ずしも測定環境の相対湿度が低ければ良いというわけではないことである。例えば核酸の水分量に対し、測定環境の相対湿度が低すぎると、水分が抜けてしまうこともある。

水分測定にはカルフィッシャー水分計を用いることが多いが、正確な水分量を量るために以下の点に注意するとよい。

- ① 秤量^{ひょうりょう}にかかる時間をできるだけ短くする

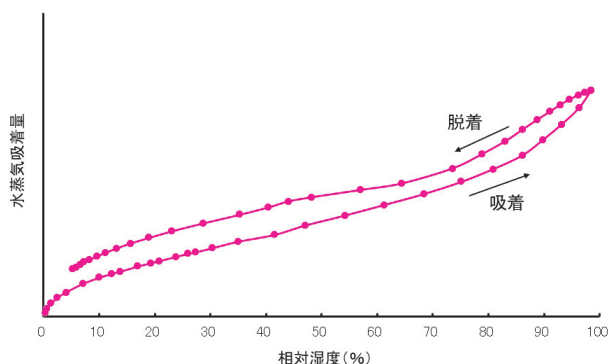


図2 核酸の水蒸気吸脱着等温線

- ②秤量後、分析機器に投入するまでの時間をできるだけ短くする
③予想する測定対象の水分量を考慮して測定環境の相対湿度をコントロールする

5 液体クロマトグラフィー分析時の留意点

5.1 核酸の吸着

核酸はガラス器具や金属に吸着しやすい性質を持つが、核酸の純度の評価等で頻繁に使用する高速液体クロマトグラフ (HPLC) には多くの金属部品が使われている。吸着するということは分析系に核酸が残存することに他ならないため、いかに吸着を抑えるかがコンタミやキャリーオーバーを抑える重要なポイントとなる。

核酸分析で生じる吸着には大きく分けて試料調製時の吸着と機器分析中の吸着の二つに分けられる。

5.1.1 試料調製時の吸着

一般的な分析における試料調製にはガラス製と樹脂製(ポリプロピレン製等)の器具が使われる。樹脂製器具では疎水性相互作用による吸着が起こり、ガラス製器具ではイオン性相互作用と疎水性相互作用による吸着が起こる。核酸のガラスへの吸着はイオン性相互作用によるものと考えられている。このため、核酸の液体クロマトグラフィー分析では樹脂製の器具を使用することが多い。

しかし、樹脂製の器具では上述のとおり疎水性相互作用による吸着が起こるため、脂質等の疎水性の高い化合物を結合させた修飾核酸の分析では、樹脂製器具への吸着の可能性も考慮しなくてはならない(図3)。

試料調製時の器具への吸着対策として有効かつ簡便な

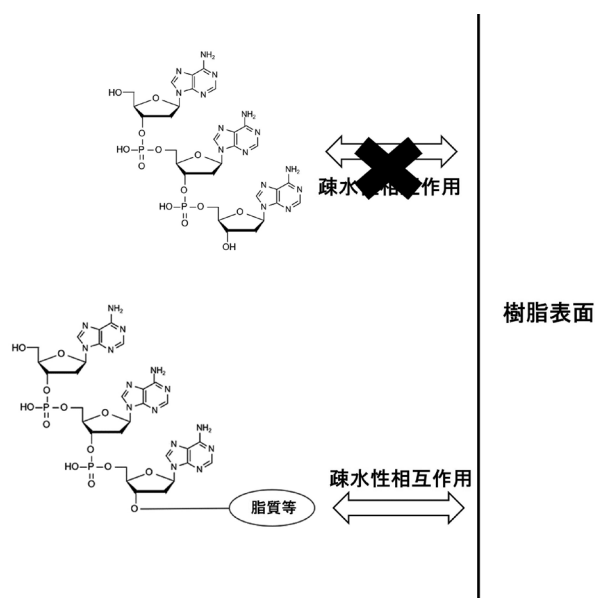


図3 樹脂表面での吸着

手段として共洗いがある。共洗いは器具への吸着抑制だけでなく器具からのコンタミも抑制することができる。

また、HPLC用のバイアル等でガラス製の器具を使用する場合は、各メーカーから販売されているシラノール基($-\text{Si}-\text{OH}$)を不活性化処理したバイアルを用いると良い。イオン性相互作用に寄与するシラノール基の影響が抑えられるため、吸着防止効果が期待できる。

