

日本医療研究開発機構 医薬品等規制調和・評価研究事業
事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 脂質ナノ粒子製剤の品質確保に向けた評価法の開発に関する研究
(英 語) Development of characterization methods of lipid nanoparticle formulations
for quality improvement

研究開発実施期間: 令和 5 年 7 月 20 日～令和 8 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 阿部 康弘
(英 語) Yasuhiro Abe

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 国立医薬品食品衛生研究所・薬品部第四室・室長
(英 語) Section Chief, Division of Drugs, National Institute of Health Sciences

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

1. 研究背景

新型コロナウイルス感染症に対する mRNA ワクチンの実用化を契機に、脂質ナノ粒子（LNP）製剤は次世代創薬プラットフォームとして国内外から高い注目を集めている。LNP 製剤は、有効成分である mRNA を細胞内に効率的に送達するドラッグデリバリーシステム（DDS）であり、4 種類の機能性脂質（イオン化脂質・中性リン脂質・コレステロール・PEG 脂質）から構成される複雑な分子集合体である。その構造の複雑さゆえに、温度変化や振動等の外部ストレスによる物理化学的安定性の低下が課題となっており、従来の低分子医薬品を超える高度な製造技術と厳密な品質管理が求められる。

近年の研究から、LNP 製剤は均一な粒子集団ではなく、水疱様の脂質二重層突出（Bleb）構造を有する粒子や、有効成分を内包しない「空粒子」が混在する不均一な粒子群であることが明らかとなってきた。こうした背景から、粒子集団全体の平均特性値（平均粒子径や mRNA 含量）のみに基づく従来の評価手法では、製剤の有効性・安全性を十分に予測・保証できないことが国際的に認識されており、単一粒子レベルの解像度で個々の粒子特性を評価可能な先進的分析法の開発・標準化が強く求められている。

本研究は、このような規制科学的課題に応えるため、令和 5 年度から 3 年間にわたり、(1) 単一粒子レベルの先進的品質評価法の確立、(2) 有効性・安全性に寄与する LNP 製剤の品質特性の明確化、(3) LNP 製剤の品質管理指針案の作成の 3 項目を柱として実施した。

2. 研究成果

(1) LNP 製剤の先進的品質評価法の確立

【フローナノアナライザー（NanoFCM）による mRNA 封入プロファイルの評価法の開発】

令和 5 年度は、単一粒子分析法の確立に向け、GFP 発現 mRNA を内包するモデル mRNA-LNP を自製し、フィルター材質、サンプル濃縮条件、希釈率等の前処理および測定条件を系統的に最適化した。これにより、高精度な個数粒度分布評価法を確立した。さらに、細胞膜透過性核酸染色色素（SYTO）による mRNA 標識を行い、側方散乱光強度と蛍光強度の 2 変量解析プロットを用いることで、単一粒子レベルでの薬物封入率の算出が可能であることを確認した。

令和 6 年度には、mRNA および LNP 構成脂質をダブル蛍光染色するマルチパラメーター解析法へと発展させ、個々の LNP 粒子における薬物封入率を高精度に評価可能な手法を確立した。また、RNA 分解酵素（RNase）処理によって遊離 mRNA が速やかに分解される一方で LNP 内包 mRNA は保護されることをキャピラリー電気泳動により実証し、これを NanoFCM 解析と組み合わせることで、LNP 表面吸着 mRNA と内包 mRNA の存在比を算出する手法を構築した。

令和 7 年度には、これまでの知見を集約し、NanoFCM を用いた空粒子形成割合の評価に関する技術的課題および留意事項を体系的に整理した総説を公表した。

【AFM による LNP の硬さ評価法の確立】

原子間力顕微鏡（AFM）による LNP の硬さ計測のためには、LNP を固体基板上に安定固定化する技術が不可欠である。令和 5 年度には、既存の固定化技術を改良し、従来課題となっていた基板上のタンパク質層（分子クッション）を大幅に薄層化する LNP の固定化手法を開発した。

令和 6 年度には、この手法の最適化を進める中で生じた LNP 粒子群内での不均一な崩壊や硬さ計測精度の課題を解決するため、基板修飾プロセスを工夫した新たな固定化法を見出した。これにより、基

板の平滑性を維持しながら LNP を安定して固定化することに成功し、硬さの計測精度を大幅に向上させた（相対標準偏差を 30%に改善）。これにより、AFM を用いた LNP の硬さ評価法を実用的なレベルで確立した。同評価法を用いた解析により、LNP はリポソーム製剤と比較して有意に低い硬さを示し、より柔軟かつ脆弱な物性を有することを定量的に明らかにした。また、LNP 製剤と空粒子では平均的な硬さが近い場合でも、力学応答や形態の分布に差異が認められ、AFM により両者を識別可能であることを示した。

令和 7 年度には、サイズと硬さの 2 変量分布解析により、クライオ電子顕微鏡法（cryo-TEM）で特定した微細構造の出現頻度が異なる LNP 製剤間の統計的な有意差を検出することに成功したほか、エンドソーム内を模倣した酸性環境下で LNP が硬化する現象を明らかにした。これらの結果から、開発した AFM 評価法は、脂質組成の変動や物理化学的環境の変化に伴う LNP の質的变化を捉え得る手法であり、LNP 製剤の同等性/同質性評価に資する可能性が示された。これらの成果を踏まえて、AFM および cryo-TEM による LNP の品質評価における技術的課題や留意事項を整理した総説を公表した。

（2）有効性・安全性に寄与する LNP 製剤の品質特性の明確化

【外部ストレス負荷による品質特性変動の評価】

令和 5 年度は、HeLa 細胞を用いた GFP 発現系に基づく *in vitro* 生物活性評価系を構築し、LNP 添加量、作用時間および死細胞染色条件の最適化を完了した。本評価系を用いた解析により、残留エタノールが粒子安定性および薬物封入率に影響し、生物活性低下を招く要因となることを明らかにした。さらに、血清中リポタンパク質が試験結果の変動要因となり得ることを突き止め、LNP 製剤の生物活性評価における技術的留意点を明確化した。

令和 6 年度には、物理的ストレス（振動・凍結融解等）を付与した劣化 LNP モデルを作製し、生物活性の低下に伴って平均粒子径の増大と mRNA 封入率の低下が連動して生じる相関関係を明らかにした。また、コロナ荷電化粒子検出器（CAD）を用いた逆グラジエント法による高精度な構成脂質量法を確立した。さらに、特定の脂質成分を含む LNP を 4℃で長期保管した際、生物活性の変化に先んじて細胞傷害性の増大および脂質由来不純物の増加が進行することを見出し、製剤の安全性評価における有用な知見を得た。

令和 7 年度には、摩損度試験器を用いた落下衝撃（キャビテーション様ストレス）負荷試験を実施し、外部物理ストレスに起因する粒子径増大、mRNA 封入率低下、およびタンパク質発現量の顕著な減弱を定量的に立証した。さらに、NanoFCM を用いた単粒子解析を導入し、外部ストレス負荷に伴い空粒子形成割合が増加する現象を捉えることに成功した。

以上の一連の成果は、LNP 製剤の品質特性と生物活性との因果関係を実験的に裏付けるものであり、有効性・安全性に寄与する重要品質特性（CQA）候補の同定に向けた科学的根拠を提供するものである。

【凍結乾燥製剤の試作と長期安定性の評価】

mRNA-LNP 製剤の社会実装における障壁である保存安定性の克服に向け、凍結乾燥プロセスの最適化および保護剤のスクリーニングを実施した。その結果、特定の糖類配合が凍結乾燥時のストレスから LNP 構造を効果的に保護し、生物活性の保持に有効であることを見出した。

さらに、約 2 年間にわたる長期保存試験において、凍結乾燥品は冷蔵保存条件下においても物理化学的安定性を維持し、mRNA の封入率および生物活性を良好に保持することを確認した。本成果は、超低温管理を要しない mRNA-LNP 製剤の実現可能性を実験的に示すものであり、超低温コールドチェーンへの依存軽減に資する製剤化技術として、凍結乾燥法の有用性を裏付けるものである。

(3) LNP 製剤の品質管理指針案の作成

令和 6 年度には、WHO の mRNA ワクチンに関するテクニカルレポート、米国薬局方 (USP) ドラフトガイドライン、生物学的製剤基準、および既承認の mRNA ワクチンの審査報告書等を精査し、mRNA-LNP 製剤として考慮すべき主要な特性評価項目および分析法を体系的に整理し、総説として公表した。

令和 7 年度には、日本製薬工業協会 (製薬協) LNP 製剤開発促進プロジェクトのメンバーと共同執筆した総説 2 本を投稿し、実用化を見据えた技術情報の発信および普及に努めた。

産官学連携の観点では、研究代表者の阿部および研究分担者の原矢が国際薬事規制当局プログラム (IPRP) のナノ医薬品ワーキンググループに参画し、各国規制当局との LNP 品質評価法に関する情報共有および議論を継続的に行った。また、シンポジウム等を通じて、PMDA や製薬企業、アカデミアとの意見交換を行い、LNP 製剤の品質評価に関する産官学でのコンセンサス形成に取り組んだ。

3. 研究成果の意義

本研究の最大の意義は、LNP 製剤の品質評価において、従来の「粒子集団としての平均特性値評価」に加え、「単一粒子レベルの不均一性評価」の重要性を科学的根拠に基づいて示した点にある。NanoFCM による mRNA 封入プロファイルの定量評価法、ならびに AFM による LNP の物理的特性評価法を確立し、これらを統合した分析プラットフォームを構築することで、従来の評価系では把握が困難であった LNP 固有の不均一性を体系的に可視化・定量化することを可能とした。