5.1.2 機器分析中の吸着

核酸は金属に対して非特異的に吸着することが知られているが²⁾、これは核酸の持つ負に帯電したリン酸基と金属表面との相互作用によると考えられている。HPLC分析における吸着抑制の方法を以下に述べる。

(1) バイオイナートな装置、カラムの使用

多くのカラムメーカーや装置メーカーがバイオイナート(生物学的サンプルと相互作用しない)材料を用いた製品を販売している。詳細は各メーカーのホームページ等を確認いただくと良い。価格は通常の製品よりも高価だが、新たにカラムや装置を購入する場合は、これらの装置、カラムの使用が有効である。

(2) 専用カラムの使用

液体クロマトグラフィー/質量分析法(LC/MS)を用いて微量成分を検出したい場合は、核酸ごとにカラムを専用化することも重要である。MSシグナル強度の強い成分を分析する場合には問題にならないが、不純物の評価の場合、分析対象物の不純物なのかカラムに吸着した成分なのかを評価できなくなる場合がある。

(3) 核酸の事前注入

吸着抑制法の一つに、装置やカラムのコンディショニング時に核酸を注入する方法がある。金属表面にあらかじめ核酸分子を吸着させておき、分析対象物の吸着を防ぐ方法である。

図4に事前注入を実施した場合と実施しなかった場合のクロマトグラムを示した。

事前注入後のクロマトグラムは分析対象物のピーク高さが高くなっており、核酸の吸着を抑制できていることがわかる。

事前注入により吸着を抑制できるが、コンタミやキャリアオーバーに注意しなければならない。分析対象物と



図4 事前注入の効果 (A: 事前注入あり, B: 事前注入なし)

異なる核酸を注入すると異種核酸のコンタミリスクとなり、分析対象物と同一の核酸を注入するとキャリアオーバーのリスクとなる。コンタミやキャリアオーバーがないことを確認するために、事前注入後にブランク溶液などを注入し、分析対象物の評価に影響するピークがないことを確認する必要がある。

(4) リン酸水溶液の通液

薄めたリン酸水溶液(0.1%程度)を通液することで吸着を抑制することもできる。これは金属表面にあらかじめリン酸分子を意図的に吸着させることで、核酸自体の吸着を防ぐ方法である。

リン酸水溶液通液前後で同一試料を注入したときのクロマトグラムを図5に示した。リン酸水溶液通液前に比べ、通液後のピークは面積、高さともに大きくなっており、リン酸水溶液通液により吸着が抑制されていることがわかる。

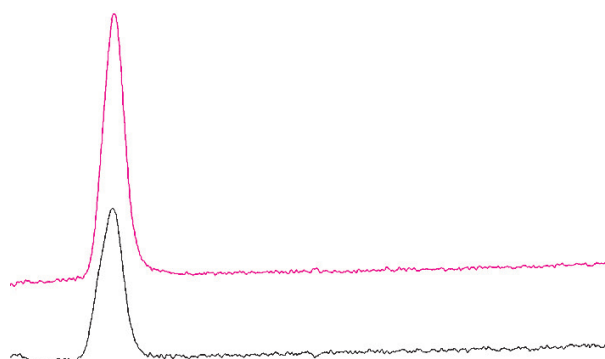


図5 リン酸水溶液通液の効果 (上: 通液後, 下: 通液前)

5.2 コンタミネーション

核酸のLC分析におけるコンタミはほとんど試料調製時に起こる。試料調製時の注意点で核酸に特有な点は少ないが、LC/MSを用いる場合は、吸着の場合と同様に調製器具に注意を払う必要がある。

核酸は一般的に複雑な不純物プロファイルを持つため、HPLCカラムによる分離だけでは不純物の完全な分離が困難であることが多い。そこで検出器に質量分析計(MS)を用いて目的物や不純物の質量電荷比(m/z)を測定し、含まれる成分を評価する。ガラス製や金属製の器具を用い、正電荷を持つイオン性物質が溶出することにより、イオン性物質が目的物に付加し、目的物とは異なる m/z が観測されることがある。核酸自体がカウンターイオンを持つことから、付加イオンのシグナルをゼロとすることは難しいため、付加物であるか不純物であるかを見極めが重要となる。