外部ストレス試験においては、生物活性の低下と連動する複数の品質特性パラメーター (粒子径、封入率、空粒子割合、脂質不純物等) を多角的に評価する手法を整備し、LNP 製剤の有効性・安全性に寄与する CQA 候補の抽出に資する実験的知見を得た。本知見は、LNP 製剤の製造管理および品質保証体制を科学的に構築する上で有用であり、今後の規制環境整備にも貢献し得るものである。特に、空粒子形成割合が CQA となり得る可能性を実験的に示した点は、EMA ドラフトガイドライン等の国際的なガイドラインとの整合性の観点からも意義が大きい。

また、凍結乾燥製剤の試作および長期安定性評価により、冷蔵保存可能な mRNA-LNP 製剤の実用化に向けた道筋を実験的に示した。本成果は、超低温コールドチェーンへの依存を大幅に軽減し得る製剤化技術として凍結乾燥法の有用性を裏付けるものであり、将来的な医療現場でのアクセシビリティ向上および医薬品供給体制の合理化に向けた基礎データを提供するものである。

本研究班は、3 年間の研究成果を複数の総説および学術論文として公表するとともに、国内外のシンポジウム等を通じて、LNP 製剤の品質評価に関する産官学での議論を積極的に推進した。本研究で確立した単一粒子解析を主軸とする評価基盤は、次期 AMED プロジェクトにおける標的指向型 (アクティブターゲティング) LNP の品質評価研究へと継承・発展させる予定である。本成果は、次世代 LNP 製剤の品質管理に関するレギュラトリーサイエンス研究を継続的に推進する上で、重要な基盤となるものである。

1. Background

The clinical success of mRNA COVID-19 vaccines has positioned lipid nanoparticles (LNPs) as a leading drug delivery platform for next-generation therapeutics. However, the structural complexity of LNPs poses significant challenges for quality control and stability under external stresses. Specifically, conventional bulk-average characterization methods alone are insufficient to fully capture the inherent heterogeneity of these formulations, underscoring the need for analytical approaches capable of evaluating single-particle properties critical for ensuring efficacy and safety. To address these regulatory science challenges, this three-year project focused on three primary objectives: (1) establishment of advanced single-particle quality evaluation methods, (2) identification of quality attributes associated with efficacy and safety, and (3) development of a scientific framework for quality control of LNP formulations.

2. Key Achievements

Establishment of a single-particle analysis platform:

A quantitative method for evaluating mRNA encapsulation profiles was developed using a flow nano-analyzer, NanoFCM. By applying multiparameter fluorescence analysis, this method enabled single-particle-level assessment of heterogeneity in mRNA loading and empty particle formation. Additionally, an atomic force microscopy (AFM)-based method for evaluating the mechanical properties of LNPs was established through optimization of substrate immobilization protocols, leading to improved measurement reproducibility. The integration of NanoFCM and AFM provided an analytical platform capable of visualizing and quantifying LNP-specific heterogeneity that is difficult to capture using conventional ensemble-averaged approaches.

Identification of quality attributes linked to bioactivity:

An in vitro bioactivity assay based on GFP expression in HeLa cells was established and used to evaluate quality changes in LNP formulations. Using LNP degradation models generated by external stress loading, including mechanical agitation, freeze–thaw cycling, and cavitation-like stress, several quality attributes were found to be associated with reduced biological activity. These included changes in particle size, mRNA encapsulation efficiency, empty particle fraction, and lipid-derived impurities. In particular, the increase in empty particle fraction under stress conditions was experimentally demonstrated, supporting its potential relevance as a critical quality attribute candidate. These findings provide scientific evidence for the rational design of manufacturing controls and quality assurance strategies for LNP formulations, in line with emerging international regulatory discussions.

Lyophilization and long-term stability evaluation:

To address the storage stability challenges of mRNA-LNP formulations, lyophilized formulations were prepared through optimization of the freeze-drying process and screening of protective excipients. Long-term stability testing demonstrated that lyophilized mRNA-LNP formulations could maintain physicochemical stability, mRNA encapsulation efficiency, and biological activity under refrigerated storage conditions. These results provide experimental proof of concept for mRNA-LNP formulations that do not require ultra-low-temperature storage and support the potential utility of lyophilization as a formulation technology to reduce dependence on ultra-low-temperature cold-chain systems.

Regulatory Science Dissemination:

The outcomes of this project were disseminated through multiple review articles and original research publications, including collaborative review articles with members of the Japan Pharmaceutical Manufacturers Association LNP formulation development project. In addition, the principal investigator and co-investigator participated in the

International Pharmaceutical Regulators Programme Nanomedicines Working Group and continued information exchange with regulatory authorities from other regions. Discussions with PMDA, industry, and academic researchers were also promoted through domestic and international symposia, contributing to consensus building on quality evaluation strategies for LNP formulations.

3. Significance and Outlook

The primary significance of this research lies in shifting the LNP quality evaluation paradigm from bulk-average metrics to single-particle resolution. The established analytical platform provides a robust scientific basis for the rational design and quality assurance of complex LNP formulations. These insights and methodologies are set to be extended to the evaluation of targeted (ligand-modified) LNPs in subsequent research projects, continuing to drive the regulatory science that will underpin the next generation of genomic medicines.