なお、不活性化処理したバイアルの使用は、金属イオンの溶出対策としても有効である。

5.3 キャリーオーバー

核酸の HPLC 分析では、アミン系のイオンペア試薬と逆相カラムを用いたり、陰イオン交換カラムを用いたりすることが多い。これは核酸が水に溶けやすく、リン酸基部が負電荷を持つ性質を利用している (図 6)。

逆相分析では、イオンペア試薬を用いて核酸の疎水性を高め、逆相カラムに保持させている。核酸に脂質等の疎水性物質が結合されている場合、カラムとの疎水性相互作用が強くなりすぎ、カラムから溶出しにくくなる。目的物の溶出を見落とすことはないと思うが、不純物が次のクロマトグラムに溶出することがないよう分析条件を検討することが重要である。

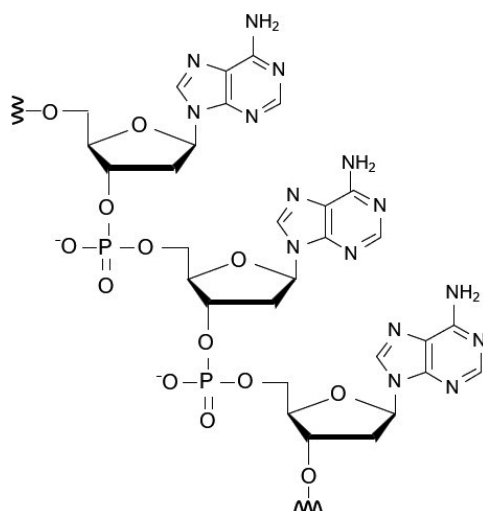


図 6 水溶液中における核酸の電荷

また、分析系への残留が懸念される場合は、ブランク溶液を注入し、キャリーオーバーが許容できるレベルであるかを確認することも重要である。

6 終わりに

核酸分析、特に核酸医薬の分析によく用いられる方法について気を付ける点を述べてきたが、実際は一つの対策だけでは十分でなく、複数の対策を組み合わせることも多い。分析の目的に応じた対策をすることで、吸着やコンタミ、キャリーオーバーの影響なく分析することが可能となる。本稿が初めて核酸を分析する方の参考になれば幸いである。

文 献

- 1) Guideline on the Development and Manufacture of Oligonucleotide Draft (<https://www.ema.europa.eu/en/development-manufacture-oligonucleotides-scientific-guideline>), (2025 年 5 月 20 日最終確認)。
- 2) R. Tuytten, F. Lemiere, E. Witters, W. Van Dongen, H. Slegers, R. P. Newton, H. Van Onckelen, E. L. Esmans : *J. Chromatogr. A*, **1104**, 209 (2006)。



伊藤 俊輔 (Iro Shunsuke)

味の素バイオフーマサービス株式会社
ジーンデザイン品質保証部 (〒567-0085
大阪府茨木市彩都あさぎ 7-7-29)。東京
大学大学院理学系研究科化学専攻修士課程
修了。理学修士。《趣味》美味しい店探し。

原 稿 募 集

トピックス欄の原稿を募集しています

内容：読者の関心をひくような新しい分析化学・分析技術の研究を短くまとめたもの。

執筆上の注意：1) 1000 字以内 (図は 1 枚 500 字に換算) とする。2) 新分析法の説明には簡単な原理図などを積極的に採り入れる。3) 中心となる文献は原則として 2 年以内のものとし、出所を明記する。

なお、執筆者自身の文献を主として紹介するこ

とは御遠慮ください。又、二重投稿は避けてください。

◇採用の可否は編集委員会にご一任ください。原稿の送付および問い合わせは下記へお願いします。

〒141-0031 東京都品川区西五反田 1-26-2

五反田サンハイツ 304 号

(公社)日本分析化学会「ぶんせき」編集委員会

[E-mail : bunseki@jsac.or.jp]